



Institut de Chimie Organique

Etude des voies métaboliques conduisant à la bétanine dans des cultures de *Beta vulgaris* L. par incorporation de tyrosine et de dihydroxyphenylalanine.

Thèse de doctorat

présentée à la

Faculté des Sciences de
l'Université de Lausanne

par

Jacques Alain Bauer

Licencié en Sciences Naturelles
Université de Lausanne

Jury

Prof. Manuel Ojanguren, Président
Prof. Manfred Mutter, Directeur de thèse
Prof. Hugo Wyler, Expert
Dr. Giulio Genoni, Expert

LAUSANNE

2001

Imprimatur

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

Président	Monsieur Prof.	Manuel Ojanguren
Directeur de thèse	Monsieur Prof.	Manfred Mutter
Rapporteur		
Experts	Monsieur Prof.	Hugo Wyler
	Monsieur Dr	Giulio Genoni

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

Monsieur Jacques Bauer

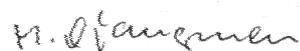
Licencié ès sciences naturelles de l'Université de Lausanne

intitulée

**Etude des voies métaboliques conduisant à la bétanine
dans des cultures de *Beta vulgaris* L. par incorporation
de tyrosine et de dihydroxyphenylalanine**

Lausanne, le 25 octobre 2001

pour Le Doyen de la Faculté des Sciences



Prof. Manuel Ojanguren

à ma femme Sabine et à mes enfants Aline, Florence et Mélanie

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Manfred Mutter pour ses conseils et le Professeur Hugo Wyler pour son soutien tout au long de ce travail.

Ma gratitude va également au Dr Giulio Genoni pour ses remarques constructives.

Merci en particulier au Professeurs Reinhard Zenk et Jean-Pierre Zrýd pour leurs contributions aux cultures de cellules et la mise à disposition de l'infrastructure de leur laboratoire, ainsi qu'au Dr Lavanchy pour les analyses des acides aminés.

Merci également aux Professeurs Ernst Schumacher, Ernst Hairer et Manuel Ojanguren pour leur contribution aux mathématiques de l'analyse compartimentale.

Table des matières

PARTIE THEORIQUE	1
1. Les bétalaines et leur biosynthèse.	1
2. Les cultures de cellules.	6
2.1. <i>Introduction.</i>	6
2.2. <i>Les cultures de plantes productrices de bétalaines.</i>	6
2.3. <i>Préparation et manipulation des cultures de Beta vulgaris L.</i>	7
3. Séparation des métabolites de Beta vulgaris L.	18
3.1. <i>Méthodes de séparation.</i>	18
3.2. <i>Développement d'une application de l'HPLC couplée à la radiochromatographie.</i>	22
3.3. <i>Développement d'un programme d'acquisition de données spectrophotométrique (UV-VIS) et radiochromatographique pour l'HPLC.</i>	25
4. Caractérisation des métabolites de Beta vulgaris.	29
4.1. <i>Le cyclodopa glucoside.</i>	29
4.2. <i>La dopamine.</i>	36
5. Incubation de tyrosine-¹⁴C et dopa-¹⁴C avec de jeunes racines de Beta vulgaris L.	37
5.1. <i>Incubation avec les précurseurs radioactifs.</i>	37
5.2. <i>Incorporation de dopa-2-¹⁴C.</i>	38
5.3. <i>Incorporation de tyrosine-3-¹⁴C.</i>	41
5.4. <i>Premières conclusions et questions ouvertes.</i>	43
6. Analyse compartimentale.	44
6.1. <i>Introduction.</i>	44

6.2. <i>La procédure expérimentale.</i>	45
6.3. <i>Appréciation des résultats.</i>	47
6.4. <i>Vers une modélisation.</i>	55
6.5. <i>Conclusions.</i>	64
7. Incorporation simultanée de la tyrosine-³H et de la dopa-¹⁴C.	66
7.1. <i>Le motif de l'étude.</i>	66
7.2. <i>La cinétique d'internalisation.</i>	66
7.3. <i>La cinétique d'incorporation.</i>	68
7.4. <i>La répartition centésimale.</i>	69
7.5. <i>L'internalisation effective.</i>	71
7.6. <i>L'incorporation relative et conclusions.</i>	71
8. Expérience de compétition.	73
8.1. <i>Le motif de l'étude.</i>	73
8.2. <i>Expérience de compétition.</i>	73
8.3. <i>Les cinétiques d'internalisation.</i>	73
8.4. <i>La répartition centésimale.</i>	75
8.5. <i>Répartition du marquage dans la bétanine.</i>	81
8.6. <i>Effet de l'ajout des précurseurs sur les radioactivités spécifiques.</i>	82
8.7. <i>Biodilutions internes.</i>	84
8.8. <i>Conclusions.</i>	86
9. Expérience d'incorporation en présence d'un inhibiteur de la dopa-décarboxylase, la 2-(fluorométhyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine (MFMD).	88
9.1. <i>Le motif de l'étude.</i>	88
9.2. <i>Le MFMD.</i>	89
9.3. <i>Expérience d'inhibition.</i>	90

9.4. <i>La cinétique d'internalisation.</i>	90
9.5. <i>Absorption par les cellules et analyse de la répartition centésimale dans les extraits.</i>	91
9.6. <i>Répartition du marquage dans la bétanine.</i>	96
9.7. <i>Effet de l'ajout des précurseurs sur les réservoirs et les radioactivités spécifiques.</i>	97
9.8. <i>Biodilution interne.</i>	99
9.9. <i>Conclusions.</i>	100
10. Modèle et conclusions.	103
10.1. <i>Modèle.</i>	103
10.2. <i>Conclusions.</i>	107
PARTIE EXPERIMENTALE	111
1. Généralités.	111
1.1 <i>Appareillage et mesures.</i>	111
1.2 <i>Méthodes de séparation.</i>	112
1.3 <i>Quantification des métabolites par spectrophotométrie UV-Visible.</i>	112
1.4 <i>Comptage des échantillons radioactifs par scintillation liquide.</i>	117
2. Chromatographie HPLC.	118
2.1. <i>Méthodes de séparation HPLC analytiques.</i>	118
3. <i>Radiochromatographie.</i>	122
3.1. <i>Radiochromatographie en continu.</i>	122
3.2. <i>Mesures d'efficacité du détecteur à scintillation FLOONE HP équipé d'une cellule téflon.</i>	124
3.3. <i>Calcul de la radioactivité spécifique des métabolites (méthode C).</i>	125
3.4. <i>Choix de la méthode la plus adéquate pour la détermination de la distribution de l'activité (méthode C).</i>	126
3.5. <i>Mesures d'efficacité du détecteur à scintillation FLOONE HP équipé d'une cellule à</i>	

<i>scintillateur solide: expérience de cinétique (méthode D).</i>	126
<i>3.6. Purification et contrôle de pureté des précurseurs radioactifs.</i>	127
4. Incubation de racines de <i>Beta vulgaris</i> avec des précurseurs radioactifs: dopa-2-¹⁴C et tyrosine-3-¹⁴C.	129
<i>4.1. Incorporation de dopa-2-¹⁴C dans une jeune racine de <i>Beta vulgaris</i>.</i>	129
<i>4.2. Incorporation de tyrosine-3-¹⁴C dans une jeune racine de <i>Beta vulgaris</i>.</i>	131
5. Le cyclodopa glucoside.	136
<i>5.1. Formation du CDG à partir de la bétanine.</i>	136
<i>5.2. Isolement du CDG, de l'acide bétalamique et de la bétanine à partir de racines de betteraves rouges.</i>	138
<i>5.3. Le N-formyl-cyclodopa glucoside (FCDG) et le 5-O-glucoside de l'acide 5,6-dihydroxy-indolacétique à partir du cyclodopa glucoside.</i>	140
6. Cultures de cellules.	143
<i>6.1 Composition des milieux de culture: milieu B5 et MS.</i>	143
<i>6.2 Sélection de cellules contenant des bétalaïnes et dépourvues de pigment.</i>	144
<i>6.3 Préparation des cultures pour l'analyse des acides aminés.</i>	144
<i>6.4. Mesure de la vitesse de croissance.</i>	144
<i>6.5 Mesure de la teneur en protéines par gramme de tissu frais.</i>	145
<i>6.6 Mesure de la concentration de bétanine et du taux d'acides aminés libres.</i>	146
7. La dopamine dans les suspensions cellulaires de <i>Beta vulgaris</i>.	149
<i>7.1. Isolement, purification et identification de la dopamine comme métabolite principal dans les cultures de cellules de <i>Beta vulgaris</i>.</i>	149
8. Cinétique d'incorporation dans les cultures de tissus.	152
<i>8.1. Introduction.</i>	152
<i>8.2. Internalisation des précurseurs tyrosine-3-¹⁴C et dopa-3-¹⁴C dans les cultures de</i>	

<i>cellules.</i>	152
<i>8.3. Séparation et quantification des métabolites.</i>	154
9. Incorporation simultanée de la tyrosine et de la dopa à marquage différencié.	163
<i>9.1. Internalisation de la tyrosine-3'-³H,5'-³H et dopa-3-¹⁴C dans les cultures de cellules.</i>	163
<i>9.2. Séparation et quantification des métabolites.</i>	164
10. Incorporations compétitives de tyrosine et dopa	169
<i>10.1. Internalisation de la tyrosine-3-¹⁴C et dopa-3-¹⁴C dans les cultures de cellules.</i>	169
<i>10.2. Séparation et quantification des métabolites.</i>	170
11. Incorporation en présence d'un inhibiteur: Monofluoro méthyl dopa (MFMD).	180
<i>11.1. Internalisation de la tyrosine-3-¹⁴C et de la dopa-3-¹⁴C dans les cultures de cellules en présence et en absence d'inhibiteur de la dopa-décarboxylase: le 2-(fluorométhyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-alanine.</i>	180
<i>11.2. Séparation et quantification des métabolites.</i>	181
Liste des abréviations et des unités utilisées.	190
Bibliographie.	191
<i>Publications et présentations liées au travail de thèse</i>	193
<i>Stages</i>	193
Résumé.	194
Summary.	196
<i>Curriculum vitae</i>	198

PARTIE THEORIQUE

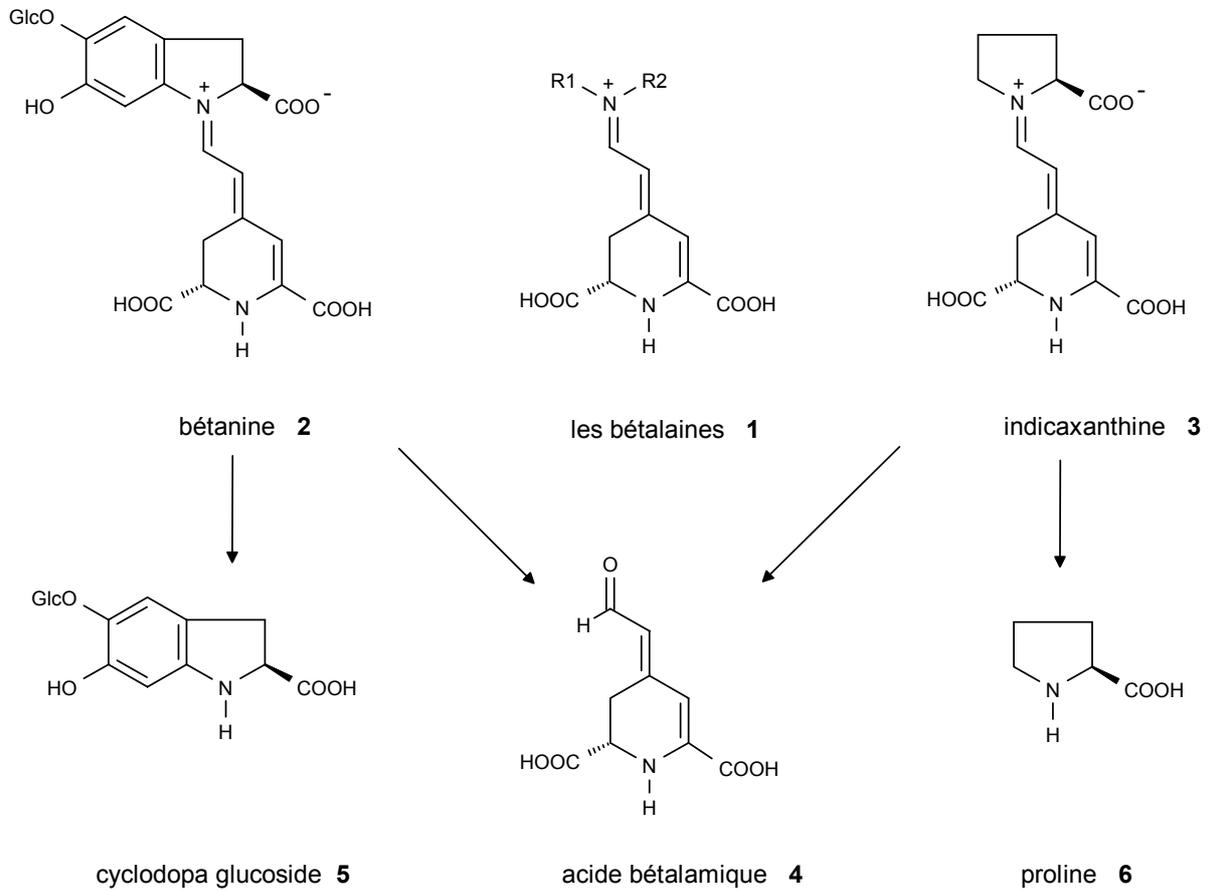
1. Les bétalaïnes et leur biosynthèse.

1.1 Introduction.- Les bétalaïnes **1** forment une classe de colorants végétaux composée des bétacyanes rouges-violettes et des bétaxanthines jaunes [1]. La coloration des fleurs, feuilles, tiges ou fruits des plantes s'étend du violet au jaune avec des nuances intermédiaires dans le rouge et l'orange, résultant du jeu des deux teintes. Les bétalaïnes sont typiques de la majorité des familles de l'ordre appelé autrefois CENTROSPERMALES, aujourd'hui CARYOPHYLLALES; cela comprend les *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Didieraceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae*, *Portulacaceae* et *Stegnospermaceae* [2,3,4]. Du point de vue taxonomique l'apparition de ces colorants est caractéristique, ces plantes sont dépourvues d'anthocyanes. A part cela, de façon tout à fait isolée, on trouve exclusivement des bétaxanthines dans quelques espèces de la famille des AGARICALES, notamment dans l'amanite tue mouches *Amanita muscaria* [5].

Les premières études sur ces colorants remontent aux années 70 du XIX^{ème} siècle. Des problèmes techniques ont retardé jusqu'en 1957 l'isolement à l'état cristallisé de la bétanine **2**, bétacyane de la betterave rouge *Beta vulgaris* L. Sa structure est élucidée à l'aide de la spectroscopie ¹H-RMN basé sur des produits de dégradation [6]. Par la suite, la structure de l'indicaxanthine **3**, colorant jaune des fruits et fleurs des cactées *Opuntia ficus indica* L, une bétaxanthine, est établie à son tour [7].

Il s'est avéré que l'acide bétalamique **4**, commun aux bétacyanes et bétaxanthines, est libéré sous l'action de l'anion hydroxyle [8]. La bétanine comme l'indicaxanthine sont générées par la condensation de l'acide bétalamique **4** avec respectivement du cyclodopa glucoside **5** et de la proline **6** en échange d'une molécule d'eau produisant le chromophore intense d'une polyméthine basique chargée (*Schéma 1*). Leur corrélation est établie *in vitro* par échange mutuel des deux acides aminés dans des conditions faiblement alcalines.

Schéma 1: Les bétalaïnes, relation entre la bétanine et l'indicaxanthine.



Bétacyanes rouges violettes R1-N-R2 = résidu cyclodopa

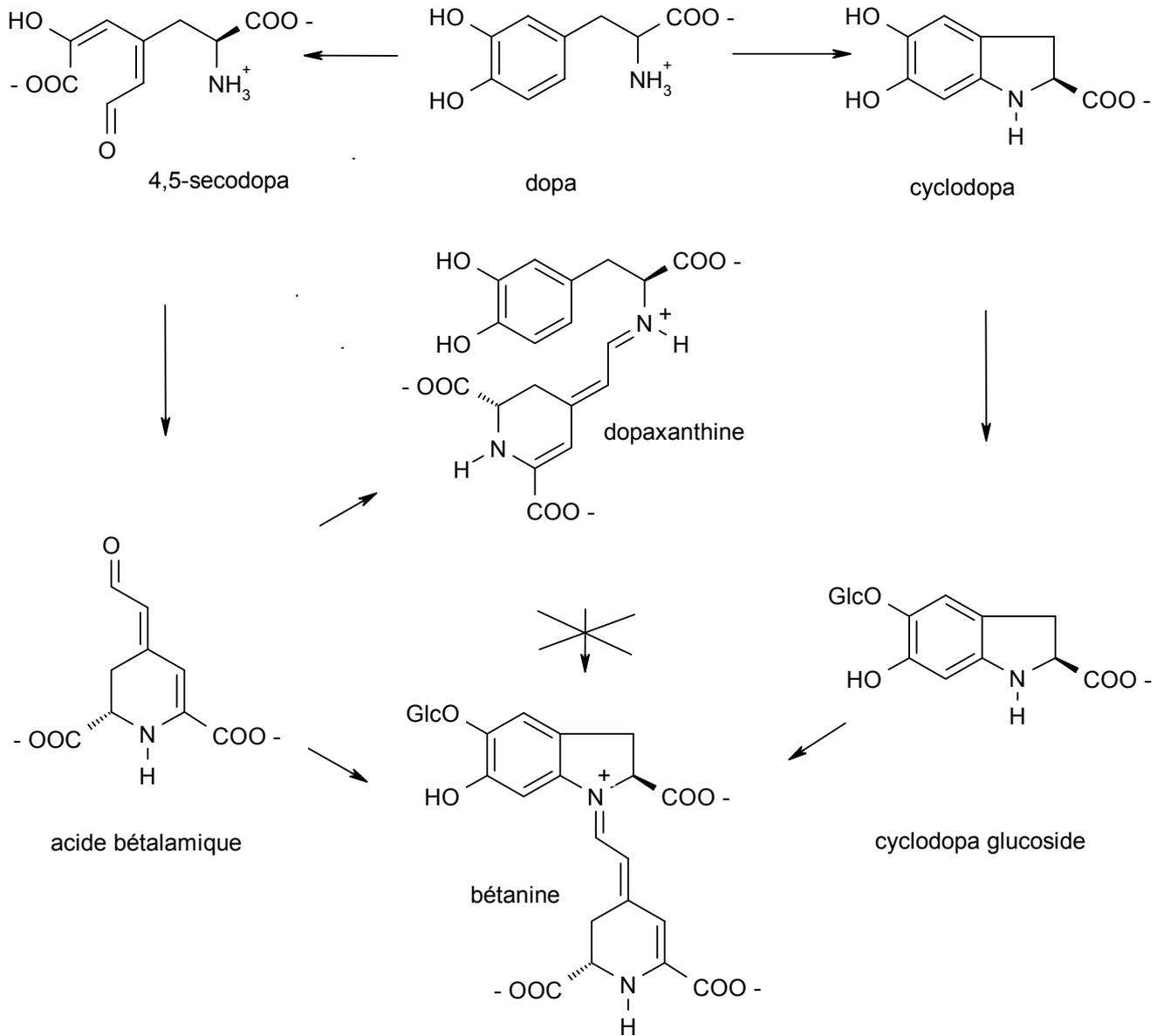
Bétaxanthines jaunes R1-N-R2 = résidu amine ou acide aminé

L'apparition de la cyclodopa comme acide aminé dans les bétacyanes est unique et restreinte aux seules CARYOPHYLLALES. Des variations dans la glycosylation déterminent les nuances du violet au rouge-violet typiques des bétacyanes. Les nuances dans le jaune des bétaxanthines sont conditionnées par la structure de la partie acide aminé incorporé.

1.2. La biosynthèse de la bétanine 2. - L'hypothèse émise en 1963 sur l'origine biosynthétique [9] s'était inspirée du fait que les deux entités constitutantes, la cyclodopa et l'acide bétalamique, étaient de même taille C₉ et pouvaient dériver du même précurseur, la dopa, par des voies métaboliques indépendantes (Schéma 2). Une voie concerne la cyclisation de celle-ci aboutissant à la cyclodopa que l'on retrouve stabilisée sous forme de

son glucoside **5**. Il y a un précédent dans la cyclisation oxydative de la dopa

Schéma 2: Biosynthèse des bétalaïnes.



connu des études de *Raper* [10] et de *Mason* [11] sur la formation de la mélanine. Par l'autre voie la dopa subit une scission du noyau catécholique conduisant à un fragment qui se cyclise en acide bétalamique (**4**). En renfort à cette idée venaient les découvertes de *Dagley* [12] et *Hayaishi* [13] des catéchases d'origine bactérienne, capables d'une scission du cycle aromatique au site dit *extradiol*.

Des travaux d'incubation de la dopa marquée avec des racines de betteraves et de la pulpe des figues de cactus rouge [14] ont confirmé son incorporation dans les deux parties de la bétanine bien que très inégale, 95% dans la partie acide bétalamique contre 5% dans la partie cyclodopa. D'autres études d'incubation effectuées en présence de tyrosine marquée avec des plantules de betteraves rouges [15] ou de *Amaranthus* [16] ont prouvé à leur tour son incorporation dans la bétanine, respectivement dans l'amaranthine, mais avec une répartition différente du marquage dans l'acide bétalamique et dans la cyclodopa.

La formation du cyclodopa glucoside mérite un intérêt particulier de par son apparition conjointe avec celle des bétacyanes. Une étude sur la biosynthèse de l'indicaxanthine dans la pulpe de figue de cactus [17] suggère que l'entité bétalamique se forme de manière indépendante. De plus l'acide bétalamique est repéré comme métabolite uniquement dans les plantes produisant des bétaxanthines [18]. La coïncidence de l'apparition du cyclodopa glucoside avec celle des bétacyanes a suggéré la possibilité d'une étape intermédiaire sous forme de la dopaxanthine, bétalaïne composée de l'acide bétalamique et de la dopa dont la cyclisation conduirait directement à la bétanidine. Mais l'expérience avec de la dopaxanthine marquée utilisée comme précurseur n'a pu consolider cette hypothèse [19]. D'ailleurs le cyclodopa glucoside **5** était inconnu comme métabolite libre au début de ce travail de thèse.

Du point de vue théorique un problème fondamental paraît implicite à la formation du cyclodopa glucoside (**5**) sur la voie proposée d'une cyclisation de la dopa. Selon "*Raper-Mason*" l'oxydation de la dopa à des pH neutres produit la dopaquinone, par voie enzymatique (tyrosinase) ou en présence d'un agent d'oxydation, cyclisant aussitôt en 5,6-dihydroxyindoline-2-carboxylate, et celui-ci, sous l'action d'agents oxydatifs présents dans le mélange réactionnel, subit une oxydation immédiate en indolinequinone correspondante, un "corps rouge" qui fut appelé *dopachrome* [20]. La 5,6-dihydroxyindoline, composé hypothétique intermédiaire que nous appelons *cyclodopa* porte dans la littérature encore le nom *leucodopachrome*. Il est inconcevable d'arrêter la réaction initiée par oxydation de la dopa au stade

de la cyclodopa, raison pour laquelle on ne peut pas le repérer comme produit intermédiaire. La *cyclodopa* a été mise en évidence *in vitro* seulement par réduction du *dopachrome* [21]. Le *dopachrome* d'ailleurs n'est pas stable, se transformant ultérieurement en dihydroxyindole et celui-ci en mélanine.

1.3. Le projet de recherche. - Les expériences accomplies dans le cadre de cette thèse entre 1981 et 1985 ont eu comme but de clarifier les voies biosynthétiques conduisant à la bétanine. On s'est proposé de rationaliser le résultat différencié de l'incorporation des deux précurseurs tyrosine et dopa en suivant de près le comportement cinétique de tous les métabolites impliqués, une étude que l'on définit comme analyse compartimentale. Les études d'incorporation précédentes appliquées sur des plantules de betteraves ou des fruits de cactus n'ont pu fournir qu'une information ponctuelle sur l'incorporation des précurseurs radioactifs dans la bétanine après un temps d'incubation arbitraire.

Le matériel adéquat à des fins d'études cinétiques est la culture de cellules. La culture des suspensions cellulaires de *Beta vulgaris* n'avait pas encore été réalisée avant la fin des années septante. C'est à ce moment que nos travaux ont été encouragés par un premier don de cultures rouges des laboratoires du Prof. Zenk à Munich. Il s'agissait de développer la technique de culture et nous avons profité d'une aide précieuse de la part du Prof. Zrýd et de son laboratoire.

Pour effectuer les mesures d'internalisation des précurseurs et de répartition de la radioactivité introduite dans des temps d'incorporation relativement courts il était indispensable de développer une technique d'analyse rapide et précise des métabolites. On s'est proposé d'adapter le système de séparation HPLC sur phase inverse, déjà utilisé avec succès dans la séparation des bétalaïnes [22,23], et de le combiner avec des entités de détection spectroscopique et de comptage radioactif. Le contrôle du système de séparation aussi bien que celui de la détection en continu restait à mettre au point moyennant programmation à l'aide d'un ordinateur, ce qui n'était pas encore disponible au début de nos travaux.

2. Les cultures de cellules.

2.1. Introduction.

L'utilisation des cultures de cellules végétales pour la production des produits biologiquement intéressants est toujours un thème de grande actualité. Les cultures de cellules constituent le matériel de base par excellence pour les études sur le métabolisme des produits naturels [24]. L'obtention d'une population cellulaire stable est une condition préalable pour ces études.

La source de cellules utilisée pour l'établissement d'un cal primaire et le milieu de culture sont essentiels pour l'homogénéité et la croissance cellulaire. Dans le milieu adéquat, la capacité synthétique des cellules est nettement augmentée. Il n'y a pas de recette générale concernant l'accumulation d'un produit du métabolisme secondaire dans les cultures de cellules; chaque espèce végétale a son propre comportement en culture. Les différents facteurs déterminants sont traités dans maintes revues [25 à 28].

2.2. Les cultures de plantes productrices de bétalaines.

Jusqu'en 1981, seules deux publications traitent de cultures de cellules de *Beta vulgaris* L. Constabel et Nassif-Makki [29] ayant initié des cals de 5 variétés de *Beta vulgaris* sur Agar et en milieu liquide (Gamborg), trouvent que l'accumulation des bétalaines est conditionnée surtout par le stade de développement des cals, la présence de 1 ppm d'acide 2-4 dichlorophénoxyacétique (2-4D), de tyrosine ou de dopa dans le milieu et la lumière ne suffisent pas à induire l'accumulation de pigment; la formation des pigments est favorisée par une diminution des auxines et l'addition d'acide gibbérellique. Weller et Lasure [30] obtinrent différentes lignées de cultures - rouge, orange, jaune, incolore - en modifiant le milieu (Murashige et Skoog) avec NAA et kinétine; néanmoins une hétérogénéité de pigmentation est observée. Ni l'un ni l'autre des deux essais cités n'ont conduit à une population homogène de cellules stabilisées. Pourtant, d'autres espèces productrices de bétalaines ont été cultivées avec succès *in vitro*: *Portulaca*

[31 à 35] et *Myrtillocactus* [36, 37]. Plus récemment Strack [38] fait mention de travaux sur la biosynthèse des bétaxanthines avec des cultures *in vitro* de *Beta vulgaris* variété jaune.

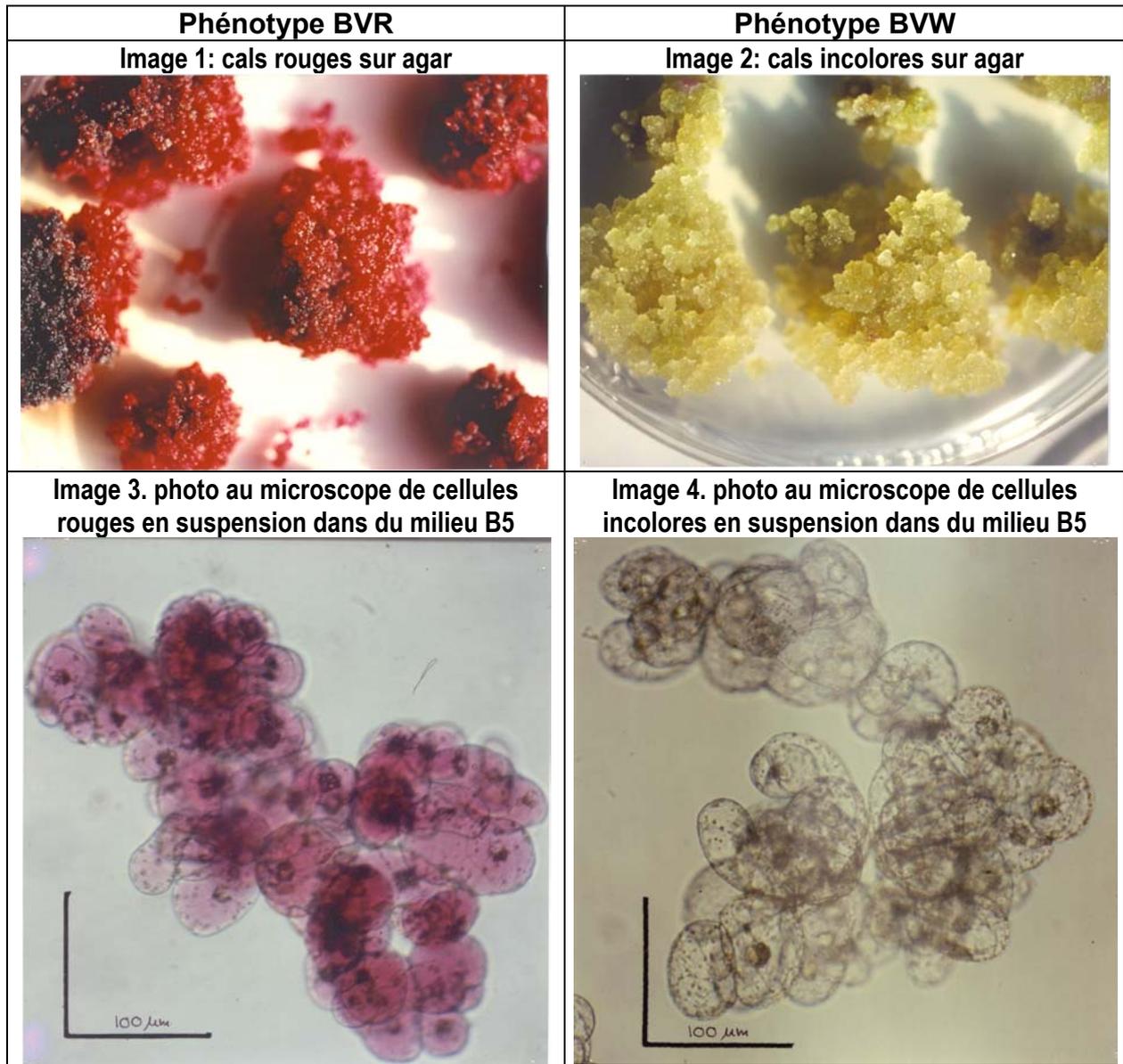
2.3. Préparation et manipulation des cultures de *Beta vulgaris* L.

2.3.1. Sélection des cellules pigmentées et incolores: - Les premières cultures de cellules de *Beta vulgaris* nous ont été offertes par le professeur M. Zenk [39]. En collaboration avec le professeur Zrýd nous avons par la suite appliqué des méthodes connues pour obtenir des souches "propres".

Les cellules ont été anergiées, c'est à dire qu'elles ne nécessitent plus l'apport d'hormones de croissance exogènes dans le milieu de culture [40]. Les cellules anergiées ont d'abord été transférées sur Agar avec du milieu B5 frais sans hormones (Gamborg [41]). Après plusieurs transferts, les cals sont sélectionnés visuellement selon leur pigmentation: la souche pigmentée est appelée **BVR** et la souche dépourvue de pigment **BVW**. Ces cals ont été transférés et sélectionnés plusieurs fois.

Les cals rouges et incolores (images 1 et 2), qui sont très friables, sont induits en suspension liquide avec le même milieu (images 3 et 4 par microscopie). Ils sont alors transférés et maintenus dans du milieu B5 pendant toute la durée des expériences. Le transfert dans du milieu frais est effectué tous les 3.5 jours [40].

La variabilité clonale de la production des bétalaïnes dans les cultures de *Beta vulgaris* a fait l'objet de plusieurs travaux [42,43,44] d'où il ressort que l'abondance relative des différents phénotypes est déterminée *in fine* par les taux respectifs de croissance de chacun d'eux, les interactions entre les populations et leur inter convertibilité. Dans une situation dans laquelle les taux de variation et de réversion sont relativement bas, il est possible de stabiliser les clones ainsi isolés pour leurs caractères.



2.3.2. Le poids frais des cellules comme référence: - Pour quantifier l'incorporation des composés marqués dans les cellules, nous avons besoin d'une méthode reproductible de mesure de leur poids. La mesure du poids frais des cellules a été jugée par le passé peu digne de confiance [45]. Une procédure de mesure du volume des cellules compactées par centrifugation, - homogenized volume "HV" -, a été proposée [46], mais ne parait pas avoir obtenu une approbation générale. Alternativement, il est fréquemment proposé de se référer au poids sec pour obtenir la plus grande précision [47,48], mais cette procédure souffre du désavantage qu'elle n'est pas réalisable avant l'expérience et pose des problèmes techniques lors de l'utilisation de traceurs radioactifs. D'autre part, le rapport entre le poids

frais et le poids sec est variable en fonction de l'état de la culture, en particulier pour les cellules âgées. Selon [48], la mesure du poids frais est une bonne méthode de détermination de la croissance de la biomasse de suspensions cellulaires en Erlenmeyer. Pour obtenir plus de précision sur l'état des cultures, une mesure de la viabilité cellulaire [48] devrait être effectuée parallèlement à la mesure du poids frais.

La méthode que nous avons adoptée pour la mesure du poids frais des cellules dans nos expériences a le grand avantage d'être rapide, précise et reproductible. En bref les suspensions cellulaires sont filtrées et lavées avec une légère succion sur un Büchner, après quoi elle peuvent facilement être pesées sur une feuille de papier d'aluminium et transférées dans le nouveau milieu. Inévitablement, les cellules retiennent une certaine quantité de liquide en surface. L'erreur ainsi introduite dans la mesure du poids frais est d'ordre systématique plutôt qu'irrégulière. La mesure du poids sec, réalisée après coup au cours d'une de nos expériences nous a confirmé la reproductibilité de la mesure du poids frais au cours du temps: le poids sec varie dans la même proportion que le poids frais (Tab. Exp.6.3). Les résultats quantitatifs des expériences seront basées sur le poids frais.

2.3.3. Les cultures de *Beta vulgaris* L.

Le graphe du développement cellulaire d'un batch de culture en suspension décrit une courbe caractéristique sigmoïde [49,50]. On y distingue les différentes phases de vitesse de croissance:

stationnaire - exponentielle - constante - décélération – stationnaire.

Ces phases se répètent à chaque inoculation. Elles sont fonction de la densité cellulaire et de la concentration des nutriments dans le milieu.

La phase exponentielle est idéale pour l'étude des problèmes biosynthétiques. Durant cette phase, le système métabolique des cellules se trouve à l'état d'équilibre (steady state) où les concentrations cellulaires de tous les métabolites et enzymes sont constantes [51]. La phase exponentielle est repérée à l'aide d'un tracé logarithmique qui se présente comme une droite ascendante dont la pente signifie la constante de croissance.

Généralement, on préfère caractériser la croissance en phase exponentielle sous forme du temps nécessaire au doublement des cellules. Le début de la phase exponentielle est indiqué par l'intersection de la droite représentant la partie linéaire de la courbe, avec l'horizontale de la phase stationnaire initiale (lag phase).

L'étude du développement de nos cultures a été entreprise pour établir les conditions propices aux expériences d'incorporation. La mesure initiale de l'état de la culture a été effectuée 2h après le transfert sur milieu frais. Les mesures se sont suivies à intervalles réguliers de 24h pendant 5 jours et ont porté indépendamment sur deux paramètres:

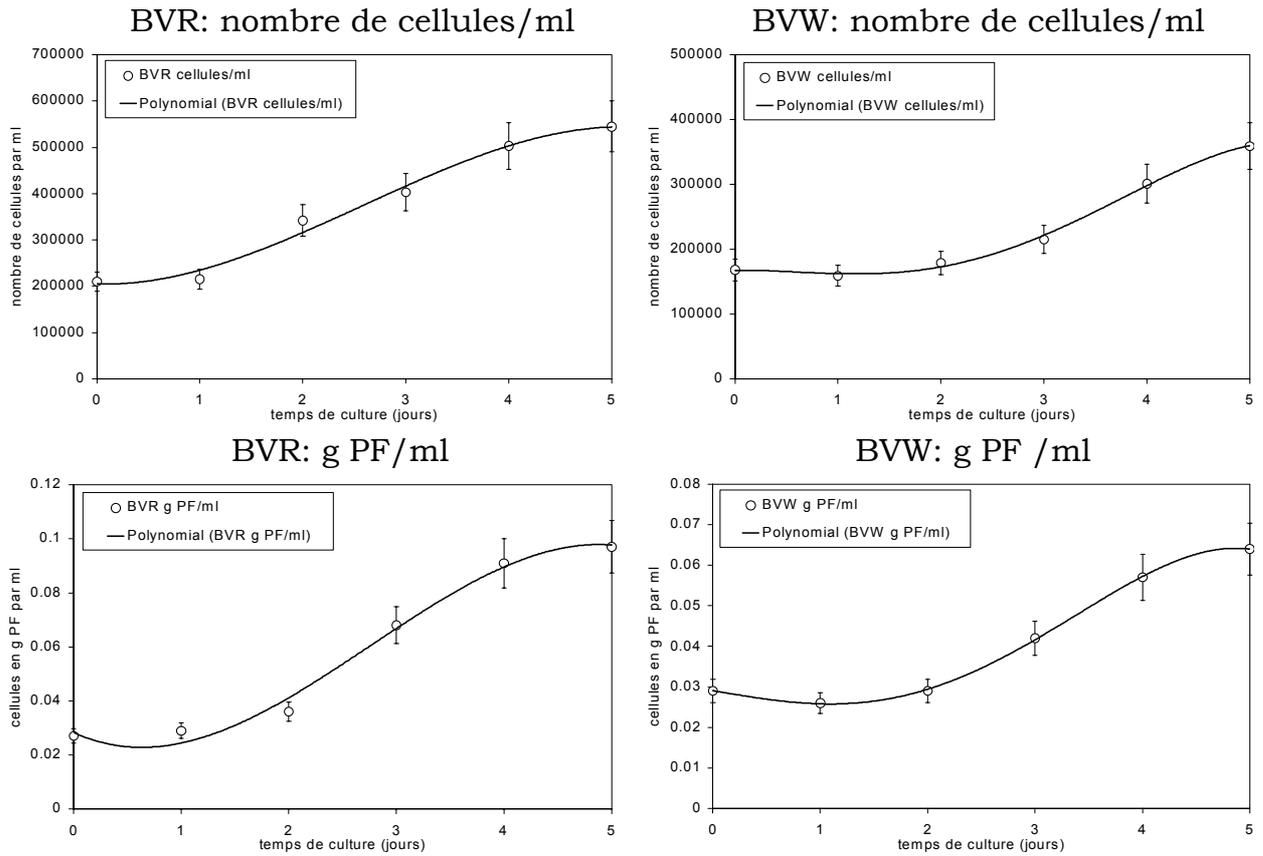
- le dénombrement des cellules par unité de volume: comptage
- la masse cellulaire par unité de volume: poids frais / poids sec

La méthode de dénombrement est habituelle, alors que la détermination de la biomasse par pesée ne s'applique pas généralement pour différentes raisons, notamment l'incertitude expérimentale reprochée (voir paragraphe "poids frais"). Le développement des cultures au cours du temps est présenté dans la Fig. 2.1.

De cette présentation il est évident que:

1. les cultures incolores (BVW) se développent plus lentement que les colorées (BVR). Le temps de doublement du nombre de cellules de BVW (67 h) est de 50 % supérieur à celui des cultures BVR (44 h).
2. le développement de la biomasse est plus rapide que celui du nombre des cellules. Leur taille varie donc au cours du développement, phénomène bien connu. L'écart entre biomasse et nombre de cellules est plus important dans le cas de BVR que de BVW.
3. la phase exponentielle (poids frais) se situe entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour après le transfert sur milieu frais. Par rapport à ce qui est noté dans la littérature, cette période intéressante est relativement courte [50].

Fig. 2.1. Développement des cultures au cours du temps: BVR et BVW



$$\frac{\ln n - \ln n_0}{t - L} = \frac{\ln 2}{T} = k$$

L = temps de latence, t = temps total, T = temps de doublement, k = vitesse de croissance spécifique

Les temps de doublement (T) du nombre de cellules et des biomasses sont présentées ci-après:

	BVR		BVW	
	nbre de cellules	biomasse	nbre de cellules	biomasse
k	0.0158	0.0272	0.0103	0.0149
L	24 h	38 h	48 h	48 h
T	44 h	26 h	67 h	46 h

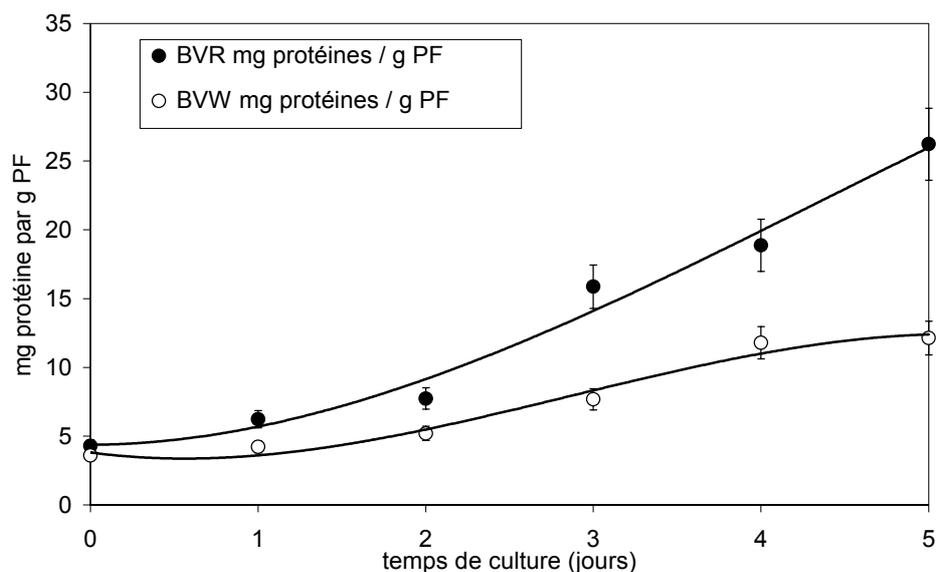
2.3.4. Evolution des teneurs en protéines, en bétanine et en acides aminés libres au cours du temps: - Chaque transfert de culture sur milieu frais entraîne une activation du métabolisme. L'activité métabolique change au cours d'un cycle de croissance: nous avons constaté une croissance du taux de métabolites en phase exponentielle jusqu'à un maximum, puis une décroissance au niveau initial. Ce maximum n'est pas atteint par tous les enzymes et métabolites en même temps. Des études systématiques n'ont pas été faites à ce sujet; on trouve dans certains cas des mesures sur la totalité des produits azotés ou de quelques métabolites et enzymes [50].

Notre intérêt a porté sur la production en protéines et en acides aminés en fonction du développement cellulaire, ceci afin de sélectionner le moment opportun pour l'ajout des précurseurs radiomarqués aux suspensions cellulaires. Pour leur analyse, nous nous sommes servis des méthodes suivantes:

- **les protéines solubles** dans l'extrait ont été dosées par turbidimétrie et les acides aminés libres par chromatographie sur échangeur d'ions. Pour évaluer le taux de protéines, on mesure "l'absorbance" des protéines précipitées par l'addition d'acide trichloroacétique et on la compare avec celle de l'albumine sérique de boeuf prise comme étalonnage. Un des avantages de cette méthode par rapport aux méthodes colorimétriques usuelles (Bradford, Lowry, DC, BCA) réside dans les mesures de densité optique au-delà des interférences causées par les bétalaïnes.

Le taux de protéines par rapport au poids cellulaire (en mg/g PF, Fig. 2.2) n'augmente que très légèrement au cours d'un cycle de croissance des cultures. L'augmentation globale que l'on obtient en multipliant ces données par le facteur de croissance relative suit donc de près celle de la masse cellulaire.

Fig. 2.2: Evolution de la teneur en protéines en fonction du temps.

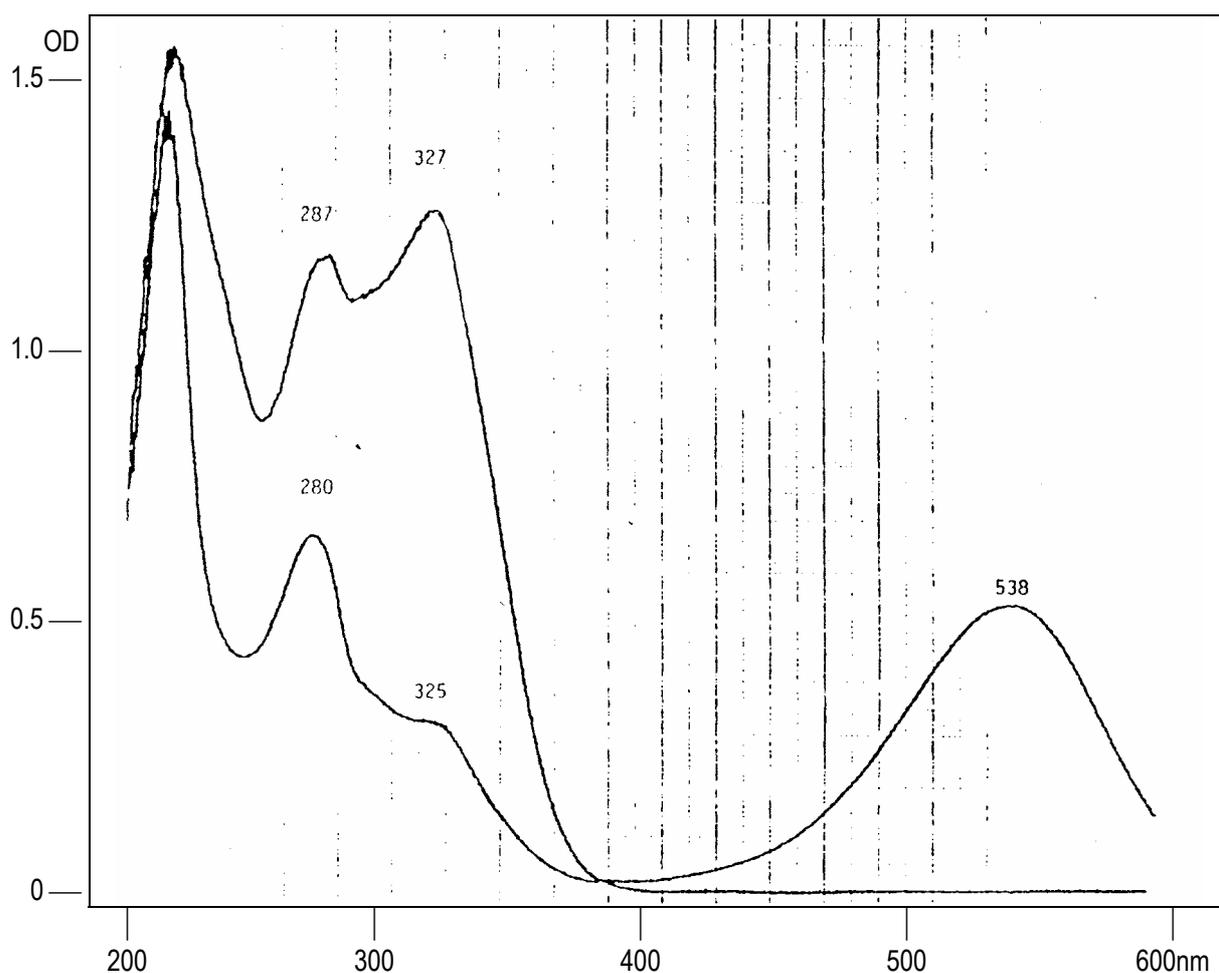


- **bétanine**: les extraits de la souche BVW sont presque exempts de bétanine comme le montre les spectres UV-Vis des extraits (Fig. 2.3).

- **la teneur en acides aminés** est déterminée après leur séparation à l'aide d'un autoanalyseur avec dérivatisation post-colonne par la ninhydrine.

En regardant le taux des acides aminés en fonction du développement cellulaire (Fig. 2.4 et 2.5; Exp. Tab. 6.4 a et b), on constate pour les deux souches BVR et BVW une augmentation passagère dans les premiers jours après le transfert, culminant entre le 1er et le 3e jour, donc en phase exponentielle. La fluctuation par rapport au niveau initial n'est pas la même pour tous les acides aminés: les plus touchés sont le glutamate, la glutamine, l'alanine et la valine, tandis que la majorité ne suit que de manière atténuée ou insignifiante la croissance cellulaire. Comme exceptionnels, on remarque les taux relativement importants de GABA et d'éthanolamine et un fait particulièrement intéressant est la présence de dopa dans les cellules BVR.

Fig. 2.3: Spectres UV-Visible des extraits BVR et BVW.



Les composés suivants - glutamate, glutamine, alanine, valine, GABA et éthanolamine - augmentent de manière spectaculaire pour les deux souches BVR et BVW. Dopa est à nouveau un cas particulier: présent simultanément avec le pigment bétanine dans les BVR, il ne se manifeste qu'à un taux insignifiant dans le cas des BVW en parallèle avec l'absence totale de pigment.

Un aspect nouveau est offert par la présentation graphique (Fig. 2.5) de la production totale des métabolites émanant d'un gramme de cellules transférées (taux du métabolite multiplié par le facteur de croissance relatif Exp. Tab. 6.1 et 6.2).

Dans la Fig. 2.5, les courbes de production des acides aminés montrent une accumulation passagère. La période d'accumulation maximale se trouve décalée vers le 3^{ème} jour après l'inoculation de la culture dans le cas des

cultures rouges. Dans le cas des cultures incolores, ce maximum est atteint généralement plus tôt, au premier jour.

En contraste avec cette allure se trouvent les métabolites tels que la glutamine, le GABA et l'éthanolamine qui montrent une tendance nette à l'accumulation. On constate également un écart spectaculaire du niveau de concentration de ces mêmes métabolites dans les deux souches: leur accumulation passe du double au triple dans BVW par rapport à celle dans BVR. Fait remarquable, l'accumulation de ces métabolites, tous dérivés de l'acide glutamique arrive tardivement après qu'une accumulation quadruple de glutamate ait eu lieu.

2.3.5. Choix des souches et conditions expérimentales pour les expériences de radiomarquage.

Souche BVW. - Cette souche est particulièrement riche en dopamine et en acides phenylpropénoïques et leurs dérivés glucosylés, mais elle ne contient ni bétanine, ni cyclodopa glucoside. L'absence de ces deux derniers composés nous ont conduit à sélectionner la souche BVR pour nos études de la biosynthèse de la bétanine.

Souche BVR. - Les conditions expérimentales choisies pour les expériences d'incubation avec les traceurs radioactifs ont été sélectionnées à partir des résultats des courbes de croissance (partie linéaire de la phase exponentielle entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour), de l'évolution des teneurs en acides aminés (accumulation des teneurs en acides aminés - tyrosine et dopa - avec un maximum vers le 3^{ème} jour) et de la concentration en bétanine (synthèse active au 3^{ème} jour – Fig. 2.5 - pendant la phase exponentielle de croissance).

Conditions expérimentales choisies pour les études de biosynthèse. - Les cultures BVR sont transférées dans du milieu nutritif frais tous les 3½ jours. Au minimum trois transferts des cultures sont effectués avant d'ajouter le traceur radioactif au 3^{ème} jour suivant le dernier transfert.

Figure 2.4: Evolution des teneurs en acides aminés libres et métabolites en nmol par g PF.

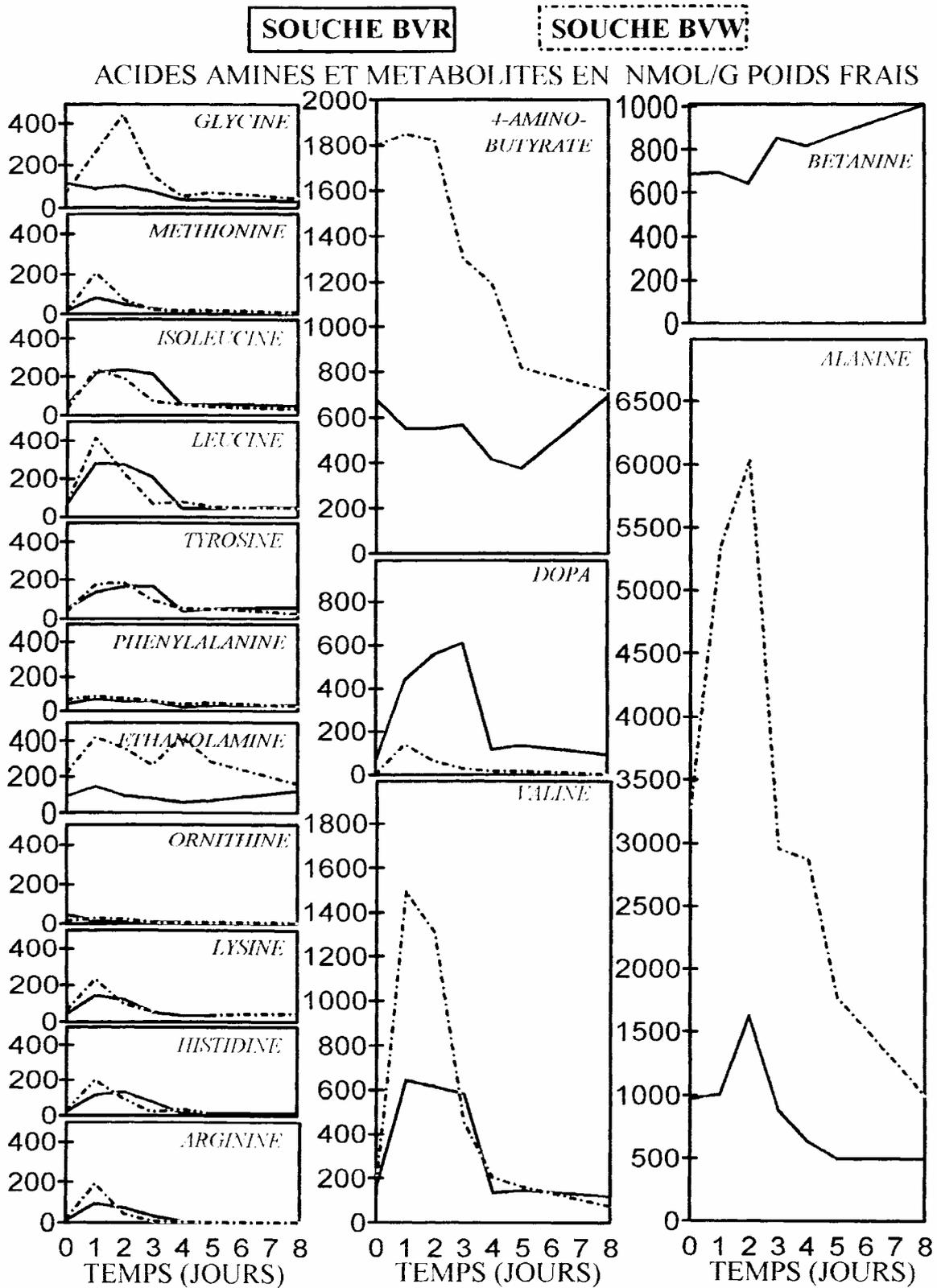
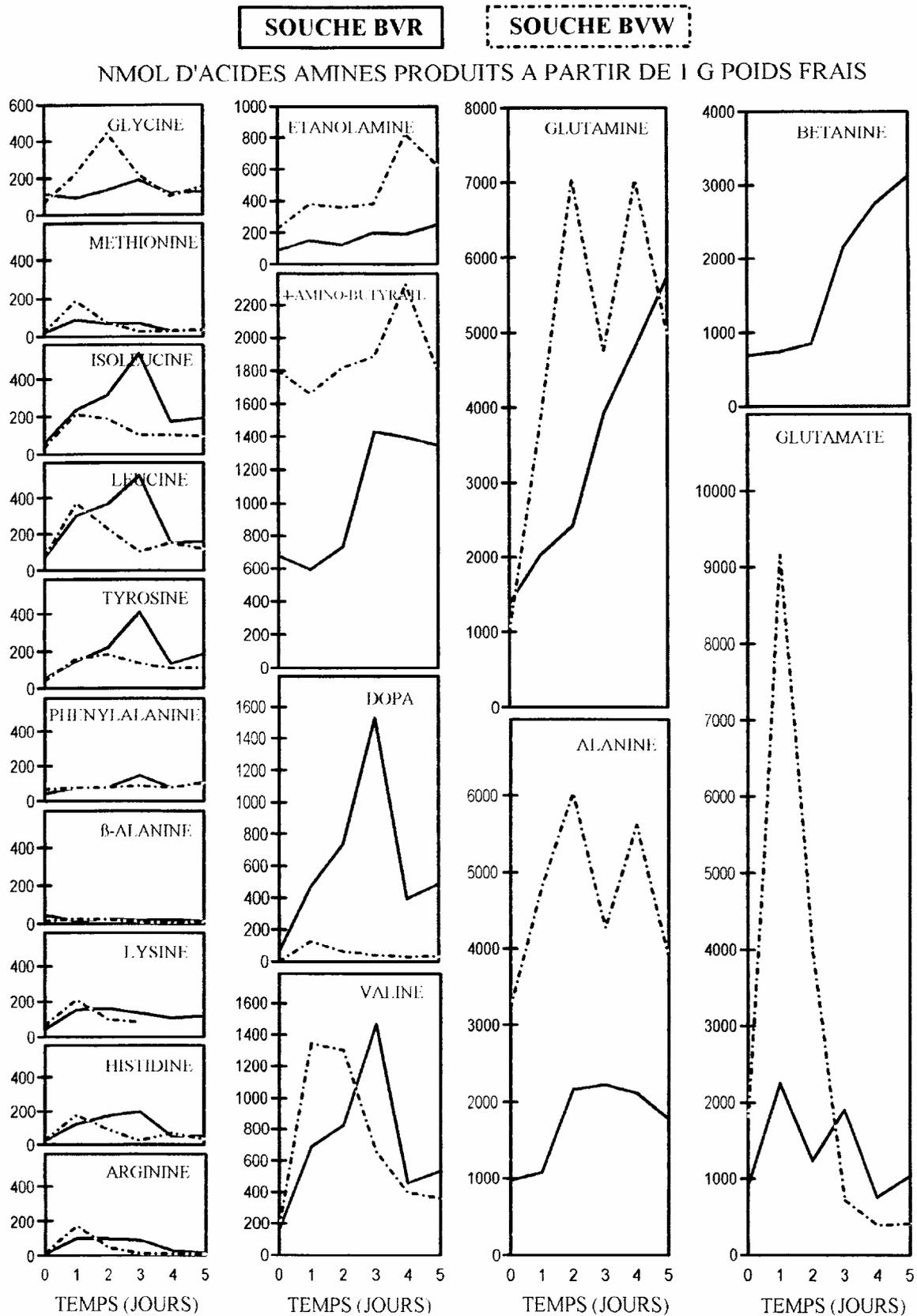


Figure 2.5: Normalisation de l'évolution du taux d'acides aminés libres à partir de 1 g PF.



3. Séparation des métabolites de *Beta vulgaris* L.

3.1. Méthodes de séparation.

La séparation des métabolites principaux présents dans les extraits de *Beta vulgaris* L. par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) en phase inverse est relativement complexe. En effet, pour réaliser en une seule étape une séparation correcte des produits polaires (acides aminés et amines), des produits de poids moléculaire plus élevé (bétalaïnes), ou peu polaires (acides phenylpropanoïdes libres ou glucosylés), nous avons dû faire appel à des matrices chromatographiques performantes. Nous nous sommes orientés vers les supports de silice en phase inverse RP-18, car ils sont à la fois compatibles avec des phases mobiles 100 % aqueuses et 100 % organiques; d'autre part, leur stabilité dans le temps est remarquable et ils s'équilibrent rapidement avec la phase mobile. L'élution des produits naturels présents dans les extraits aqueux de *Beta vulgaris* est complète en phase inverse.

Diverses phases stationnaires ont été testées pour leurs performances et leur stabilité dans le temps. La matrice qui convient le mieux à la séparation des acides phenylpropanoïques et de leurs glucosides est le Lichrosorb RP-18 5 µm (MERCK); elle sera utilisée à cet effet. La séparation des acides aminés aromatiques, des amines aromatiques et des bétalaïnes est optimale sur Spherisorb ODS-2, 5 µm; c'est cette dernière phase stationnaire qui sera utilisée pour les études biosynthétiques. Les colonnes analytiques ont été remplies par nos soins selon la méthode décrite par Manius [52].

Pour séparer en une seule étape des produits naturels de polarité et de nature si différente, nous avons utilisé trois phases mobiles: de l'eau additionnée de phosphate de sodium, de l'acétonitrile et du méthanol. Au début de la chromatographie, seul le tampon phosphate est utilisé, puis graduellement l'acétonitrile est ajouté jusqu'à 10 % et finalement un double gradient linéaire d'acétonitrile et de méthanol est réalisé jusqu'à une concentration finale de 30 % de chacun des solvants organiques et de 40 % de phosphate. Le gradient utilisé pour séparer les nombreux produits

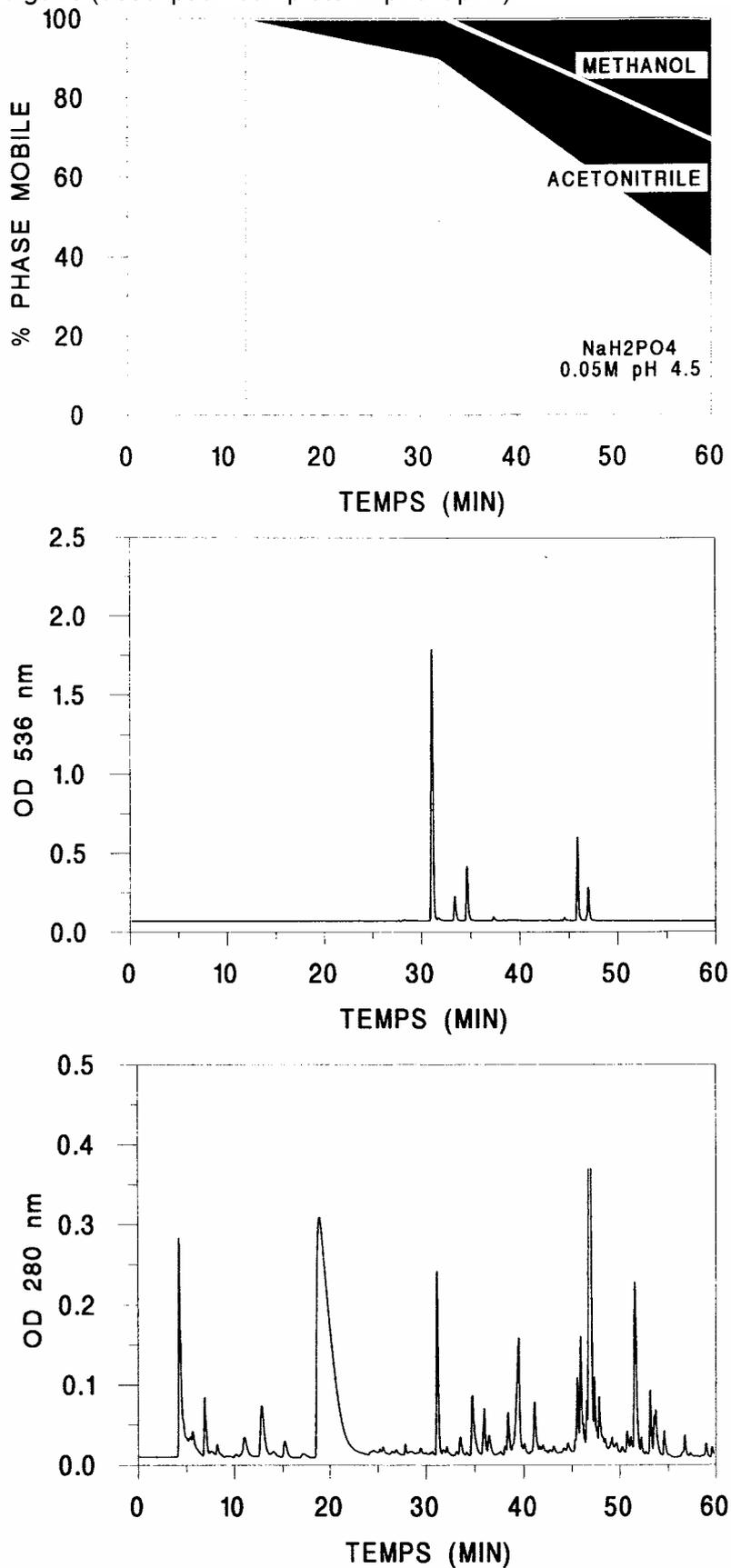
naturels présents dans les extraits de *Beta vulgaris* est présenté dans la Fig. 3.1. avec au dessous les profils HPLC à 280 et 536 nm d'un extrait de suspension cellulaire de *Beta vulgaris*.

Un schéma de la séparation des métabolites principaux de *Beta vulgaris*, *Opuntia ficus indica*, *Amaranthus caudatus* est présentée sous forme tabulaire dans la Fig. 3.2..

L'ordre d'élution des substances dépend essentiellement de leur polarité. Sur un support en phase inverse, les substances les plus polaires sont éluées les premières, soit dans l'ordre:

- 1) les acides aminés, avec en particulier dopa, cyclodopa glucoside et tyrosine.
- 2) la dopamine et la tyramine qui traînent sur ce type de support ("tailing" des amines) [53].
- 3) les bétalaïnes sont éluées avec l'accroissement graduel de la concentration d'acétonitrile: dans l'ordre d'élution, la bétanine, suivie par la vulgaxanthine I et II; chaque pigment est suivi presque immédiatement par son isomère optique (par exemple isobétanine).
- 4) les acides phenylpropénoïques et leurs dérivés glucosylés apparaissent avec l'augmentation progressive (> 10 %) de la concentration d'acétonitrile et de méthanol [54].

Fig. 3.1: Gradient à trois phases mobiles et exemple de séparation HPLC analytique d'un extrait de *Beta vulgaris* (description complète Exp. chap. 2).



Attribution des pics selon Fig 3.2, p.21

Fig. 3.2. Séparation des métabolites de la tyrosine et de dopa par HPLC.

temps [min]	métabolite	TR1 [min]	TR2 dopa=1
0	←----- injection	0	
5			
	←----- acide bétalamique	6.7	0.64
	←----- acide 4-OH-mandélique	8.1	0.77
10			
	←----- dopa (référence)	10.5	1.00
15			
	←----- cyclodopagluco-side	13.5	1.29
	←----- tyrosine	15.4	1.47
20			
	←----- dopamine	19.0	1.81
25			
	←----- dopaxanthine	26.7	2.54
	←----- amaranthine, tyramine	28.0	2.67
	←----- formyl-cyclodopagluco-side	29.0	2.76
30			
	←----- bétanine	30.4	2.89
	←----- ac. 3-méthoxy,4-β-GlcO-benzoïque*	32.1	3.06
	←----- ac. dihydroxybenzoïque	32.8	3.12
	←----- isobétanine	33.6	3.20
35			
	←----- 6-O-(3-méthoxy-4-OH-phénylacétyl)-D-glucose*	35.2	3.35
40			
	←----- bétaxanthine	39.3	3.74
	←----- ac. cis+trans-4-O-β-D-Glc-ferulique*	41.6	3.96
45			
	←----- 6-O-trans-ferulyl-D-glucose*	45.6	4.34
	←----- 1-O-trans-ferulyl-D-glucose*	47.4	4.51
50			
	←----- 6-O-cis-ferulyl-D-glucose*	49.6	4.72
	←----- 1-O-cis-ferulyl-D-glucose, acide ferulique*	51.9	4.94

(*) identification préliminaire

3.2. Développement d'une application de l'HPLC couplée à la radiochromatographie.

Différentes approches ont été développées [55] pour obtenir des données sur le métabolisme de produits naturels ou de synthèse et sur leur cinétique dans des systèmes cellulaires *in vitro* ou *in vivo* dans un organisme entier (bactérie, plante, animal).

Ces méthodes utilisent notamment des isotopes radioactifs - ^3H , ^{14}C , ^{35}S ...- comme traceurs métaboliques. Ces isotopes facilitent la détection et la quantification du précurseur, des produits du catabolisme et des métabolites présents au cours du temps dans les différents compartiments de l'organisme ou des cellules. Après la procédure d'incubation, les dérivés radioactifs - précurseurs et métabolites - sont extraits de la matrice biologique, séparés et purifiés par une procédure chromatographique et la radioactivité déterminée par une technique spécifique, généralement par comptage en scintillation liquide "statique".

La détection de la radioactivité dans l'effluent de la chromatographie peut être effectuée sur des fractions - collecteur de fractions - auxquelles on ajoute un cocktail de scintillation; les fractions sont comptées dans un détecteur à scintillation liquide avec une précision des mesures calculée selon la formule 3.1.

Formule 3.1: déviation standard = $2 \times N^{0.5}$ (N = nombre de coups comptés)

L'inconvénient de la détection en mode statique pour la mesure des fractions HPLC analytique est le très faible volume des fractions inhérent au pouvoir de séparation élevé. Une technique de séparation préparative entraînerait une perte de résolution non souhaitée dans ce type d'étude, en particulier pour les substances dont les temps d'élution sont rapprochés en HPLC analytique. De surcroît, la détection "off-line" est coûteuse en temps de laboratoire et financièrement. Ces désavantages limitent l'utilité de la détection "off-line" dans les études métaboliques.

Comme alternative à la méthodes statique, un système HPLC couplé à un système de radiodétection en continu paraît particulièrement bien adapté aux études du métabolisme d'un précurseur radiomarqué. Un tel système offre l'avantage de la séparation du précurseur et de ses métabolites, la sélectivité pour l'isotope radioactif, la sensibilité, l'évaluation quantitative et surtout une préparation des échantillons très simplifiée assurant des analyses rapides.

Cette technique conjuguant une méthodologie à haute performance de séparation avec la sensibilité de la radiodétection facilite la découverte de métabolites en traces dans un mélange complexe. L'avantage majeur de cette technique d'analyse réside dans la capacité de détecter les produits radiomarqués dans de simples extraits filtrés, diminuant ainsi le risque de la formation d'artefacts liés à des méthodes de purification laborieuses.

Détection en continu de la radioactivité. - L'HPLC couplé à un système de détection en continu de la radioactivité offre l'avantage d'une analyse en temps réel de l'effluent de l'HPLC avec la résolution élevée qui caractérise le système de séparation et les données en résultant peuvent être quantifiées par des programmes appropriés.

Il existe deux types de détecteurs de radioactivité en continu couramment utilisés pour les études métaboliques: les détecteurs hétérogènes et homogènes. Dans un détecteur hétérogène, l'effluent de l'HPLC passe au travers d'une cellule remplie avec un scintillateur solide, constitué de verre ou de plastique dopé et ne nécessite pas d'adjonction de cocktail scintillant. L'énergie émise par les émetteurs β^- est transférée directement à la molécule de scintillateur qui est excitée. La lumière émise en retour par le scintillateur est amplifiée par le tube photomultiplicateur. L'efficacité de ce type de détecteur est inférieure à celle du comptage à scintillation statique ou au comptage homogène avec liquide de scintillation. La pression élevée d'entrée dans la cellule inhérente au support de remplissage utilisé est un handicap, par contre la possibilité de collecter les métabolites au sortir de la cellule de comptage pour des mesures physicochimiques est un avantage réel.

Dans les détecteurs en continu de type homogène, un cocktail scintillant non-gélifiant est ajouté à l'effluent de l'HPLC avant le passage au travers de la cellule de comptage. L'énergie des électrons (rayonnement β^-) est transférée aux molécules de scintillateur présentes dans le cocktail et les photons émis par le scintillateur sont amplifiés par le tube photomultiplicateur qui produit le signal désiré.

Dans nos premières analyses, nous avons expérimenté les deux types de détecteurs homogène et hétérogènes. Les métabolites dont la bétanine ont pu être collectés dans le cas du détecteur hétérogène pour être ultérieurement analysés par d'autres méthodes.

La précision des mesures du détecteur à scintillation en continu sont fonction des paramètres suivants: l'isotope ou les isotopes en cas de double marquage, le débit à travers la cellule de mesure, le volume de la cellule et la composition de l'effluent HPLC (détecteur à flux homogène seulement).

Le facteur influençant le plus le rendement du comptage est le temps de résidence des substances radioactives dans la partie utile de la cellule de mesure placée entre deux tubes photomultiplicateurs positionnés en coïncidence. Le temps de résidence (R) est calculé selon la formule 3.2.

$$\text{Formule 3.2: } R [\text{min}] = \frac{\text{volume utile de la cellule [ml]}}{\text{débit HPLC [ml/min]} + \text{débit cocktail scintillant [ml/min]}}$$

La précision des mesures est calculée selon la formule 3.1 décrite précédemment. Il en résulte que la résolution radiochromatographique des pics séparés par HPLC et le rendement sont influencés par le volume de la cellule de mesure et le temps de résidence. Un compromis entre le volume de la cellule, le rendement du comptage et la résolution doit être déterminé.

Les mesures de radioactivité. – L'électronique de l'appareil convertit les coups mesurés dans les différentes énergies de la fenêtre de mesure en cpm. Pour obtenir des résultats précis, il est nécessaire de soustraire le bruit de fond avant la détermination des valeurs finales de comptage. Le bruit de fond en comptage dynamique homogène est environ 2 fois supérieur à celui du comptage statique.

Efficacité du comptage et *quenching*. - Les détecteurs à flux homogènes ont des valeurs dynamiques d'efficacité plus élevées et surtout beaucoup plus stables que leurs homologues hétérogènes. Les compteurs hétérogènes ont des valeurs de bruit de fond plus élevées, mais sont relativement insensibles au phénomène de *quenching*, perte d'efficacité liée aux changements de phase mobile dans les séparations à gradient en HPLC. Une correction du *quenching* est nécessaire avec les détecteurs homogènes lorsqu'on travaille en mode gradient. La conversion en dpm est calculée à partir du rendement mesuré pour le système avec un échantillon dont les dpm sont connus.

3.3. Développement d'un programme d'acquisition de données spectrophotométrique (UV-VIS) et radiochromatographique pour l'HPLC.

L'étude de la biosynthèse des bêtaïnes dans les cultures de *Beta vulgaris* est compliquée par la nature chimique très différente des métabolites: acides aminés, amines, glucosides, pigments. Un système de séparation très élaboré a été développé pour tenter d'isoler les métabolites radioactifs des autres substances présentes dans les extraits biologiques. Le nombre élevé de substances et leur élution proche rendent les opérations de fractionnement difficiles et laborieuses. D'autre part, les substances absorbent dans l'UV et le visible à divers maxima, ce qui rend une détection monolongueur d'onde insuffisante pour caractériser les diverses substances présentes dans les extraits en une seule séparation. Une solution matérielle à ces problèmes – détection UV-Vis et mesures de la radioactivité – a été trouvée. Le problème de la détection UV-Vis a été résolu par l'acquisition d'un spectrophotomètre à réseau de diodes, capable de mesurer à bref intervalle, l'absorbance sur tout le domaine spectral (200 à 800 nm). La détection de la radioactivité est assurée par un compteur à scintillation liquide/solide en flux continu à fonctionnement en mode homogène et hétérogène. Ces deux instruments offrent les caractéristiques techniques de sensibilité et de fiabilité nécessaire aux études de biosynthèses envisagées. Seul handicap: comment quantifier les informations spectrales et les valeurs de radioactivité au cours du temps.

Conception d'un programme d'acquisition, de traitement numérique et graphique des données sur ordinateur. - Nous avons réalisé un programme d'acquisition des valeurs spectrales UV-Vis et de radioactivité sur PC. La description du système d'analyse et du programme d'acquisition des données figure dans la partie expérimentale (Exp. 1.3 et 3)

Les données transmises par les deux appareils - spectrophotomètre à barrette de diodes et radiochromatographe - apparaissent en temps réel à l'écran sur lequel un maximum de cinq profils chromatographiques peuvent être visualisés simultanément, à choisir parmi 5 longueur d'ondes (unités en densité optique) et deux isotopes ^{14}C et ^3H (unités en cpm).

La configuration du programme permet de présélectionner les paramètres souhaités - temps de chromatographie, intervalle entre deux mesures, de 1 à 5 longueurs d'ondes entre 200 et 800 nm, les isotopes ^{14}C et ^3H ainsi que l'échelle affichée pour chaque paramètre - puis de les visualiser à l'écran en cours d'analyse.

Après l'analyse, les résultats sont stockés sur disque et les profils chromatographiques peuvent être tracés et la surface des pics déterminée par le programme d'intégration.

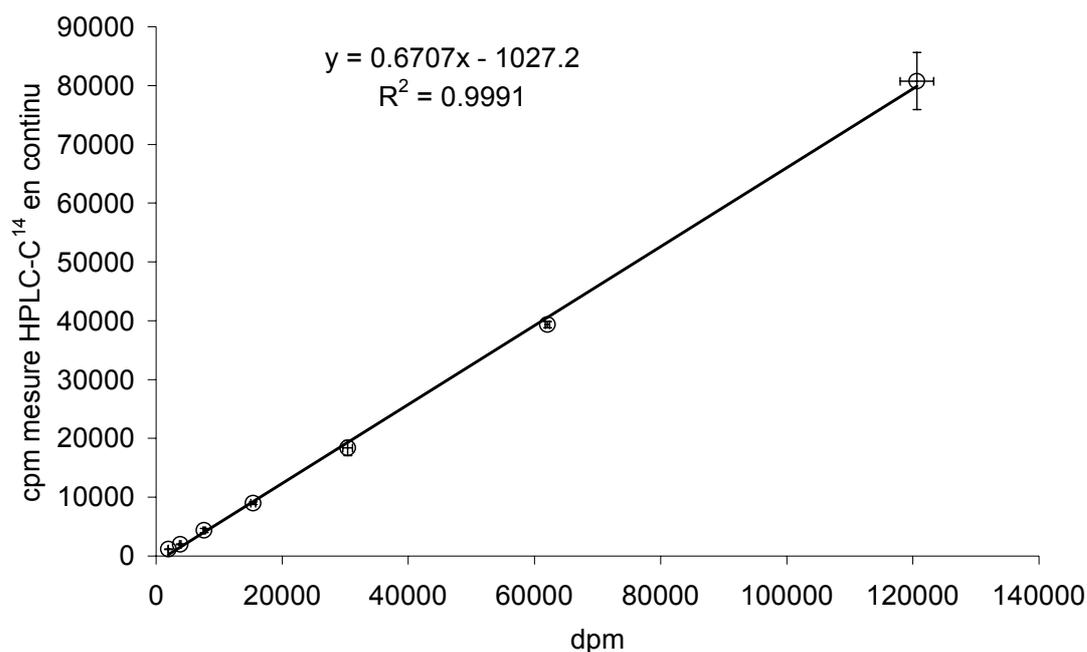
Radiochromatogrammes et correction du *quenching*. - Les effets de la variation de composition de l'effluent chromatographique sur le rendement du comptage radioactif peuvent être compensés. La séparation d'un extrait biologique non-radioactif effectuée par HPLC en mode gradient est effectuée en présence d'un cocktail scintillant dopé avec une quantité de radioactivité connue. Le rendement, variable en fonction de la teneur en solvant organique, est corrigé par l'appel d'un programme spécifique qui calcule et enregistre sur disque les valeurs de rendement du comptage en fonction du temps de chromatographie. Après l'injection d'un extrait biologique radioactif, les valeurs "cpm" sont transformées en "dpm" par ce programme.

Grâce à ce système d'analyse intégré il est possible de déterminer en une seule étape, à partir d'une séparation HPLC d'un mélange de composés radiomarqués présents dans un extrait biologique, la répartition de la

radioactivité dans les différents métabolites et leur radioactivité spécifique.

Validation de la méthode et application. - La validation de la méthode de radiochromatographie consiste en l'injection sur le système HPLC d'aliquotes d'une substance radioactive pure contenant des quantités de radioactivité connues et croissantes. Les résultats sont présentés dans la Fig. 3.3.

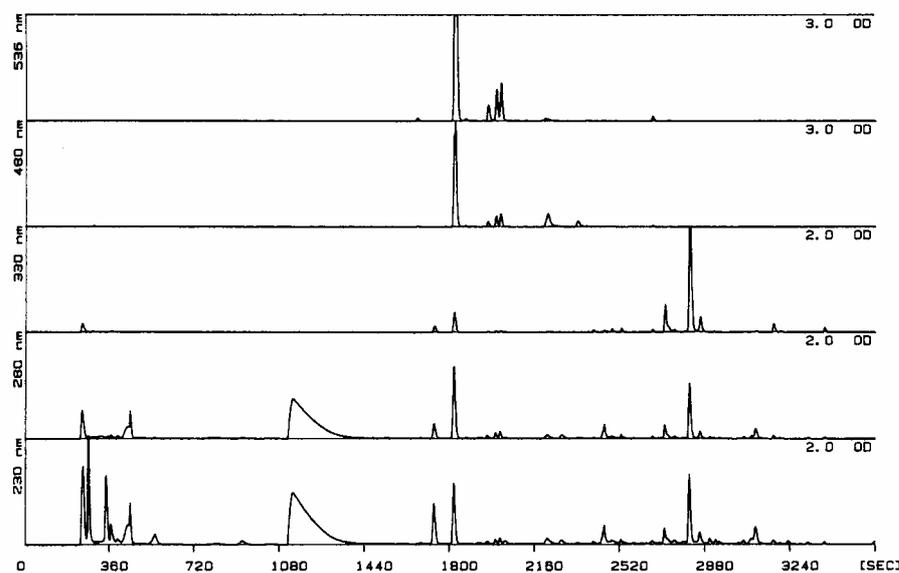
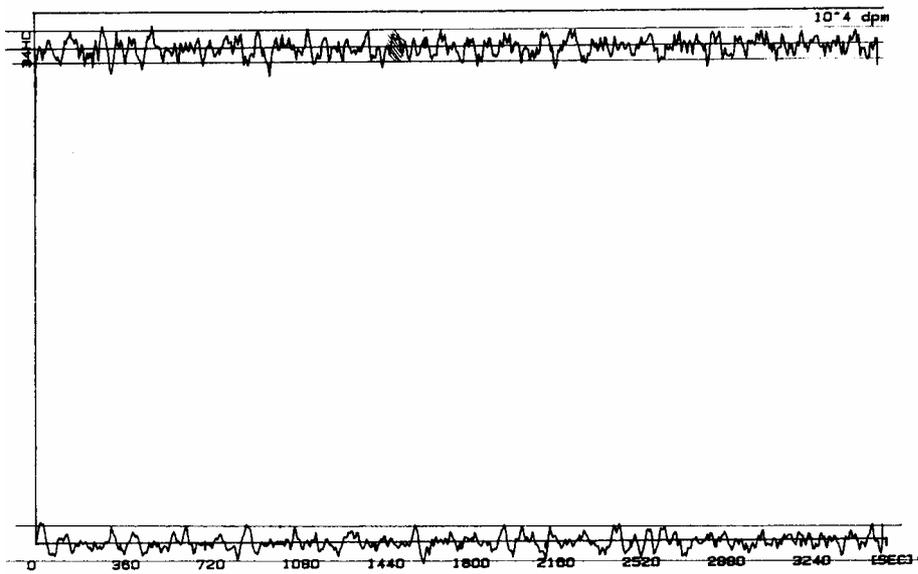
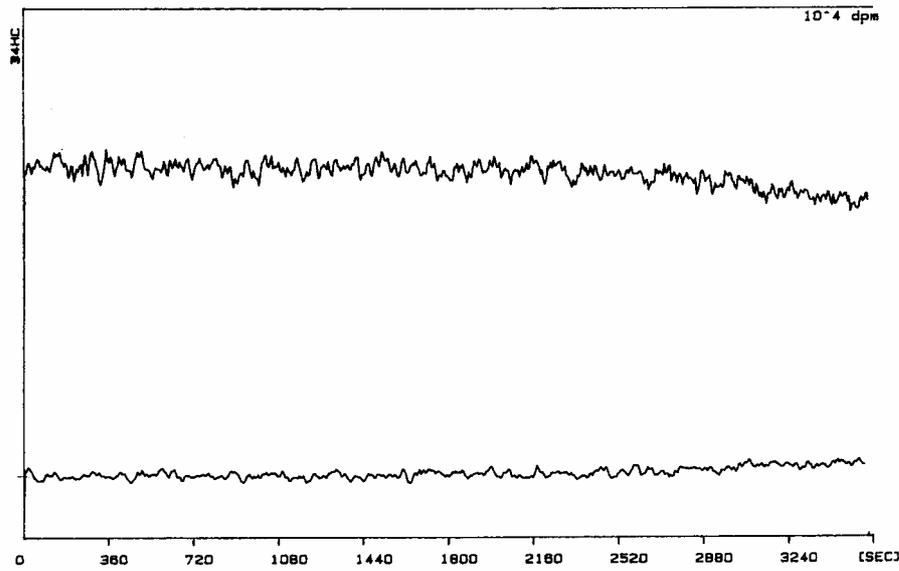
Figure 3.3: Corrélation entre dpm ^{14}C injectés et cpm ^{14}C mesurés par scintillation en flux homogène



Le coefficient de régression linéaire de 0.999 montre que la technique et le programme d'intégration utilisés pour le comptage de la radioactivité en flux homogène sont fiables. Dans les conditions de cet essai, le rendement est de $60\% \pm 4\%$

L'évaluation graphique de la correction pour le *quenching* en mode de séparation gradient est représentée dans la Fig. 3.4. Les valeurs en cpm sont représentées en fonction du changement de composition de la phase mobile et les valeurs corrigées après coup par le programme: la correction pour le changement de rendement fonctionne correctement. L'application en flux homogène à l'analyse des échantillons est décrite dans la partie expérimentale (Exp. chap. 3) et porte le nom de méthode C. La méthode D correspond à l'application en flux hétérogène.

Figure 3.4: Correction dynamique du quenching.



4. Caractérisation des métabolites de *Beta vulgaris*.

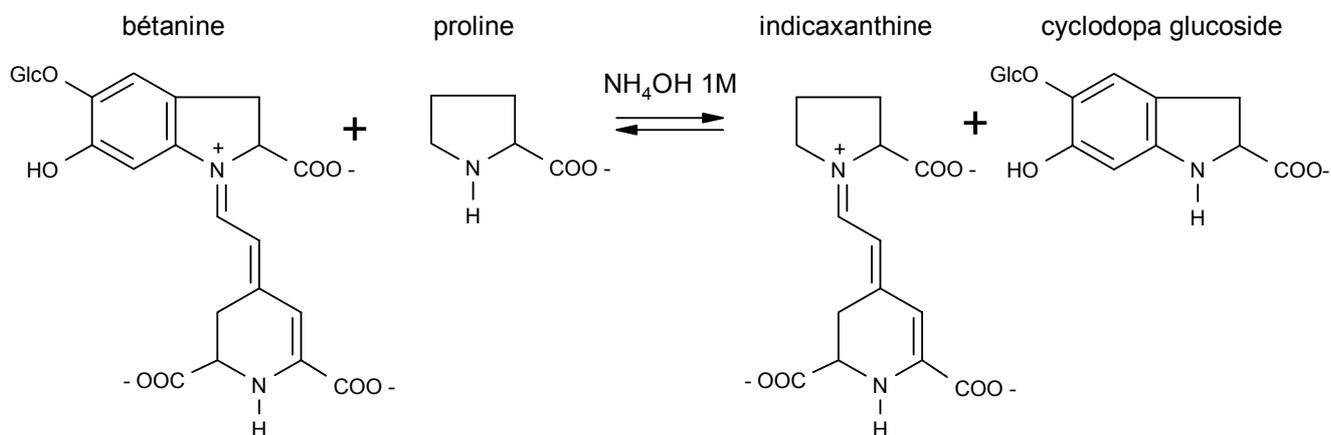
4.1. Le cyclodopa glucoside.

4.1.1 *Partie de la bétanine.*- Le cyclodopa glucoside fait partie intégrante de la bétanine **4** [9], mais n'a pas encore été trouvé sous forme libre. Comme préalable aux études sur la biosynthèse nous avons caractérisé le cyclodopa glucoside. *Sciuto* et al. ont clivé la bétanine avec SO₂ et isolé son hexaacétyl-méthyl-ester après méthylation et acétylation [56]. Dans notre laboratoire le cyclodopa glucoside est mentionné précédemment dans le cadre de travaux biosynthétiques [19].

Dans la bétanine le cyclodopa glucoside est lié sous forme d'un sel immonium avec l'acide bétalamique **2**, l'entité chromophorique. L'hydrolyse dans des conditions basiques libère les deux composantes. En présence d'un autre acide aminé ou d'une amine dans ces conditions une condensation a lieu avec formation de la bétalaïne correspondante. En présence de la proline on obtient l'indicaxanthine [7,57].

4.1.2 *Préparation à partir de la bétanine.*- Suivant la procédure d'échange contre la proline en milieu alcalin à l'ammoniaque [6] (*Schéma 4.1*) le cyclodopa glucoside se trouve libre en solution. Ce mélange réactionnel, acidifié à pH 3 se laisse séparer par chromatographie échangeuse de cations sur SEPHADEX[®]. Sortent dans l'ordre: la bétanine (rouge-violet), l'indicaxanthine (jaune) et quelques produits colorés inconnus, puis en dernier le cyclodopa glucoside (incolore), repéré par son absorption à 280 nm. La fraction enrichie, faiblement colorée, est encore purifiée par HPLC préparative en phase inverse. Le produit repris dans le D₂O pour l'enregistrement de son spectre ¹H-RMN cristallise après évaporation du solvant.

Schéma 4.1. Réaction d'échange.



4.1.3 Propriétés spectrales et détermination des pKa.- Le spectre UV du CDG varie en fonction du pH, ce qui met en évidence trois paliers d'équilibre acide base (Fig. 4.1). Aux pH acides entre 0 et 2.5 on observe une faible variation de l'absorption à 217 nm tandis que le maximum à 283 nm reste inchangé. Nous attribuons à cette étape un pKa évalué à 1.5 à la transition de la forme d'acide indolinium **A** (Schéma 4.2) entièrement protoné en forme amphionique **B**. Dans l'intervalle des pH compris entre 2.5 et 6, le maximum de 283 nm ($\epsilon = 3400$) est déplacé graduellement à 302 nm ($\epsilon = 3940$) avec un point isosbestique à 265 nm (Fig. 4.1). L'espèce observable à pH 6 est attribuée à la forme d'indoline carboxylate **C**. A partir de la transition spectrale entre **B** et **C**, on détermine pour la forme **B** le pKa 4.75. Un dernier mouvement entre pH 6 et 11.5 est accompagné d'une augmentation de l'absorption à 310 nm ($\epsilon = 5000$) est témoin de la forme catécholate **D**; le pKa du phénol **C** est de 9.42.

Figure 4.1 Détermination des pK par spectroscopie UV.

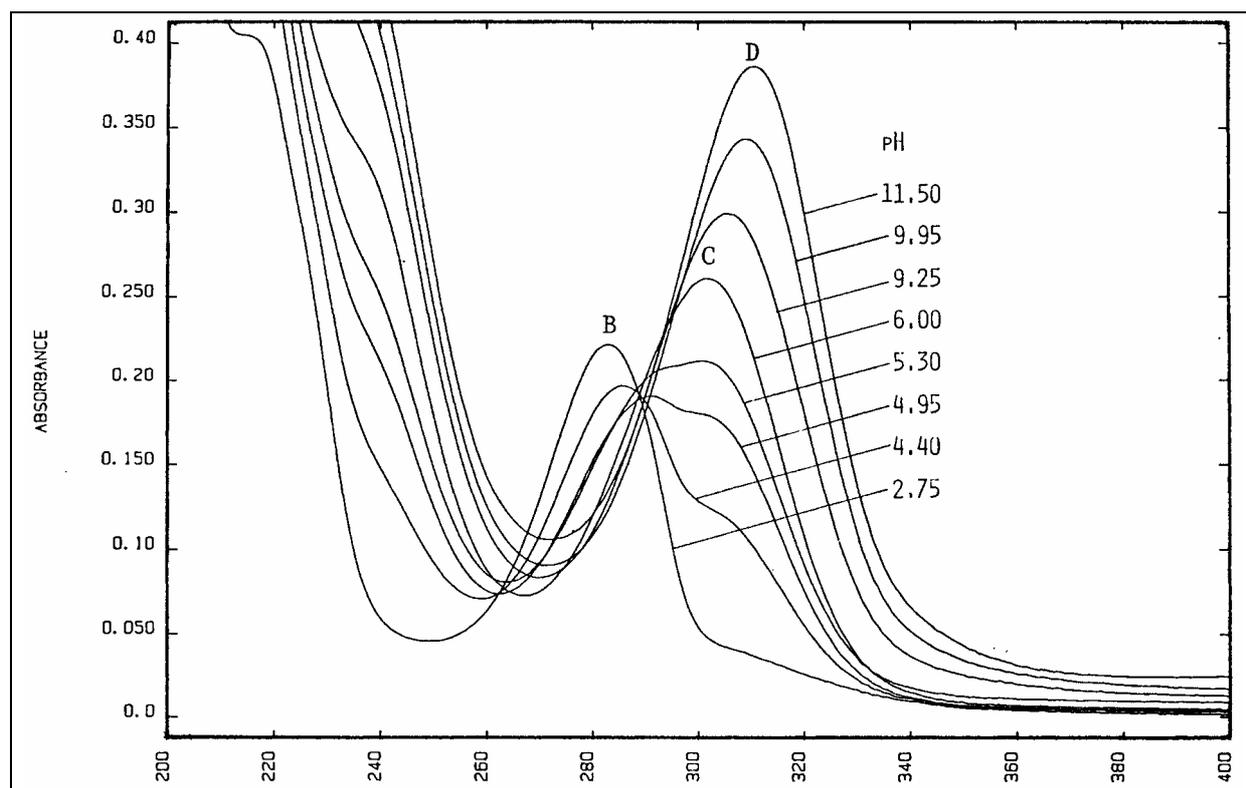
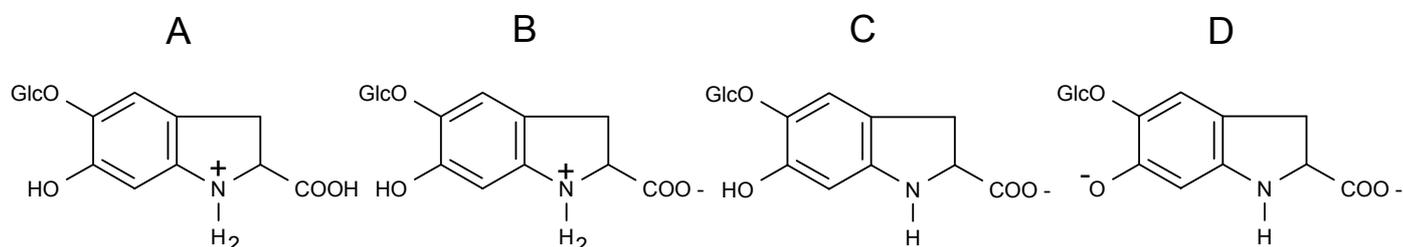


Schéma 4.2. Les différentes formes du CDG en solution en fonction du pH.



Les spectres ^1H -RMN à haute résolution (360 MHz) sont enregistrés dans le TFA et dans le D_2O (Fig. 4.2 et Tab. 4.1).

Les protons du noyau indolinique forment un système du type ABX dont H-C(3 α) à 3.30 ($J = 6.4$ et 16.1), H-C(3 β) à 3.53 ($J = 9.7$ et 16.1, superposé avec des protons de la partie glucosidique) et H-C(2 α) à 4.68 ($J = 6.4$ et 9.7); le couplage fin de 1.9 Hz du H-C(3 β) n'est pas expliqué, *trans* par rapport au groupe carboxylique, il est probablement en relation avec H-C(7) 7.19 ppm, en intensité inférieure au singulet H-C(4) 6.99 ppm. Les multiplets des protons du noyau glucosidique apparaissent tous complexes; le multiplet du proton H(C2'), normalement seulement un doublet, est ici attribué aux

déplacements chimiques très proches des protons glucosidiques (sous l'influence du noyau aromatique) dégénérés par couplage virtuel. Un deuxième système ABX, constitué par les protons CH₂ (3.92 *dd* et 3.76 *dd*) et H-C(5') (3.68 *dd*) du noyau glucosidique se démarque nettement des autres protons de cet hétérocycle.

4.1.4 *Formation du N-formylcyclodopa glucoside.* - L'utilisation d'acide formique dilué comme solvant lors de la chromatographie du CDG entraîne la formation d'un produit parasite. Ce produit se forme lors de l'évaporation lente du solvant ou lors du séjour prolongé en solution. Il précède l'élution du cyclodopa glucoside dans la chromatographie sur échangeur de cations. Le produit, qui exhibe dans le spectre UV de fortes absorptions à 253 ($\epsilon = 11000$) et 305 ($\epsilon = 10500$) nm, se révèle être le N-formyl cyclodopa glucoside.

La structure de dérivé N-formylé du cyclodopa glucoside ressort d'une analyse de son spectre ¹H-RMN (Fig. 4.3 et Tab. 4.1). On note les signaux du proton formyle à bas champ et du proton H-C(2) déblindé sous l'influence du groupe formyle. Ces deux signaux sont dédoublés ce qui est typique de l'existence de deux formes rotamères (Schéma 4.3); on note 8.73 pour le proton formyle de la forme *E* 69 % et 8.31 pour la forme *Z* 31 %. Le proton aromatique H-C(7) sous l'influence du groupe formyle et du noyau aromatique est plus ou moins déblindé; on remarque aussi une petite influence sur les protons H-C(3) *E* 69 % et *Z* 31 %.

Schéma 4.3: Formes rotamères du FCDG et structure de l'indole-glucoside.

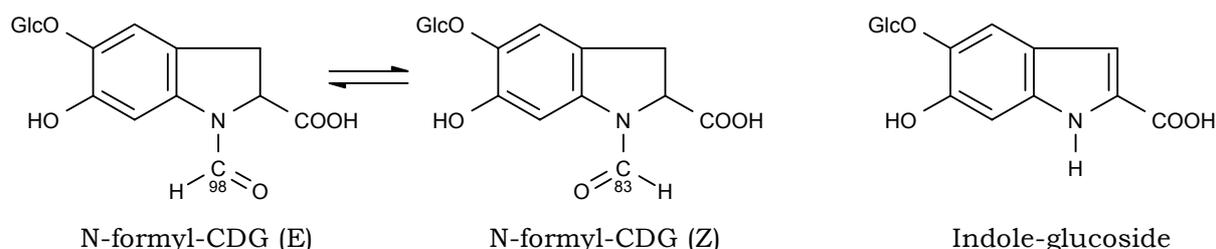


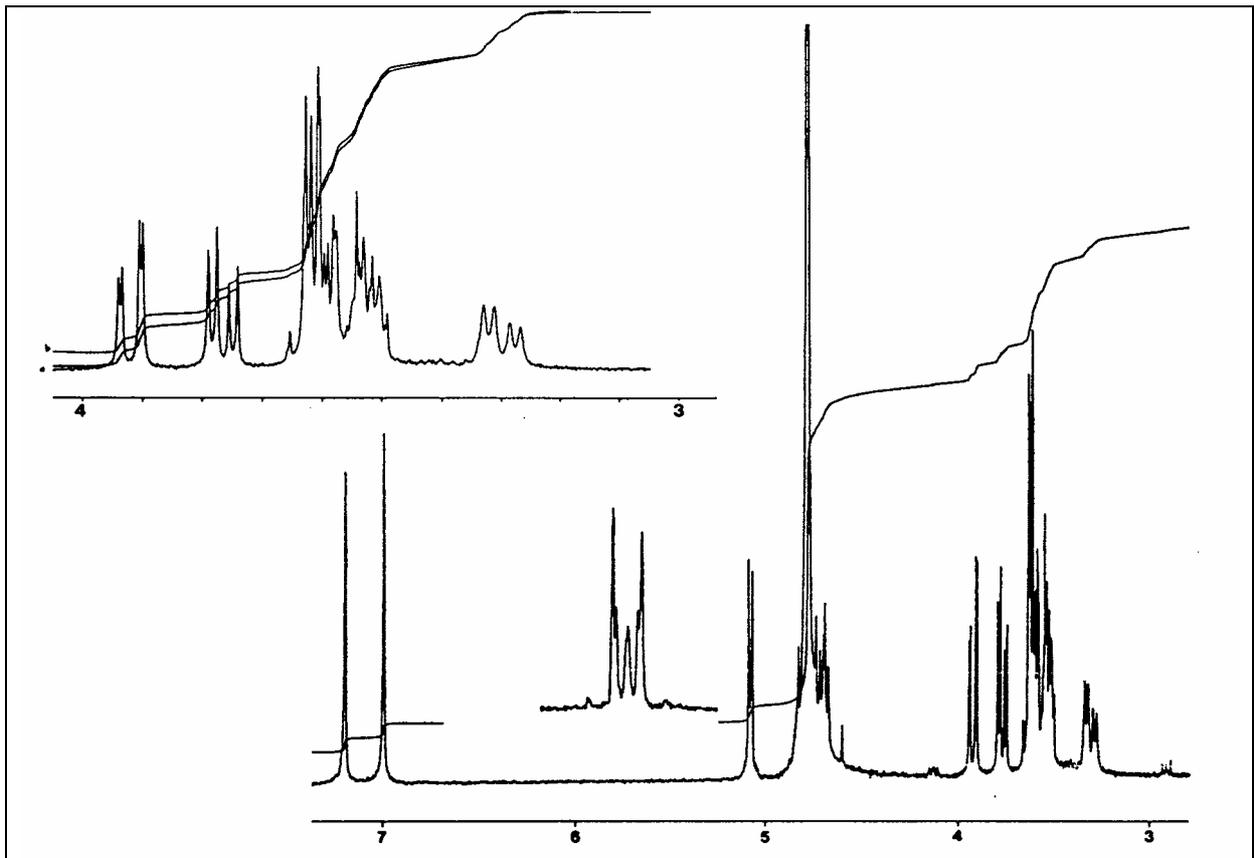
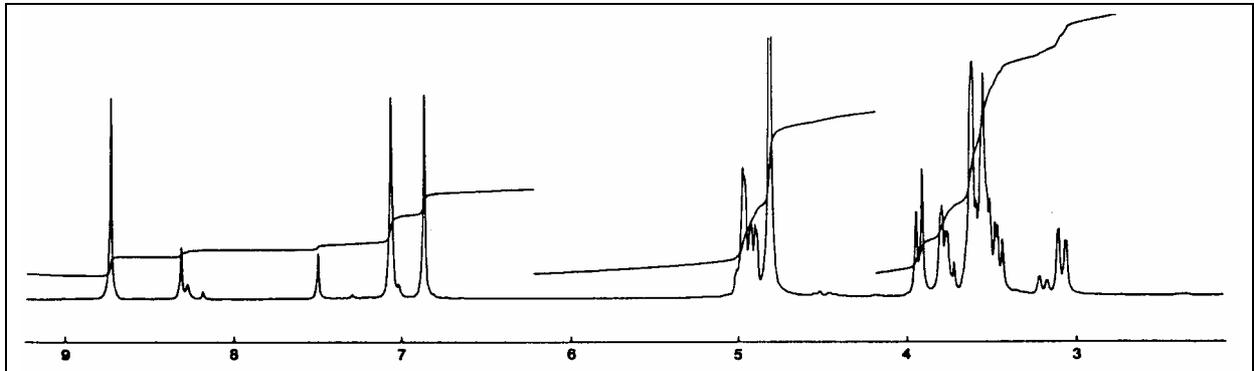
Figure 4.2: Spectre RMN- ^1H à 360 MHz du cyclodopa glucoside.Figure 4.3: Spectre RMN- ^1H à 360 MHz du N-formyl-cyclodopa glucoside.

Tableau 4.1. ¹H-RMN à 360 MHz du cyclodopa glucoside et du N-formyl-cyclodopa glucoside.

Position du proton	cyclodopa glucoside	N-formyl-cyclodopa glucoside	
	solvant D ₂ O	solvant D ₂ O forme E 61 %	solvant D ₂ O forme Z 39%
H-C(2)	4.68 (dd,J(2,3 α)=9.7)	4.91 (dd,J(2,3 α)=11.5)	4.99
H β -C(3)	3.30 (dd,J(2,3 β)=6.4)	3.08 (dd,J(2,3 β)=3.9)	3.19
H α -C(3)	3.53 (ddd,J(3 α ,3 β)=16.1,J(3,4)=1.9)	3.46 (dd,J(3 α ,3 β)=16.2)	3.52
H-C(4)	6.99 (s)	7.06 (s)	7.06 (s)
H-C(7)	7.19 (s)	6.86 (s)	7.50 (s)
H-C=O		8.73 (s)	8.31 (s)
H-C(1')	5.07 (m)	4.96 (m)	4.99 (m)
H-C(2')	3.57-3.66 (m)	3.5-3.7 (m)	3.5-3.7 (m)
H-C(3')	3.57-3.66 (m)	3.5-3.7 (m)	3.5-3.7 (m)
H-C(4')	3.49-3.54 (m)	3.5-3.7 (m)	3.5-3.7 (m)
H-C(5')	3.57-3.66 (m)	3.5-3.7 (m)	3.5-3.7 (m)
HA-C(6')	3.92 (dd,J(5',6'A)=2.3, J(6'A,6'B)=12.4)	3.93 (dd,J(6'A,5')<2,J(6'A,6'B)=12.3)	
HB-C(6')	3.76 (dd,J(5',6'B)=5.3)	3.77 (dd,J(6'B,5')=4.2)	

Par l'expérience nous prouvons que l'indoline dans une solution diluée d'acide formique se transforme effectivement en N-formylindoline. Tandis que la formylation de l'indoline est généralement effectuée par un mélange d'acide formique et d'anhydride acétique ou par chauffage dans le toluène en présence d'acide formique dans des conditions de distillation azéotropique, la formylation par l'acide formique en milieu aqueux, apparemment inconnue, n'est pourtant pas étonnante. Elle peut s'expliquer sur la base des pKa de l'acide formique (3.75) et du ion indolinium (env. 5) très rapprochés. La petite quantité d'amine libre présente à ce pH s'engage dans une réaction d'addition nucléophile avec l'acide formique, réaction conduisant à l'acylation. Une telle réaction est toutefois exclue avec des amines aliphatiques.

Ce travail a fait l'objet d'une publication [57].

4.1.5. *Le cyclodopa glucoside dans les racines de Beta vulgaris L.*: Des travaux précédents avaient mis en évidence la présence du cyclodopa glucoside (CDG) dans les extraits de racines de betteraves rouges. Son isolement accompli moyennant une chromatographie sur échangeur de cations SEPHADEX®, ne se prête pas comme méthode analytique rapide. Les travaux biosynthétiques envisagés exigent de plus une méthode suffisamment sensible pour repérer d'éventuelles petites quantités de ce métabolite.

L'examen de quelques échantillons de betterave rouge nous montre que le réservoir du cyclodopa glucoside peut être assez important, mais varie avec l'âge de la plante (Tab. 4.2). Dans une jeune plante de 2 mois on trouve une quantité de CDG presque équivalente à celle du colorant bétanine. Dans la plante mûre commercialisée le réservoir est beaucoup plus petit.

Tableau 4.2: CDG, acide bétalamique et bétanine dans des racines de *Beta vulgaris*

<i>Beta vulgaris</i>	racines jeunes		racines âgées	
	exp 1	exp 2	exp 3	exp 4
âge (jours)	20	30	135	180
poids de la racine (g PF)	2.68	23	127.5	239
métabolite	nmol/g PF	nmol/g PF	nmol/g PF	nmol/g PF
CDG	1960	360	160	149
acide bétalamique	360	190	NM	65
bétanine	4100	760	1100	429
rapport CDG/bétanine	0.49	0.47	0.15	0.35
ac. bétalamique/bétanine	0.09	0.25	NM	0.15

La teneur élevée en CDG trouvée dans des cultures de cellules de betteraves rouge *in vitro* nous a permis d'approfondir l'étude biosynthétique du CDG relativement à ses précurseurs tyrosine et dopa.

4.2. La dopamine.

Lors de la chromatographie HPLC des extraits de *Beta vulgaris*, un pic d'une ampleur considérable et exceptionnellement large (temps de rétention 19 min, Chap. 3, Fig. 3.1) a retenu notre attention. Le maximum d'absorbance de la fraction isolée par HPLC analytique est de 280 nm en solution aqueuse acide et se déplace à 296 nm en milieu alcalin. L'isolement du métabolite majoritaire est réalisé à partir de suspensions cellulaires de *Beta vulgaris*, extraites en milieu aqueux acidifié (pour éviter l'action des enzymes). L'extrait est chromatographié sur une colonne HPLC semi-préparative en phase inverse (RP-18). Le pic principal, détecté à 280 nm est collecté, puis purifié par HPLC analytique (RP-18). L'identification de la dopamine a été confirmée par ^1H -RMN, spectrométrie de masse, spectroscopie UV et par analyse HPLC (Exp. chap. 7). La comparaison des spectres du produit naturel et de la dopamine commerciale (FLUKA) confirment l'identité du produit naturel: dopamine.

Remarque: Les étapes clef de la biosynthèse de la dopamine sont les suivantes: la tyrosine est hydroxylée par la polyphénoloxydase en dopa; dopa est alors décarboxylé en dopamine par la dopa-décarboxylase. L'identité du produit naturel et du métabolite radioactif principal produit lors de l'incubation de suspensions cellulaires de *Beta vulgaris* avec dopa-3- ^{14}C et tyrosine- ^3H sera confirmée par cochromatographie de la dopamine avec l'échantillon radioactif.

5. Incubation de tyrosine-¹⁴C et dopa-¹⁴C avec de jeunes racines de *Beta vulgaris* L.

Le motif de notre étude était de mettre en évidence le cyclodopa glucoside comme intermédiaire biosynthétique formé entre dopa et la bétanine sous la forme de sa partie dihydroindolique. Le cyclodopa glucoside n'avait jamais été isolé sous forme libre en tant qu'intermédiaire.

Une seconde expérience avait comme objectif de mesurer la répartition de l'incorporation de la tyrosine radioactive dans la partie dihydroindolique, respectivement la partie dihydropyridinique de la bétanine.

5.1. Incubation avec les précurseurs radioactifs.

Une jeune racine de *Beta vulgaris* L. est prélevée intacte, avec les feuilles, en pleine terre chez un cultivateur local. La racine est lavée, puis incubée durant 6 heures dans une solution tampon contenant le précurseur radioactif. Après incubation avec le précurseur radioactif dopa-¹⁴C, respectivement tyrosine-¹⁴C, la racine est lavée, séparée des feuilles et extraite par broyage mécanique dans une solution aqueuse acide (pH 2.5) à 4°C afin de minimiser les activités enzymatiques. L'extrait concentré est analysé quant à sa teneur en bétanine, en CDG et en acide bétalamique. La radioactivité présente dans les prélèvements effectués initialement, après 6 heures d'incubation et dans l'extrait aqueux est mesurée par comptage en scintillation liquide.

Isolement des métabolites: - L'extrait est chromatographié sur un support échangeur de cations, Sephadex SP-C-25 (H⁺) et l'effluent de la colonne est contrôlé à 280 nm. Les acides et les produits neutres sont élués les premiers, puis suivent dans l'ordre, l'acide bétalamique (jaune pâle), la bétanine (rouge) et le cyclodopa glucoside. La concentration des métabolites est déterminée par spectrophotométrie UV-Vis et la radioactivité spécifique mesurée par comptage en scintillation liquide.

Détermination de la répartition de la radioactivité dans la bétanine:

- la bétanine est purifiée par électrophorèse sur colonne de cellulose. La

fraction contenant le pigment est purifiée une seconde fois par chromatographie HPLC semi-préparative en phase inverse (RP-18). La radioactivité spécifique du pigment pur est déterminée.

Réaction d'échange: selon la procédure décrite par [6], la bétanine est clivée en l'absence d'oxygène dans une solution de NH_4OH 1N, en présence d'un excès de proline (Chap. 4, schéma 4.1). L'échange du cyclodopa glucoside et de la proline est complet après une heure de réaction à température ambiante. La solution d'ammoniaque est éliminée par lyophilisation et le résidu mis en solution aqueuse à pH 3. L'indicaxanthine formée lors de la réaction d'échange est séparée du cyclodopa glucoside et de la proline par chromatographie échangeuse de cations (Sephadex® SP-C-25 (H^+)). Les radioactivités spécifiques du cyclodopa glucoside et de l'indicaxanthine sont déterminées par spectrophotométrie UV-Vis (nmol/ml) et par comptage en scintillation liquide (dpm/ml).

5.2. Incorporation de dopa-2-¹⁴C.

L'absorption du précurseur après 6 heures d'incubation représente 16.5 % (3.7 μmol) de la radioactivité initiale de dopa-¹⁴C (Tab. 5.1). La radioactivité extraite de la racine représente 3.9 % de la radioactivité initiale, respectivement 24 % de la radioactivité absorbée en 6 heures. Les résultats des incorporations dans la racine et de l'internalisation des précurseurs dans les métabolites isolés seront présentés en % de la radioactivité extraite de la racine.

Trois produits ont été isolés à partir de l'extrait: le cyclodopa glucoside, l'acide bétalamique et la bétanine. Les radioactivités spécifiques (dpm/mol) et les concentrations cellulaires (nmol/g PF) de ces métabolites sont compilées dans le Tab. 5.1.

Tableau 5.1: Internalisation de dopa-2-¹⁴C dans la racine et répartition dans les métabolites.

Incubation	radioactivité ¹⁾ en dpm x 10 ⁶	précurseur ²⁾ en mol x 10 ⁻⁶	¹⁾ et ²⁾ en % de t ₀
radioactivité initiale t ₀	221.6	22.18	100.0
radioactivité finale t _{6h}	184.9	18.51	83.5
différence t ₀ - t _{6h}	36.7	3.67	16.5
radioactivité soluble	8.69	0.87	3.92
Métabolites	Radioactivité des fractions		
	[dpm x 10 ⁶]	% de l'extrait total	radioactivité spécifique [dpm/mol]
extrait chromatographié	2.05 *	100.0 *	1000 x 10 ¹⁰ **
cyclodopa glucoside	0.064	3.1	1.6 x 10 ¹⁰
acide bétalamique	0.145	7.1	37.4 x 10 ¹⁰
bétanine	0.143	7.0	9.1 x 10 ¹⁰

* activité initiale placée sur la colonne de Sephadex[®] ** radioactivité spécifique de dopa-2-¹⁴C

Résultats et discussion. - Le cyclodopa glucoside est présent en quantité relativement élevée dans la racine. En effet, sa concentration représente près de la moitié de celle du pigment principal, la bétanine. Les concentrations des trois métabolites de la dopa, déterminées après séparation sur l'échangeur d'ions sont de 470 nmol/g PF pour la bétanine (1350 nmol/g PF pour les bétacyanes totales), 370 nmol/g PF pour le CDG et 110 nmol/g PF pour l'acide bétalamique.

L'incorporation dans le CDG est remarquable, puisqu'elle représente plus de 3 % de l'activité totale extraite. L'incorporation dans l'acide bétalamique et dans la bétanine est semblable, 7 %. La majorité de la radioactivité reste sur la colonne; l'ensemble de l'activité collectée ne représente que 27 % de l'activité initialement placée sur cette dernière. Les métabolites non élués sont les acides aminés et les amines primaires dont l'amine est protonée à pH 2.5. L'éluant utilisé est relativement acide et ces métabolites restent fixés sous forme de cation sur l'échangeur d'ions. Comme la majeure partie de l'activité est représentée par le précurseur lui-même et comme nous le verrons plus loin, par la dopamine, la plus grande partie de la radioactivité présente dans l'extrait est piégée sur l'échangeur d'ions. Pour éluer ces

substances de l'échangeur de cations fort, il faudrait travailler à des pH légèrement alcalins, ce qui provoquerait en présence d'oxygène, une oxydation rapide et irréversible des catécholamines (dopa et dopamine en particulier). Nous n'avons pas essayé d'isoler ces métabolites dans cette expérience préliminaire car notre but était d'isoler le cyclodopa glucoside pour démontrer son rôle d'intermédiaire dans la biosynthèse de la partie dihydroindole (partie supérieure) de la bétanine.

Le CDG est présent en quantité nettement plus importante que l'acide bétalamique. La radioactivité spécifique de l'acide bétalamique est beaucoup plus élevée que celle du CDG (23 x) et de la bétanine (4 x). Le rapport CDG/acide bétalamique 1/23 correspond bien aux rapports d'incorporation des parties supérieure et inférieure de la bétanine cités dans la littérature entre 1/10 et 1/20 [14]

La détermination de la spécificité de l'incorporation dans les métabolites n'a pas été effectuée avec le précurseur dopa-¹⁴C, car le marquage en position C(2) et la durée d'incubation relativement courte rendent l'hypothèse d'une incorporation au hasard improbable. En effet, les réactions attendues sur un acide aminé sont la décarboxylation et la désamination. La première réaction touche uniquement le C(1) et la deuxième, si elle avait lieu sur la dopa, conduirait aux acides phénylpropénoïques. Cette dernière réaction n'est pas mise en évidence dans la littérature. En effet, l'acide cafféique (acide 3,4-dihydroxyphénylpropénoïque) est synthétisé par les cellules par hydroxylation enzymatique (acide cinnamique-4-hydroxylase) de l'acide p-coumarique qui provient de la tyrosine [58]. Une dégradation plus poussée de la chaîne latérale a été mise en évidence par [59] où la dopamine est désaminée en acide dihydroxyphénylacétique, puis ce dernier est décarboxylé pour former l'acide dihydroxybenzoïque. Ces dernières transformations n'ont pas été mises en évidence chez *Beta vulgaris* mais, la présence des glucosides phénoliques et glucosyls esters des acides 3-méthoxy-4-hydroxybenzoïque et phénylacétique, n'excluent pas qu'une petite partie du substrat radioactif (dopa) ait suivi un chemin métabolique conduisant à la dégradation de la chaîne latérale. Pour étayer ces

hypothèses, une étude comparative du métabolisme de la tyrosine et de la phénylalanine en relation avec la biosynthèse des acides phénylacétiques [60] montre que pour des durées d'incubation de 24 h, l'incorporation dans l'acide p-hydroxyphénylacétique et p-hydroxybenzoïque est comprise entre 0.1 et 1 % ; les métabolites majoritaires sont les produits de décarboxylation, phenyléthylamine et 3-hydroxyphenyléthylamine (tyramine), qui représentent 75 % de l'activité soluble.

L'incorporation non spécifique dans la bétanine et l'indicaxanthine isolés à partir de fruits de cactus incubés avec de la dopa ou de la tyrosine radioactives est comprise entre 0 et 4 % de l'activité totale des pigments; de même l'incorporation dans la partie β -D-glucopyranoside de la bétanine est faible dans ces fruits [6]. Nous en concluons qu'avec un marquage en position C(2) et une durée d'incubation de 6 h., l'activité incorporée dans le CDG est de nature spécifique.

En conclusion, avec une incorporation de 3.1 % de la radioactivité soluble et une radioactivité spécifique 5 à 6 fois inférieure à celle de la bétanine, le cyclodopa glucoside peut être considéré comme un intermédiaire biosynthétique à part entière.

5.3. Incorporation de tyrosine-3-¹⁴C.

Dans cette expérience, seule la bétanine a été isolée. Les conditions d'incubations de la racine sont sensiblement les mêmes que dans l'expérience précédente, à l'exception de l'âge et de la taille de la racine.

Résultats et discussion. - L'incorporation relative de la tyrosine-3-¹⁴C dans la bétanine (0.58 %, Tab. 5.2) est nettement inférieure à celle observée à partir de dopa-2-¹⁴C (7 %, Tab. 5.1). Il faut cependant remarquer que la racine utilisée dans cette expérience est plus âgée (4.5 mois) et pèse 128 g au moment de l'expérience alors que dans l'expérience avec dopa-¹⁴C, la racine n'est âgée que de 1.5 mois et pèse 8.7 g. Les incorporations relatives des deux expériences ne sont pas directement comparables dans les conditions expérimentales choisies.

Tableau 5.2: Internalisation de tyrosine-3-¹⁴C dans la racine et répartition dans la bétanine.

Incubation	radioactivité ¹⁾ en dpm x 10 ⁶	précurseur ²⁾ en mol x 10 ⁻⁶	1) et 2) en % de t ₀	
activité initiale t ₀	855.9	8.93	100.0	
activité finale t _{6h}	738.8	7.71	86.3	
différence t ₀ - t _{6h}	117.1	1.22	13.7	
activité soluble	1.52	0.0146	0.18	
métabolites	concentration	----- radioactivité-----		
	en nmol/g PF	en dpm x 10 ⁶	en % de l'extrait total **	spécifique dpm/mol
extrait		1.52**	100.0**	1.04 x 10 ¹⁴ *
bétanine	1100	0.087	0.58	6.9 x 10 ⁸
cyclodopa glucoside	210	NM	NM	NM
<u>Réaction d'échange:</u>				
cyclodopa glucoside <small>bétanine</small>				2.0 x 10 ⁸
Indicaxanthine <small>bétanine</small>				7.2 x 10 ⁸
Rapport		CDG / acide bétalamique		1 / 3.6

* radioactivité spécifique de tyrosine-3-¹⁴C ** activité initiale placée sur la colonne de Sephadex®
NM: non mesuré

La concentration de cyclodopa glucoside a été déterminée par HPLC analytique et représente 210 nmol/g PF. Pour la bétanine on mesure 1100 nmol/g PF. Le rapport des concentrations de CDG/bétanine est de 0.2. L'acide bétalamique, présent en traces n'a pas été quantifié.

L'incorporation dans la partie cyclodopa glucoside de la bétanine est plus importante que celle observée avec dopa comme précurseur; en effet, le rapport entre les radioactivités spécifiques des parties supérieure et inférieure de la bétanine est de 1/3.7 ce qui va dans la même direction que les valeurs indiquées dans la littérature [16]. Liebis [15] trouve par contre un rapport d'incorporation encore plus élevé 2/1 entre les parties supérieure et inférieure de la bétanine chez *Beta vulgaris* dans des conditions expérimentales différentes.

Ces valeurs expérimentales élevées de l'incorporation dans la partie supérieure de la bétanine paraissent surprenantes lorsqu'on les compare au rapport mesuré avec dopa comme précurseur: entre 1/10 et 1/20 chez *Opuntia* et *Beta vulgaris* [14].

5.4. Premières conclusions et questions ouvertes.

Le cyclodopa glucoside est un intermédiaire sur la voie biosynthétique conduisant de la dopa à la partie dihydroindole de la bétanine. Ce produit naturel du métabolisme secondaire est présent en quantité relativement importante, en particulier dans les racines jeunes. En donnant comme précurseur la tyrosine, nous constatons que la répartition du marquage dans la bétanine est différente de celle qui est mentionnée dans la littérature pour l'incorporation de dopa dans le pigment [Chap. 5.2 et 5.3].

Les questions qui apparaissent après ces expériences préliminaires sont les suivantes:

- le CDG libre est-il produit de manière semblable à partir des deux précurseurs: tyrosine et dopa ?
- la voie biosynthétique est-elle linéaire (par exemple: tyrosine → dopa → cyclodopa glucoside → bétanine) ou existe-t-il plusieurs voies d'accès au CDG ?
- pourquoi ces différences de rapport d'incorporation entre les parties supérieure et inférieure de la bétanine lorsque tyrosine ou dopa sont administrés comme précurseurs ?
- les différences observées sont-elle liées aux conditions d'incubation avec les précurseurs ou à des phénomènes de compartimentation en relation avec les différences de taille entre racines ?

Ce type d'expérience ne permettant pas de répondre à toutes ces questions, nous nous sommes tourné vers des cultures de cellules en suspension pour éviter les inconvénients liés aux variations saisonnières et à des âges physiologiques différents des racines.

6. Analyse compartimentale.

6.1. Introduction.

Les études précédentes ont établi que les deux parties constituant la bétanine dérivent formellement du même précurseur, la dopa. Une certaine réserve est de mise quant à cette origine commune car la répartition du marquage entre le cyclodopa glucoside et l'acide bétalamique, n'est pas la même avec la dopa ou avec la tyrosine comme précurseurs. Le schéma biosynthétique doit être affiné pour différencier l'incorporation de la dopa directement importée de celle de la dopa générée dans les cultures de betteraves rouges à partir de la tyrosine internalisée.

Notre premier objectif est d'effectuer des analyses compartimentales séparément pour la tyrosine et pour la dopa, c'est-à-dire d'enregistrer leur internalisation et de noter le comportement cinétique des métabolites qui en découlent. Les cinétiques pourraient relever d'éventuelles divergences et constituer la base d'un modèle mathématique rationnel [61].

Sur le plan expérimental il s'agit de mettre au point des procédures permettant d'établir la cinétique globale d'incorporation. L'internalisation du précurseur dans les cellules est notée en mesurant la disparition du traceur dans le milieu nutritif à l'aide de prises d'échantillons. La cinétique d'incorporation du marquage dans les métabolites à l'intérieur du système implique une procédure plus laborieuse car le prélèvement périodique d'échantillons de cellules de taille adéquate sans perturber le développement de la culture est difficile à réaliser. Nous avons préféré fractionner l'étude cinétique sur plusieurs essais uniques chacun d'une durée déterminée avec des charges cellulaires identiques. Néanmoins cela restreint pour des raisons d'ordre technique le nombre de points de mesure disponibles à l'analyse cinétique.

6.2. La procédure expérimentale.

La taille des cultures maniable nous a amené à subdiviser un inoculum unique de *Beta vulgaris* en portions d'environ 2 g de cellules et de les transférer dans 100 ml de milieu frais. La croissance conduit en 3 jours à des biomasses d'environ 5 g de poids frais. Un total de six charges est ainsi disponible pour des incubations individuelles avec le traceur. Nous en réservons trois pour les incubations avec chaque précurseur, tyrosine-3-¹⁴C ou dopa-3-¹⁴C (Tab. 6.1), qui se prêtent à des essais d'une durée de 30, 60 et 180 min^(*). On mesure la radioactivité du précurseur dans le milieu, au début et à la fin de chaque essai (dans le filtrat et l'eau de lavage); ces mesures sont rapportées dans le Tab. 6.1 sous forme de quantités molaires de précurseur radioactif, calculées sur la base de la radioactivité spécifique du précurseur ajouté. Les données sont aussi exprimées dans les colonnes hachurées en pourcentage de la quantité de traceur initial. La différence des mesures initiales et finales correspond à la totalité de précurseur radioactif internalisé; la partie disponible pour l'incorporation dans les métabolites est encore diminuée de la fraction qui se fixe dans les débris cellulaires.

Des aliquotes de l'extrait des cellules sont soumis à la séparation par HPLC d'où on retire la répartition centésimale de la radioactivité dans les divers métabolites. Nous présentons les valeurs moyennes de la répartition centésimale (Tab. 6.2) obtenues à partir des mesures par HPLC effectuées à plusieurs reprises sur des extraits conservés à l'état congelé (Exp. chap. 8.3).

La détermination des activités spécifiques se base sur une mesure du réservoir des métabolites qui est obtenue pour la tyrosine, la dopa et la dopamine directement lors de l'HPLC par intégration de la traçante spectroscopique à 280 nm. Celles de la tyramine et du cyclodopa glucoside, présentes en très faible quantité, aussi bien que de la bétanine sont déterminés par spectroscopie et scintillation liquide des échantillons purifiés et concentrés.

(*) D'après un essai préalable il n'a pas paru utile d'appliquer des temps d'incubation inférieurs à 30 min. D'autre part l'incubation ne pouvait se prolonger au-delà d'une certaine période sans changement trop importants dans le milieu accompagnant la croissance des cultures.

Tableau 6.1. Internalisation des précurseurs.

précurseur	tyrosine-3-¹⁴C						dopa-3-¹⁴C					
radioactivité spécifique	104.4 *10 ¹² dpm/mol						106.5 *10 ¹² dpm/mol					
Disposition des expériences												
temps total d'incubation	33 min	66 min	180 min	30 min	65 min	180 min						
poids frais des cultures	4.61 g	5.00 g	5.45 g	5.25 g	5.35 g	4.13 g						
poids des débris cellulaires	0.136 g	0.144 g	0.164 g	0.153 g	0.174 g	0.127 g						
volume du milieu nutritif	102.5 ml	89 ml	84 ml	99.5 ml	108 ml	102 ml						
Précurseur radioactif dans le milieu												
mols et quantités relatives	nmol	%	nmol	%	nmol	%	nmol	%	nmol	%	nmol	%
2 min après l'ajout des précurseurs	4999	100	5019	100	4890	100	4607	100	4862	100	4597	100
à la fin de l'incubation	3670	73.4	2734	54.5	1436	29.4	3637	78.9	3190	65.6	1704	37.1
Différence (internalisée)	1329	26.6	2285	45.5	3455	70.6	970	21.1	1672	34.4	2893	62.9
Précurseur radioactif dans les cultures												
mols et quantités relatives	nmol	%	nmol	%	nmol	%	nmol	%	nmol	%	nmol	%
dans l'extrait des cellules	1122	22.4	1809	36.0	2637	53.9	699	15.2	1428	29.4	2455	53.4
dans les débris cellulaires	168	3.4	379	7.6	649	13.3	100	2.2	239	4.9	224	4.9

Tableau 6.2. Répartition centésimale du précurseur radioactif sur les métabolites de l'extrait et dans la bétanine.

précurseur	tyrosine-3-¹⁴C			dopa-3-¹⁴C		
Répartition sur les métabolites (en % de la radioactivité totale de l'extrait)						
temps d'incubation	33 min	66 min	180 min	30 min	65 min	180 min
tyrosine	21.9	14.4	2.3	-	-	-
tyramine	10.4	8.6	6.3	-	-	-
dopa	9.6	5.8	3	11.6	9.1	4.6
dopamine	44.9	55.9	60.9	79.6	71.9	78.6
cyclodopa glucoside	3.3	3	3.6	1.9	1.8	2.5
bétanine	2.3	2.1	5.1	3.7	2.5	4.2
total	92.4	89.8	81.2	96.8	85.3	89.9
Répartition dans la bétanine (en %)						
partie cyclodopa glucoside	15	24	19	10	16	18
partie acide bétalamique	85	76	81	90	84	82

Pour connaître la répartition de la radioactivité dans le colorant, dont les deux parties sont issues de voies métaboliques différentes, la bétanine purifiée est dissociée dans des conditions alcalines en ses deux entités, le cyclodopa glucoside et l'acide bétalamique; ce dernier, en présence de la proline dans des conditions neutres, est transformé en indicaxanthine. Le rapport des radioactivités dans les deux produits correspond à la répartition de la radioactivité dans la bétanine.

6.3. Appréciation des résultats.

a) La répartition centésimale dans les métabolites. - Les changements dans le temps de la répartition centésimale de la radioactivité dans les métabolites Tab. 6.2 permettent des conclusions préliminaires sur le caractère des métabolites. On voit la part de la tyrosine et de la dopa internalisés diminuer rapidement, plus dans le cas de la tyrosine que dans celui de la dopa, ce qui caractérise ces produits comme intermédiaires. Cela s'explique par l'affaiblissement du flux d'internalisation et par l'écoulement rapide dans les compartiments respectifs. L'évolution de dopa interne en fonction du temps est semblable avec les deux précurseurs, tyrosine ou dopa.

La part des autres métabolites augmente constamment et correspond à des compartiments à caractère terminal. Le compartiment dopamine reçoit "la part du lion", environ 50% de la radioactivité originale avec la tyrosine et 80% avec la dopa comme précurseur. En revanche cyclodopa glucoside et bétanine ne contiennent que 1.5 à 5% de précurseur actif. Il se confirme, d'une part que le pourcentage de précurseur retrouvé dans le cyclodopa glucoside est plus élevé dans le cas de l'expérience avec la tyrosine que dans le cas avec la dopa, et il paraît, d'autre part que la bétanine est mieux servie par la dopa comme précurseur que par la tyrosine pour les valeurs à 30 et à 60 min, mais pas à 180 min. On remarque cependant l'absence de l'acide bétalamique dans la zone appropriée en HPLC ou du moins en quantité inférieure au seuil mesurable.

Les profils chromatographiques en UV à 280 nm et les tracés radiochromatographiques du ^{14}C sont présentés pour les différents temps

d'incubation dans la figure 6.1 précurseur tyrosine-3-¹⁴C et la figure 6.2 précurseur dopa-3-¹⁴C. Les analyses présentées correspondent à la méthode C développée pour optimiser la sensibilité du comptage de la radioactivité en flux continu (voir partie expérimentale).

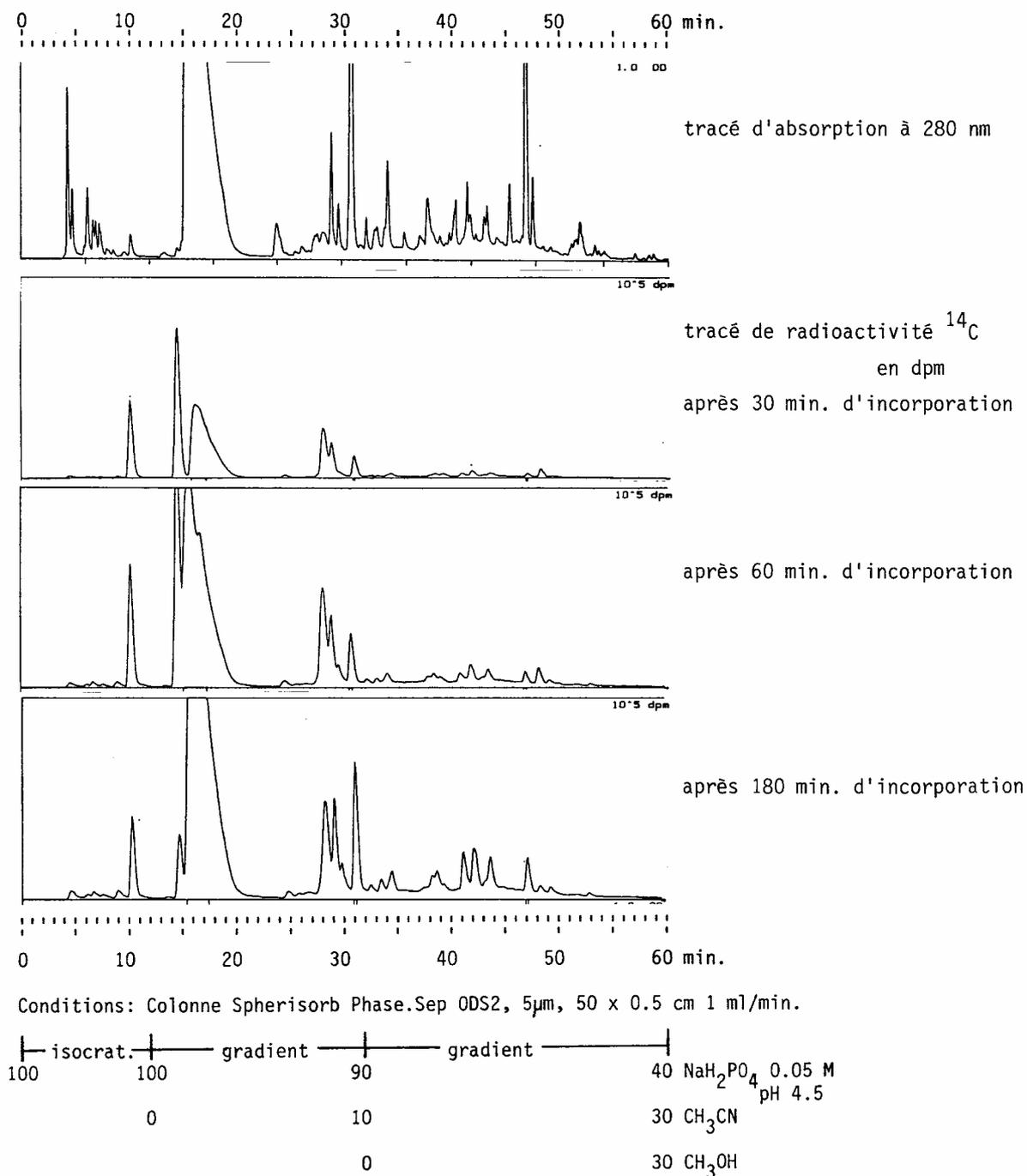
b) Evolution des radioactivités spécifiques. - Les radioactivités spécifiques ont été reconnues très tôt comme critère d'une séquence biosynthétique. Leur mesure à partir des produits isolés et purifiés est indispensable surtout dans les cas où une étude de cinétique ne peut s'appliquer [62], ce qui la rend indépendante d'une saisie quantitative des radioactivités internalisées et incorporées.

L'évolution des radioactivités spécifiques au cours du temps (Tab. 6.3) caractérise tyrosine et dopa comme produits intermédiaires: croissance initiale suivie d'une décroissance, qui est témoin de l'écoulement de la radioactivité internalisée dans le réservoir de ces métabolites. L'augmentation continue des radioactivités spécifiques dans le cas de tous les autres produits montre un caractère terminal. La faible radioactivité spécifique atteinte dans la dopamine est une conséquence de la taille extraordinaire du réservoir de ce métabolite. On constate que les rapports des radioactivités spécifiques dans les deux parties constituant la bétanine sont nettement différents pour les deux précurseurs tyrosine ou dopa.

Tab. 6.3: radioactivités spécifiques des métabolites.

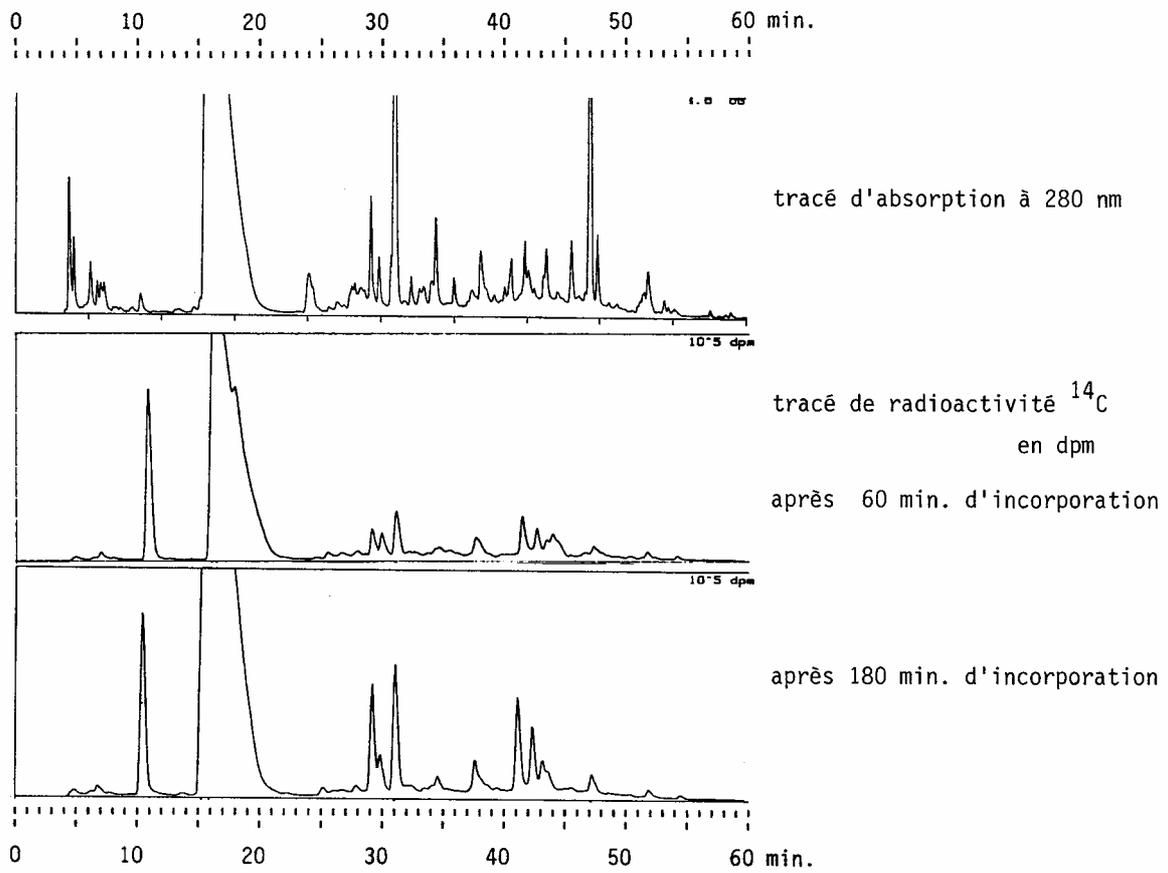
Radioactivités spécifiques	tyrosine-3- ¹⁴ C			dopa-3- ¹⁴ C			
	en dpm x 10 ¹² /mol	33 min	66 min	180 min	30 min	65 min	180 min
tyrosine		33.7	57.7	23.4	0	0	0
tyramine (tracé UV trop faible)		---	---	---	0	0	0
dopa		23	32.9	23.1	21.1	33.5	21.6
dopamine		0.88	1.68	3.1	1.36	1.8	4
cyclodopa glucoside		1.21	2.15	4.1	0.53	1.62	2.53
bétanine		1.47	2.2	5.7	1.24	1.59	4.91
bétanine-partie CDG		0.17	0.37	0.87	0.09	0.2	0.61
bétanine-partie ac.bétalamique		0.98	1.2	3.72	0.8	1.06	2.88
bétanine		1.12	1.58	4.5	0.94	1.25	3.64

Figure 6.1: Incorporation de la tyrosine-3- ^{14}C dans les cultures de *Beta vulgaris*. Durées d'incubation présentées: 30, 60 et 180 min. Chromatographie des extraits par HPLC en phase inverse.



Attribution des pics selon Fig 3.2, p.21

Figure 6.2: Incorporation de la dopa-3- ^{14}C dans les cultures de *Beta vulgaris*. Durées d'incubation présentées: 60 et 180 min. Chromatographie des extraits par HPLC en phase inverse.



Attribution des pics selon Fig 3.2, p.21

Un critère important d'efficacité d'un précurseur est le paramètre sans dimension appelé biodilution [62, 63], c'est-à-dire le rapport des radioactivités spécifiques précurseur/métabolite. Une relation quantitative a été formulée en 1943 par Zilversmit [64] déjà pour le cas d'un état stationnaire correspondant au maintien d'une concentration constante du précurseur durant le temps d'observation. Ces conditions ne sont pas remplies dans le cas de notre expérience où la décroissance du flux d'internalisation (l'épuisement) devient sensible. L'interprétation des valeurs de biodilution, dans notre cas, ne peut donner qu'une indication qualitative dans la comparaison des deux précurseurs.

Les biodilutions (Tab. 6.4.) dans les compartiments tyrosine et dopa diminuent avec le temps d'incubation et augmentent lorsque l'afflux du précurseur s'affaiblit, ce qui correspond au caractère d'écoulement d'un métabolite intermédiaire. Les biodilutions dopa → cyclodopa glucoside sont plus élevées que celles notées pour tyrosine → cyclodopa glucoside et la même tendance se manifeste pour les transformations correspondantes en bétanine(cdg). Considérant cependant le rapport des biodilutions bétanine(cdg) : bétanine(ab) on constate qu'il change au cours du temps pour rejoindre finalement les mêmes proportions pour tyrosine et dopa; (pour tyrosine précurseur le rapport bétanine(cdg)/bétanine(ab) varie de 15:85, 24:76 à 19:81, et pour dopa précurseur de 10:90, 15:84, à 18:82). Ce résultat semble indiquer un effet cinétique.

Tableau 6.4: Biodilutions.

As (précurseur) / As (métabolite)

Précurseur:	tyrosine			dopa		
min. incubation	33	66	180	30	65	180
tyrosine interne	3.1	1.8	4.4	-	-	-
dopa interne	4.5	3.2	4.5	5	3.1	4.8
dopamine	119	62	33	77	58	26
cyclodopa glucoside	86	48	25	197	64	41
bétanine (cdg)	613	282	120	1163	523	171
bétanine (ab)	106	87	28	130	98	36

c) Concernant l'analyse cinétique.- Evidemment les points de mesure d'internalisation *Tab. 6.1* émanant d'essais individuels sont assortis d'une incertitude liée aux variations expérimentales de trois paramètres: la quantité molaire de précurseur radioactif ajouté, le poids de cellules (4.13 - 5.45 g) et le volume du milieu nutritif (84 -108 ml). Vu une certaine dispersion des variables inhérentes à la méthode, l'étude cinétique paraît sujette à caution.

Une normalisation des valeurs expérimentales où l'on réfère tout à la quantité molaire de traceur initial comme unité (0.01 x pourcentage, *Tab. 6.1*) permet de réduire l'imprécision inhérente aux conditions expérimentales. Le calcul des fractions molaires de précurseur incorporé dans les métabolites - le degré d'incorporation *Tab. 6.5* - est basé sur la répartition centésimale *Tab. 6.2* que l'on multiplie par la fraction de précurseur internalisé disponible (c'est-à-dire fraction du précurseur internalisé moins celle fixée dans les débris cellulaires; *Tab. 6.1*). Le degré d'incorporation constitue la base de l'analyse cinétique.

Tableau 6.5. Degré d'incorporation du précurseur radioactif.

précurseur	tyrosine-3- ¹⁴ C			dopa-3- ¹⁴ C		
	33 min	66 min	180 min	30 min	65 min	180 min
précurseur externe	0.734	0.545	0.294	0.789	0.656	0.371
parois	0.0340	0.0760	0.1330	0.022	0.049	0.049
tyrosine	0.0508	0.0546	0.0132	-	-	-
tyramine	0.0241	0.0326	0.0361	-	-	-
dopa	0.0223	0.0220	0.0172	0.0219	0.0268	0.0267
dopamine	0.1042	0.2119	0.3490	0.1504	0.2121	0.4559
cyclodopa glucoside	0.0077	0.0114	0.0206	0.0036	0.0053	0.0145
bétanine	0.0053	0.0080	0.0292	0.0070	0.0074	0.0244
bétanine-cyclodopa glucoside	0.0008	0.0019	0.0056	0.0007	0.0012	0.0044
bétanine-acide bétalamique	0.0045	0.0060	0.0237	0.0063	0.0062	0.0200
inconnu, divers	0.0176	0.0387	0.1077	0.0060	0.0434	0.0586

Les fractions molaires de précurseur radioactif initial retrouvées dans le milieu à la fin de l'expérience d'incorporation (= précurseur externe) et celles dans les débris cellulaires (= parois) résultent des données en pourcent *Tab. 6.1* multipliées avec 0.01.

Les fractions molaires de précurseur radioactif incorporées dans les métabolites résultent de la multiplication du pourcentage de répartition (*0.01 du *Tab. 6.2*) avec la fraction molaire de précurseur internalisé soluble (1-précurseur externe (*Tab. 6.3*) - parois (*Tab. 6.5*))

La présentation des mesures en fraction molaire de précurseur actif initial (*Fig. 6.3*) donne une idée approximative de la cinétique d'incorporation. On réalise la décroissance quasi exponentielle du précurseur actif dans le milieu. Dans le même contexte on remarque l'accroissement dans l'extrait et dans les débris cellulaires presque complémentaire à la progression du précurseur internalisé, ce qui peut consolider l'analyse.

La vue synoptique des cinétiques d'incorporation dans les métabolites est présentée dans *Fig. 6.4*. On distingue bien le caractère des compartiments de métabolites: transitoire et terminal. Les précurseurs internalisés de nature transitoire, tyrosine respectivement dopa interne, montrent une accumulation initiale suivie d'un fléchissement, témoin de l'écoulement actif des deux acides aminés.

La dopamine se profile comme métabolite de loin le plus important. L'accumulation dans la dopamine du précurseur radioactif, provenant de la tyrosine aussi bien que de la dopa (Schéma 6.1), atteint dans son ampleur presque celle de l'internalisation des précurseurs. Comparativement l'accumulation de la radioactivité relative dans la tyramine, également à caractère terminal, est peu importante. La dopa est disponible dans la même mesure à partir de la tyrosine qu'à partir de la dopa comme précurseurs, ce qui témoigne de l'hydroxylation efficace de la tyrosine. Les profils d'évolution des autres métabolites radioactifs, cyclodopa glucoside et bétanine, très inférieurs en quantité, montrent l'accroissement continu typique de produits terminaux.

Schéma 6.1: dopamine et tyramine comme métabolites

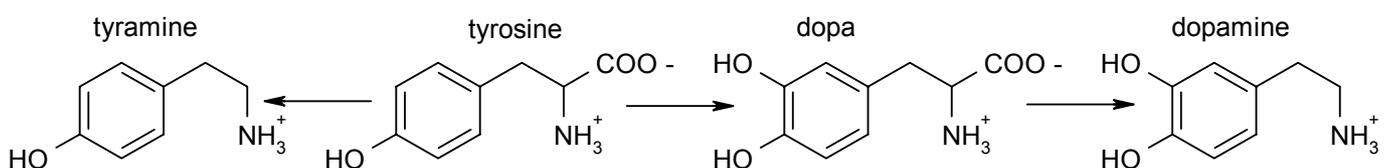


Figure 6.3. Internalisation des précurseurs dans les suspensions cellulaires.

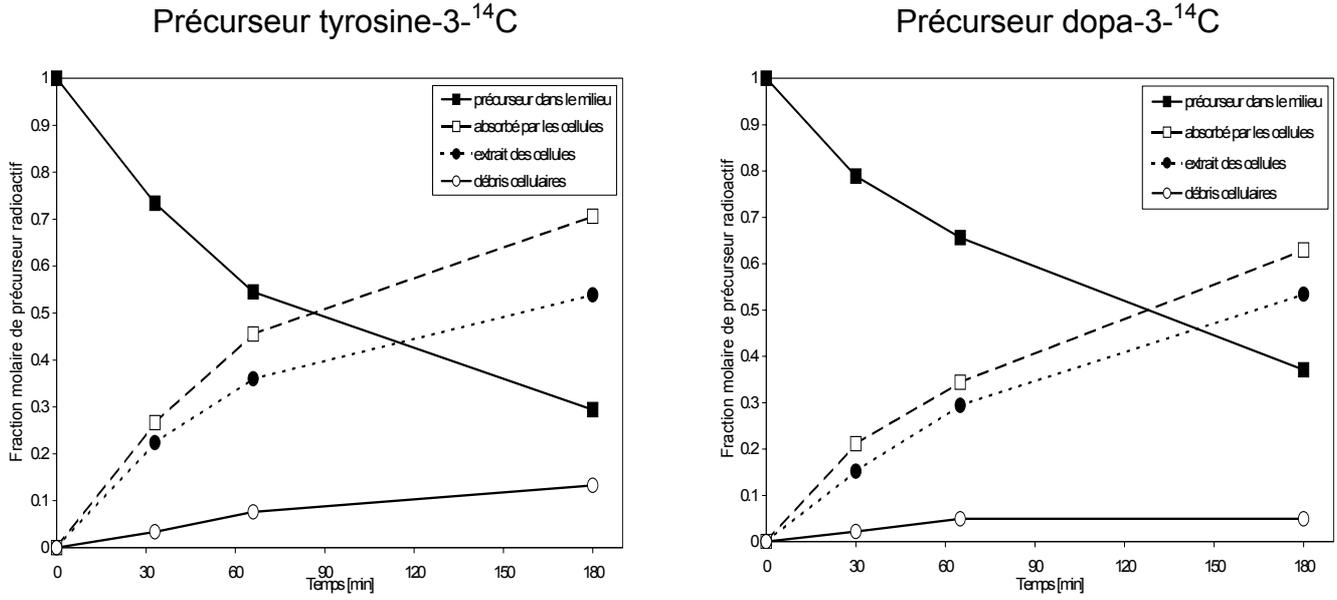
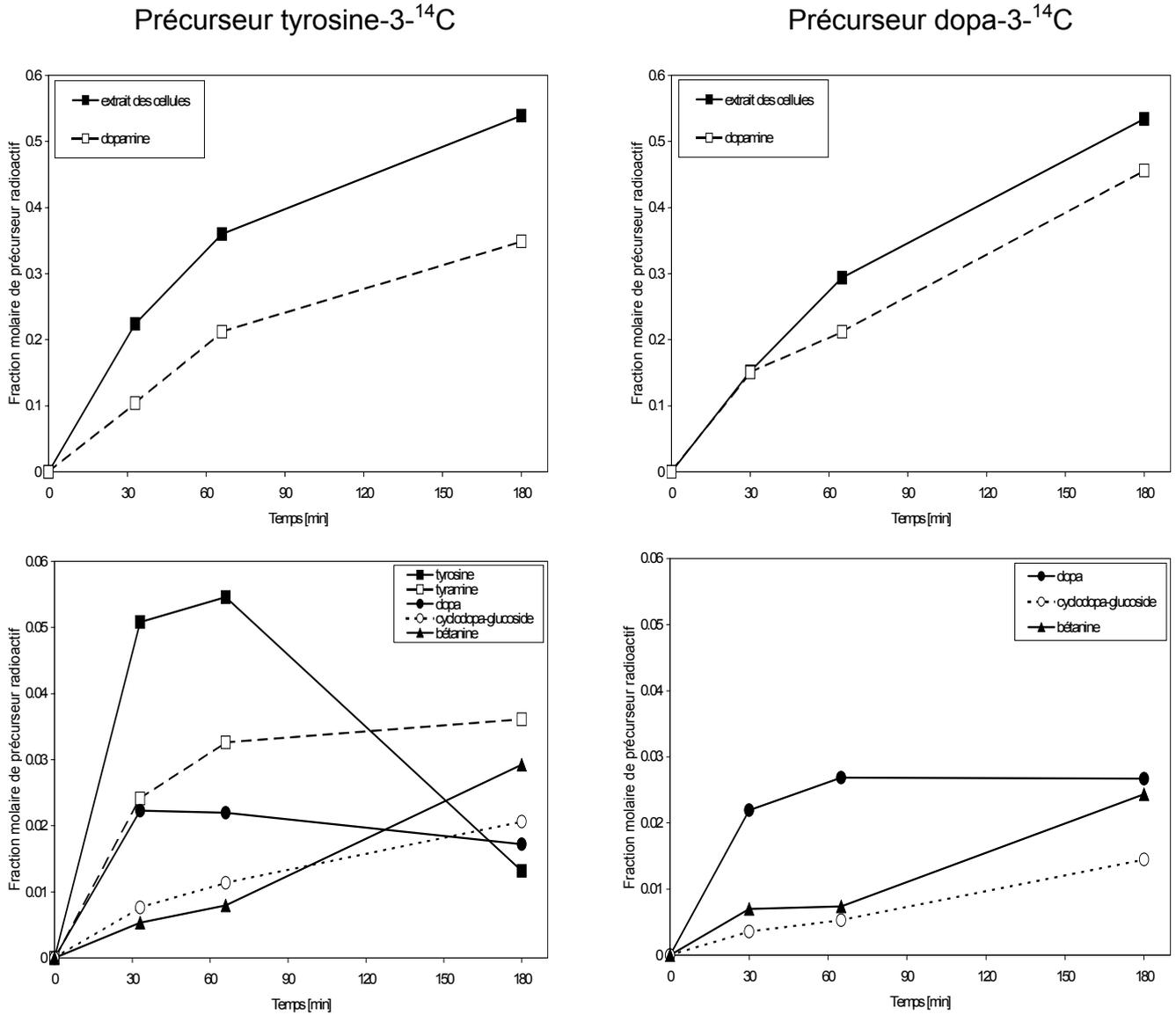


Figure 6.4. Répartition de la radioactivité dans les métabolites.



6.4. Vers une modélisation.

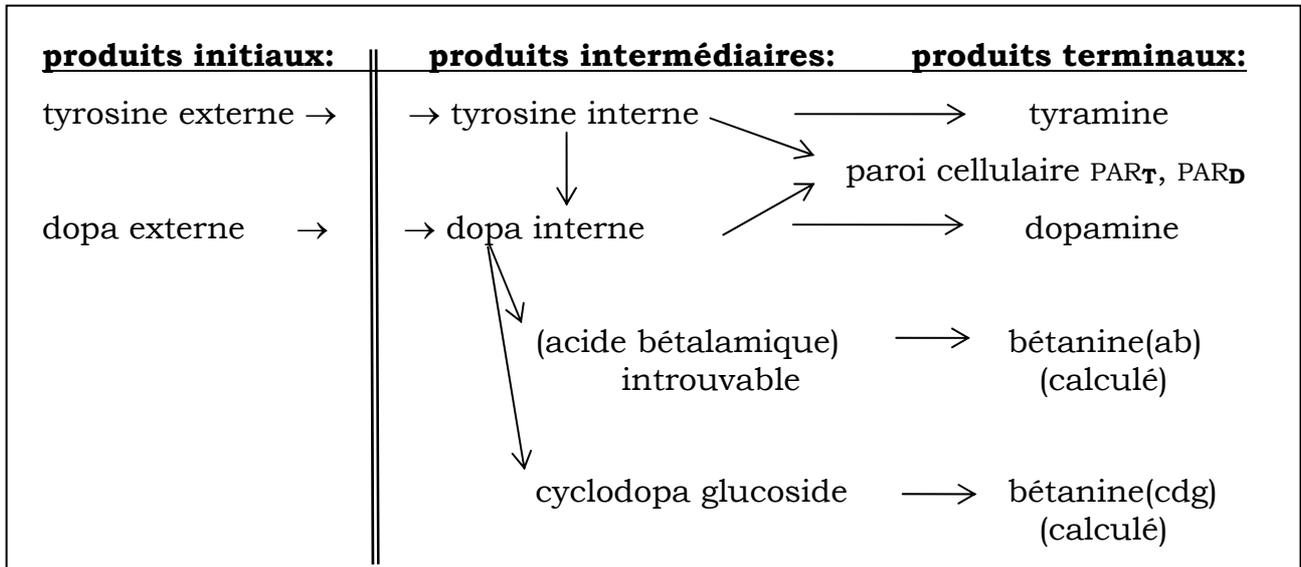
a) Introduction.- L'objectif principal de la modélisation est de trouver une base théorique à la cinétique des biotransformations. Le rapprochement des valeurs expérimentales avec les valeurs calculées par le modèle comme vérification du flux métabolique peut finalement valider le schéma biosynthétique proposé.

Une entité moléculaire métabolique est assimilée à un compartiment. Le traitement théorique ne fait pas de distinction des phénomènes de transfert ou de biotransformation que l'on formule respectivement comme vitesse de transfert ou de biotransformation d'une substance qui quitte ou entre dans le compartiment, vitesse qui est proportionnelle à la quantité ou concentration de cette substance. Cela revient dans le langage de la chimie physique à une cinétique monomoléculaire ou de 1er ordre, c'est-à-dire la vitesse de transfert respectivement de transformation ne dépendent que de la concentration du métabolite concerné.

b) Composition du flux métabolique.- Nous formulons dans le *Schéma 6.1.* hypothétique les passages supposés d'un compartiment à un autre par des flèches. En première place figurent les transferts des précurseurs du milieu nutritif, compartiments externes, à leurs compartiments respectifs internes. Les décarboxylations conséquentes de la tyrosine et de la dopa en tyramine et dopamine sont bien connues en général ainsi que l'hydroxylation de la tyrosine en dopa.

On ne peut pas déterminer d'emblée l'origine de la radioactivité accumulée dans les parois cellulaires. Il paraît probable qu'elle provienne des compartiments internes de la tyrosine et de la dopa. Dans le cadre de cette expérience il n'est toutefois pas possible de déterminer le taux exact par lequel tyrosine ou dopa participent à la radioactivité constatée dans les débris cellulaires; on va distribuer celle-ci en assignant un taux arbitraire pour les deux compartiments: PAR_T (paroi-tyrosine) et PAR_D (paroi-dopa).

Schéma 6.1 : Résumé des caractéristiques d'incorporation observées



Sur la base d'études antérieures on formule les transformations en cyclodopa glucoside et en acide bétalamique à partir d'un même et unique compartiment de dopa interne. Le compartiment du cyclodopa glucoside, présenté comme intermédiaire précédant l'incorporation dans la bétanine a plutôt le caractère d'un compartiment terminal ce qui pourrait s'expliquer par un équilibre d'échange entre les deux compartiments cyclodopa glucoside et bétanine. A défaut de mettre en évidence la présence de l'acide bétalamique on renonce à tenir compte de son existence intermédiaire et on formule l'incorporation de la dopa dans la bétanine comme un seul transfert.

Pour rendre possible une interprétation théorique de l'analyse cinétique la bétanine est subdivisée artificiellement en deux compartiments correspondants aux deux composés: b(cdg), bétanine marquée dans la partie cyclodopa glucoside, et b(ab), bétanine marquée dans la partie acide bétalamique. La répartition est effectuée sur la base de la répartition centésimale. L'allure du développement des deux entités reflète en conséquence le même caractère terminal. On considère alors l'incorporation du cyclodopa glucoside dans le compartiment b(cdg) et l'incorporation de l'acide bétalamique dans le compartiment b(ab).

c) Systèmes à équations différentielles.- Le flux métabolique esquissé dans le *Schéma 6.1.* globalement pour l'incorporation de la tyrosine et de la dopa est un système à 10 compartiments dans le premier cas, et à 7 compartiments dans le deuxième. Ces deux systèmes sont d'une complexité telle qu'il n'est pas possible de trouver de solution intégrée. Il s'y ajoute un problème supplémentaire par le nombre trop petit de points expérimentaux pour une véritable étude cinétique, ce qui rend problématique tout traitement théorique même dans le cas où une telle approximation existerait.

Calcul des matrices: Une solution possible à ce problème est offerte par le calcul matriciel. En prenant comme hypothèse de départ que la cinétique du traceur radioactif passant d'un compartiment q_1 à un compartiment q_2 corresponde à celle d'une équation de 1^{er} ordre, nous pouvons établir la matrice carrée A pour le précurseur tyrosine et la matrice carrée B pour le précurseur dopa. En suivant scrupuleusement le sens des flèches décrites dans le schéma métabolique du *Schéma 6.1.*, nous avons écrit pour chaque compartiment une ligne de la matrice avec les règles données pour l'exemple d'un modèle à 3 compartiments décrit ci-après:

modèle exemple	règles
k_{12} k_{23} $[q_1] \text{ ----} \rightarrow [q_2] \text{ ----} \rightarrow [q_3]$	ENTREE dans le compartiment q_2 à partir de $q_1 = +k_{12}$ SORTIE du compartiment q_2 vers $q_3 = -k_{23}$ 1 ligne et 1 colonne par compartiment (matrice carrée) la numérotation des lignes et colonnes correspond à celle du niveau métabolique

Exemple de matrice carrée établie selon les règles ci-dessus:

$-k_{12}$	0	0
k_{12}	$-k_{23}$	0
0	0	k_{23}

Calcul par le programme ELREAC: La solution unique pour ce problème mécanistique est offerte par un simulateur déterministique traitant le système d'équations différentielles selon *Runge Kutta* de 4^{ème} degré. Le programme ELREAC conçu par *Ernst Schumacher* [65] nous fourni un ensemble optimal de constantes de vitesse par minimalisation du carré des écarts de concentrations mesurées avec celles calculées. La mise en

application de ce programme ne demande de l'utilisateur qu'à écrire, étape par étape, les transferts ou transformations suivant le *schéma* conçu. Le programme va en compiler automatiquement l'ensemble des équations différentielles caractérisant chaque compartiment (*Schémas 6.2 et 6.3*).

On se sert d'un artifice pour compenser le manque de points expérimentaux et contraindre le programme à devenir opérationnel. La partie manquante des courbes cinétiques est complétée par une interpolation des valeurs pour les temps intermédiaires de 90, 120 et 150 min (Tab. 6.6 et 6.7). Le programme de calcul sur la base de *Runge Kutta* essaie de se rapprocher le plus possible de l'ensemble des points tout en tenant compte des contraintes du système d'équations différentielles. L'optimisation est effectuée par itérations multiples et à la fin du processus d'itération, l'ensemble des constantes de vitesse des transferts et transformations sont proposés.

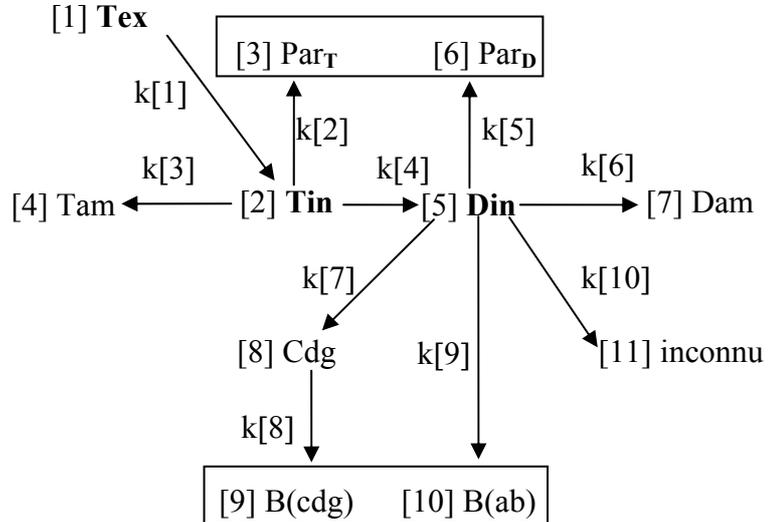
Schéma 6.2 : Modèle métabolique théorique, équations cinétiques et différentielles.

Mise au point d'un modèle théorique pour l'incorporation de la tyrosine.

équations cinétiques:

$$\begin{aligned}
 g[1] &:= k[1] * c[1]; \\
 g[2] &:= k[2] * c[2]; \\
 g[3] &:= k[3] * c[2]; \\
 g[4] &:= k[4] * c[2]; \\
 g[5] &:= k[5] * c[5]; \\
 g[6] &:= k[6] * c[5]; \\
 g[7] &:= k[7] * c[5]; \\
 g[8] &:= k[8] * c[8]; \\
 g[9] &:= k[9] * c[5]; \\
 g[10] &:= k[10] * c[5];
 \end{aligned}$$

Transferts et transformations métaboliques:



équations différentielles:

$$\begin{aligned}
 \text{deriv}[1] &:= -g[1]; \\
 \text{deriv}[2] &:= -g[2] - g[3] - g[4] + g[1]; \\
 \text{deriv}[3] &:= +g[2]; \\
 \text{deriv}[4] &:= +g[3]; \\
 \text{deriv}[5] &:= -g[5] - g[6] - g[7] - g[9] - g[10] + g[4]; \\
 \text{deriv}[6] &:= +g[5]; \\
 \text{deriv}[7] &:= +g[6]; \\
 \text{deriv}[8] &:= -g[8] + g[7]; \\
 \text{deriv}[9] &:= +g[8]; \\
 \text{deriv}[10] &:= +g[9]; \\
 \text{deriv}[11] &:= +g[10];
 \end{aligned}$$

abréviations

Tex	tyrosine externe
Tin	tyrosine interne
Par _T	paroi à partir de tyrosine
Tam	tyramine
Din	dopa interne
Par _D	paroi à partir de dopa
Dam	dopamine
Cdg	cyclodopa glucoside
B(cdg)	partie cdg de la bétanine
B(ab)	partie acide bétalamique de la bétanine

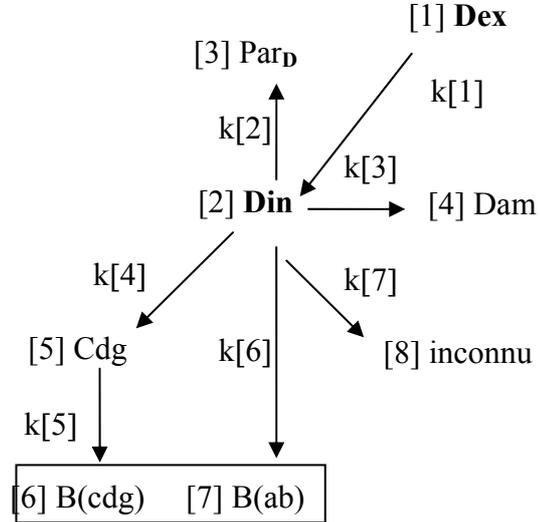
Schéma 6.3 : Modèle métabolique théorique, équations cinétiques et différentielles.

Mise au point d'un modèle théorique pour l'incorporation de la dopa.

équations cinétiques:

$$\begin{aligned} g[1] &:= k[1] * c[1]; \\ g[2] &:= k[2] * c[2]; \\ g[3] &:= k[3] * c[2]; \\ g[4] &:= k[4] * c[2]; \\ g[5] &:= k[5] * c[5]; \\ g[6] &:= k[6] * c[2]; \\ g[7] &:= k[7] * c[2]; \end{aligned}$$

Transferts et transformations métaboliques:



équations différentielles:

$$\begin{aligned} \text{deriv}[1] &:= - g[1] ; \\ \text{deriv}[2] &:= - g[2] - g[3] - g[4] - g[6] - g[7] + g[1] ; \\ \text{deriv}[3] &:= + g[2] ; \\ \text{deriv}[4] &:= + g[3] ; \\ \text{deriv}[5] &:= - g[5] + g[4] ; \\ \text{deriv}[6] &:= + g[5] ; \\ \text{deriv}[7] &:= + g[6] ; \\ \text{deriv}[8] &:= + g[7] ; \end{aligned}$$

abréviations

Dex	dopa externe
Din	dopa interne
Par _D	paroi à partir de dopa
Dam	dopamine
Cdg	cyclodopa glucoside
B(cdg)	partie cdg de la bétanine
B(ab)	partie acide bétalamique de la bétanine

Le résultat du calcul est exposé dans les graphiques de la modélisation d'incorporation, respectivement de la tyrosine (Fig. 6.5) et de la dopa (Fig. 6.6). On voit le développement de chaque compartiment séparément; aux courbes théoriques calculées sont superposés les points de mesure réels (0, 30, 60 et 180 min) et ceux rajoutés par interpolation (90, 120, 150 min). Les flèches indiquent le flux métabolique et sont assorties des constantes de vitesse obtenues par le calcul.

Les points de mesure se trouvent en général assez proches des courbes théoriques, mis à part le cas de la tyramine. Un compartiment artificiel est ajouté qui collectionne le déficit de la radioactivité totale internalisée; cela peut comprendre des substances dont l'activité est en dessous du seuil perceptible. La valeur au temps 0 du métabolite principal la dopamine est

fixée arbitrairement à 0.05 dans le cas de la tyrosine et à 0.02 dans le cas de la dopa comme précurseur.

On dispose d'un moyen de comparaison de l'efficacité des deux précurseurs sur la base des constantes de vitesse (Tab. 6.8). L'internalisation plus rapide de la tyrosine est ainsi quantifiée comme étant de 1.3 fois supérieure à celle de la dopa. La vitesse de transformation de la dopa en dopamine est pratiquement la même dans les deux cas. La relation des vitesses de transformation de la dopa internalisée en cyclodopa glucoside est intéressante car la constante de vitesse s'avère le double dans le cas de l'expérience avec la tyrosine, bien que le compartiment d'origine soit le même. En revanche les constantes de vitesse d'incorporation du cyclodopa glucoside dans la bétanine sont pratiquement identiques dans les deux cas.

Une autre remarque concerne le rapport des constantes de vitesse de la formation de la bétanine marquée dans la partie acide bétalamique à partir du compartiment dopa: le rapport 1.5 paraît proche du rapport des constantes de vitesse d'internalisation des précurseurs respectifs.

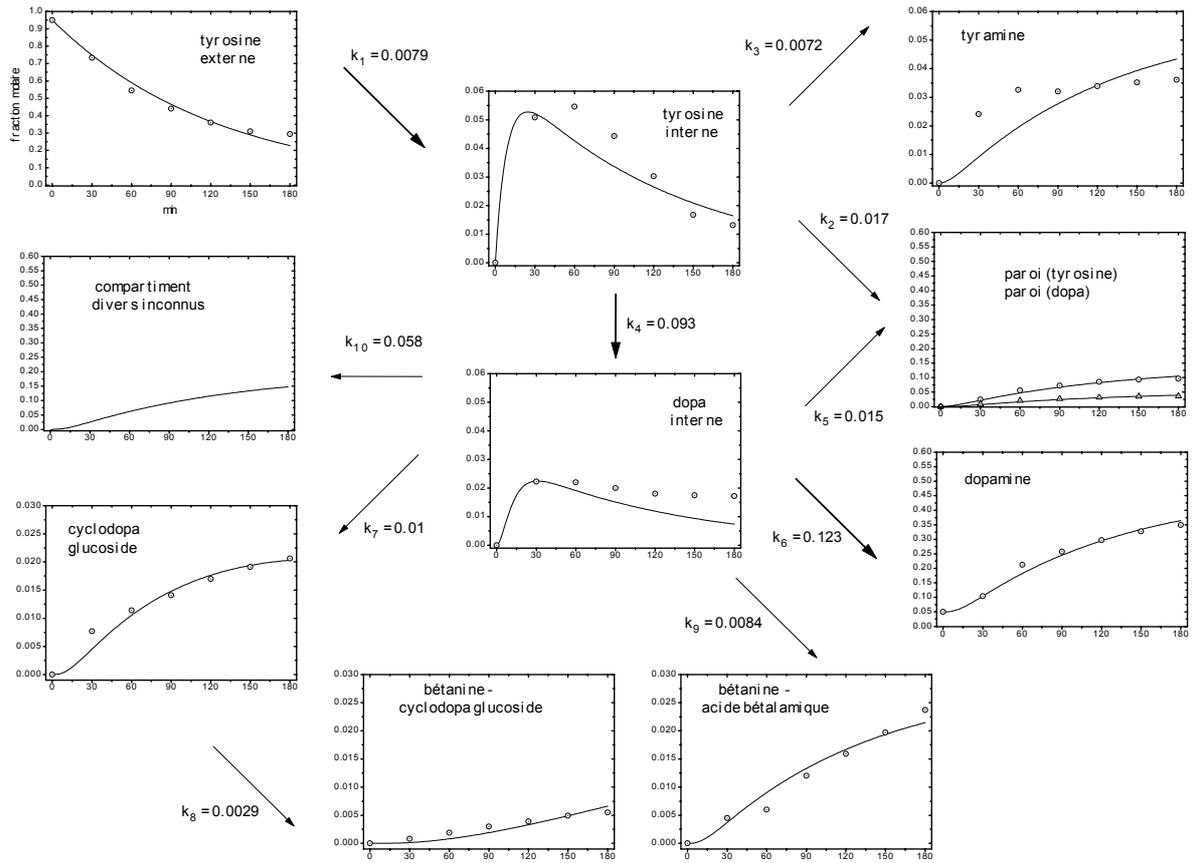
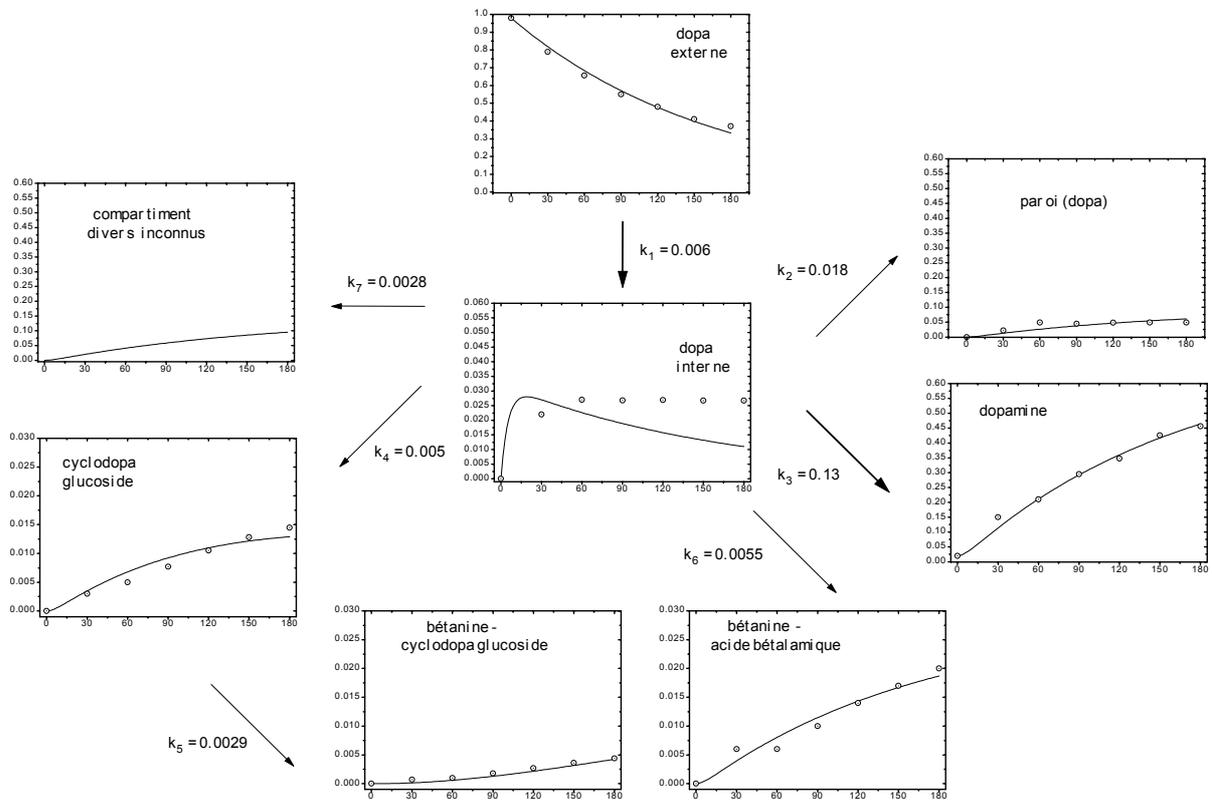
Fig. 6.5: Modélisation d'incorporation de la tyrosine-3-¹⁴C dans les cultures de *Beta vulgaris*.Fig. 6.6: Modélisation d'incorporation de la dopa-3-¹⁴C dans les cultures de *Beta vulgaris*.

Tableau 6.6 : incorporation de la tyrosine-3-¹⁴C.

7

10

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

min	tex	tin	part	tam	din	pard	dam	cdg	bcdg	bab	i
0	0.95	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0	0
<u>30</u>	<u>0.734</u>	<u>0.0508</u>	<u>0.0248</u>	<u>0.0241</u>	<u>0.0223</u>	<u>0.0092</u>	<u>0.1042</u>	<u>0.0077</u>	<u>0.0008</u>	<u>0.0045</u>	
<u>60</u>	<u>0.545</u>	<u>0.0546</u>	<u>0.0555</u>	<u>0.0326</u>	<u>0.022</u>	<u>0.0205</u>	<u>0.2119</u>	<u>0.0114</u>	<u>0.0019</u>	<u>0.006</u>	
90	0.44	0.0443	0.0723	0.0321	0.02	0.0267	0.2573	0.0141	0.003	0.012	
120	0.36	0.0303	0.0854	0.0339	0.018	0.0316	0.297	0.017	0.0039	0.0159	
150	0.31	0.0168	0.0934	0.0352	0.0175	0.0346	0.3276	0.0191	0.0049	0.0197	
<u>180</u>	<u>0.294</u>	<u>0.0132</u>	<u>0.0971</u>	<u>0.0361</u>	<u>0.0172</u>	<u>0.0359</u>	<u>0.349</u>	<u>0.0206</u>	<u>0.0055</u>	<u>0.0237</u>	

les valeurs expérimentales sont soulignées; en caractères normaux les valeurs interpolées

Tableau 6.7: d'incorporation de la dopa-3-¹⁴C.

7

7

1 2 3 4 5 6 7

min	dex	din	pard	dam	cdg	bcdg	bab	i
0	0.98	0	0	0.02	0	0	0	0
<u>30</u>	<u>0.789</u>	<u>0.022</u>	<u>0.022</u>	<u>0.15</u>	<u>0.003</u>	<u>0.0007</u>	<u>0.006</u>	
<u>60</u>	<u>0.656</u>	<u>0.027</u>	<u>0.049</u>	<u>0.21</u>	<u>0.005</u>	<u>0.001</u>	<u>0.006</u>	
90	0.55	0.0268	0.045	0.295	0.0077	0.0018	0.01	
120	0.48	0.0269	0.048	0.348	0.0105	0.0027	0.014	
150	0.41	0.0267	0.049	0.426	0.0128	0.0036	0.017	
<u>180</u>	<u>0.371</u>	<u>0.0267</u>	<u>0.049</u>	<u>0.456</u>	<u>0.0145</u>	<u>0.0044</u>	<u>0.02</u>	

les valeurs expérimentales sont soulignées; en caractères normaux les valeurs interpolées

Tableau 6.8: Modèle d'analyse compartimentale: comparaison des constantes de vitesse à partir de tyrosine et de dopa.

transferts tyr	k	trf.tyr / trf.dopa	k	transferts dopa	Abréviations
Tex → Tin	0.0079	1.31	<i>0.006</i>	<i>Dex → Din</i>	Tex tyrosine externe Tin tyrosine interne ParT paroi à partir de tyrosine
Tin → Par(t)	0.0017				Tam tyramine Dex dopa externe
Tin → Tam	0.0072				Din dopa interne ParD paroi à partir de dopa
Tin → Din	0.093				Dam dopamine
Din → Par(d)	0.015	0.83	<i>0.018</i>	<i>Din → Par(d)</i>	Cdg cyclodopa glucoside Bcdg partie cdg de la bétanine
Din → Dam	0.123	0.95	<i>0.13</i>	<i>Din → Dam</i>	Bab partie acide bétalamique de la bétanine
Din → Cdg	0.010	2.0	0.005	<i>Din → Cdg</i>	
Cdg → Bcdg	0.0029	1.0	<i>0.0029</i>	<i>Cdg → Bcdg</i>	
Din → Bab	0.0084	1.5	<i>0.0055</i>	<i>Din → Bab</i>	
Din → inconnu	0.058	2.0	<i>0.028</i>	<i>Din → inconnu</i>	
Variance totale	$-2.58 \cdot 10^{-3}$		$-6.8 \cdot 10^{-3}$	<i>Variance totale</i>	

la variance totale est du même ordre de grandeur pour les deux simulations.

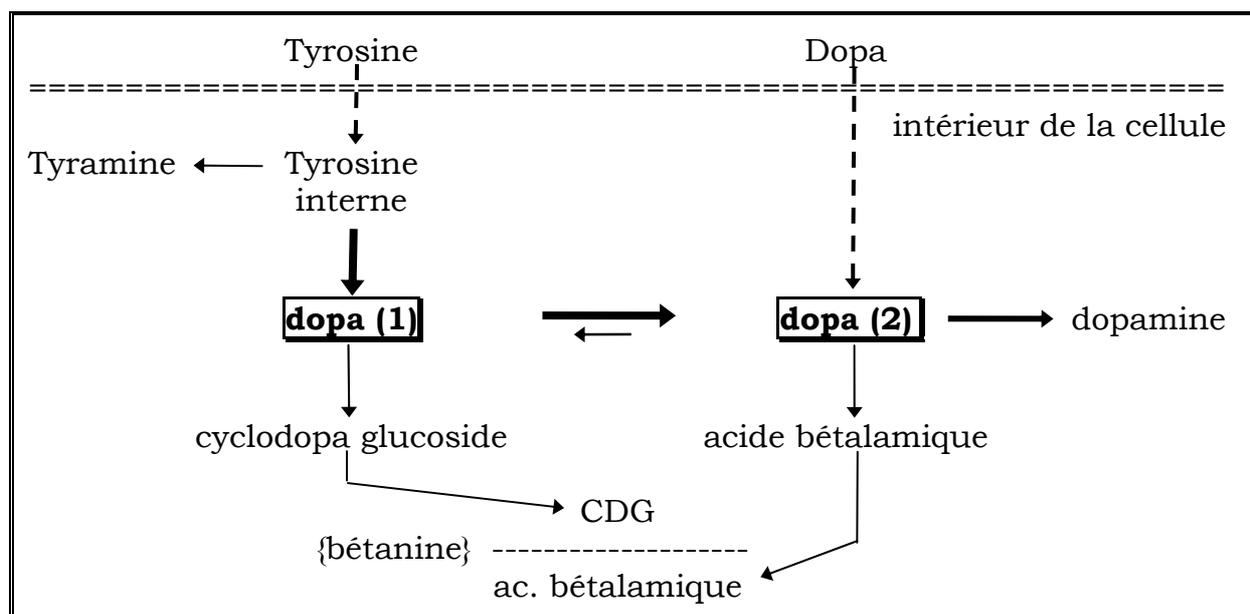
6.5. Conclusions.

Nous avons réussi à concevoir un modèle mathématique en bonne adéquation avec le résultat expérimental de notre analyse compartimentale. Il nous permet d'apprécier les différences cinétiques dans l'incorporation des précurseurs tyrosine et dopa. Il est évident que si la tyrosine sert de précurseur, la dopa formée à partir d'elle est incorporée deux fois plus vite dans le cyclodopa glucoside que la dopa offerte directement comme précurseur. Il semblerait ainsi que la voie métabolique provenant de la dopa précurseur soit plus longue que ne le laisserait prévoir le schéma métabolique proposé, qui est à la base de notre modèle.

Le résultat de l'analyse cinétique (Chap. 6.4) est confirmé de façon indépendante sur la base des biodilutions: l'efficacité des deux précurseurs n'est apparemment pas identique dans la biosynthèse du cyclodopa glucoside; la biodilution de la dopa est approximativement le double de celle de la tyrosine.

Nous pourrions adapter notre modèle en supposant l'existence de deux compartiments de dopa bien distincts. Le schéma métabolique affiné dans ce sens pourrait être esquissé comme suit avec en traitillé les ajouts expérimentaux des deux précurseurs (Schéma 6.3):

Schéma 6.3: Modèle biosynthétique de la bétanine



Le compartiment dopa(1), issu de l'hydroxylation de la tyrosine, serait le précurseur immédiat du cyclodopa glucoside. A partir du même compartiment dopa(1), il y a transfert rapide vers un compartiment dopa(2), d'où la dopa est en majeure partie décarboxylée en dopamine et en petite quantité métabolisée en acide bétalamique, aussitôt incorporé dans la bétanine. En revanche, la dopa internalisée aboutit directement au compartiment dopa(2) d'où parviendrait une partie moindre au compartiment dopa(1), source du cyclodopa glucoside.

Tableau 7.1: Baisse des radioactivités dans le milieu nutritif.

essai	30 min	60 min
culture <i>Beta vulgaris</i>	1.05 g PF	1.55 g PF
débit ^3H	$-3.796 \cdot 10^6 \text{dpm} \cdot \text{min}^{-1}$	$-5.227 \cdot 10^6 \text{dpm} \cdot \text{min}^{-1}$
débit ^{14}C	$-0.295 \cdot 10^6 \text{dpm} \cdot \text{min}^{-1}$	$-0.682 \cdot 10^6 \text{dpm} \cdot \text{min}^{-1}$

Une corrélation des débits de radioactivité avec les masses cellulaires (partant du zéro par définition) *Fig. 7.2* met en évidence que les deux paramètres sont proportionnels. Ainsi se confirme de manière indépendante que nous avons des conditions quasi-stationnaires d'internalisation des précurseurs. La proportionnalité est formulée par l'équation 1 :

[équation 1] Vitesse d'internalisation ($\text{dpm} \cdot \text{min}^{-1}$) = masse cellulaire (g PF) * constante.

Figure 7.2. Corrélation des vitesses d'internalisation avec la masse cellulaire

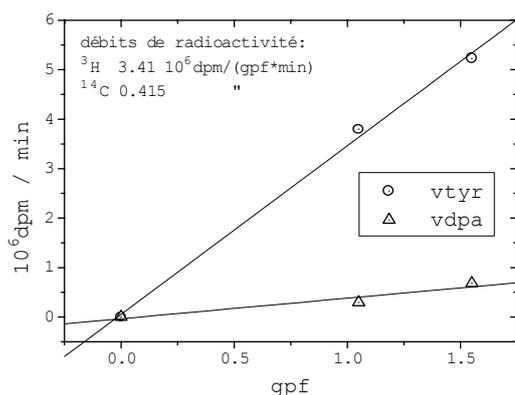
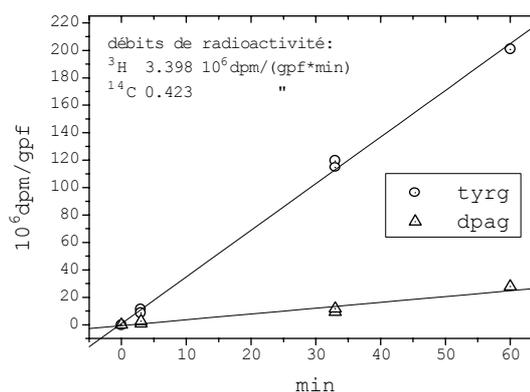


Figure 7.3. Corrélation de l'internalisation normalisée par g PF avec le temps.



La constante de l'équation 1, calculée par regression linéaire du graphe *Fig. 7.2*, correspond au débit d'internalisation de la radioactivité normalisé par g PF de culture ($10^6 \cdot \text{dpm} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g PF}^{-1}$). La constante est caractéristique de chaque précurseur (*Tab. 7.2*).

Tableau 7.2: Débits des radioactivités normalisés par g PF et rapport des radioactivités.

débit ($10^6 \text{dpm} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g PF}^{-1}$)	^3H	^{14}C	$^3\text{H} / ^{14}\text{C}$
internalisation selon équation 1	3.41	0.415	8.19
internalisation selon équation 2	3.398	0.423	8.03
incorporation selon équation 2	1.176	0.398	2.95

L'internalisation peut être décrite aussi par l'équation 2 :

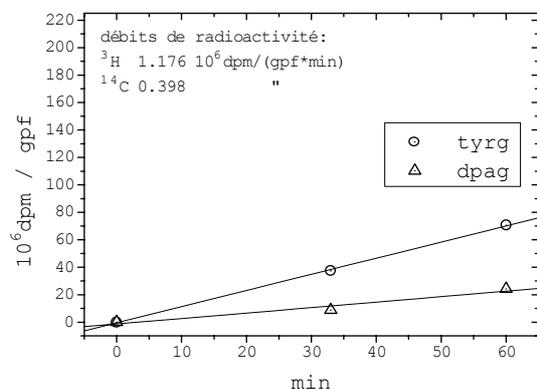
[équation 2] Internalisation normalisée ($10^6 \text{ dpm} \cdot \text{g PF}^{-1}$) = temps (min) * constante.

Par la corrélation correspondante (Fig. 7.3.) des internalisations normalisées par le g PF ($10^6 \text{ dpm} \cdot \text{g PF}^{-1}$) par rapport au temps (min) on obtient un graphe presque identique au précédant (Fig. 7.2). La nouvelle formulation offre cependant l'avantage de tenir compte de l'ensemble des données expérimentales.

7.3. La cinétique d'incorporation.

On obtient une information sur l'incorporation dans les cellules seulement à la fin des incubations par les mesures des radioactivités trouvées dans les extraits (Exp. Tab. 9.1). Les rapports des radioactivités $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ sont différents dans les deux essais: 4.24 dans l'essai de 30 min contre 2.92 dans l'essai de 60 min.

Une vue rassurante est offerte à l'aide d'un examen de cinétique par voie graphique. Le tracé selon l'équation 2 des radioactivités extraites et normalisées par g PF (avec zéro comme point de départ) par rapport au temps d'incubation (Fig. 7.4) produit à nouveau une bonne corrélation linéaire, d'où on peut définir les débits de radioactivités normalisés par g PF (Tab. 7.2). On constate que le débit d'incorporation du ^3H est bien inférieur à celui de l'internalisation tandis que le débit d'incorporation du ^{14}C est pratiquement inchangé. On peut se servir du rapport des débits d'incorporation, 2.95 (Tab. 7.2) qui tient compte du poids des cellules dans les deux expériences, à la place du rapport des radioactivités $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ extraites.



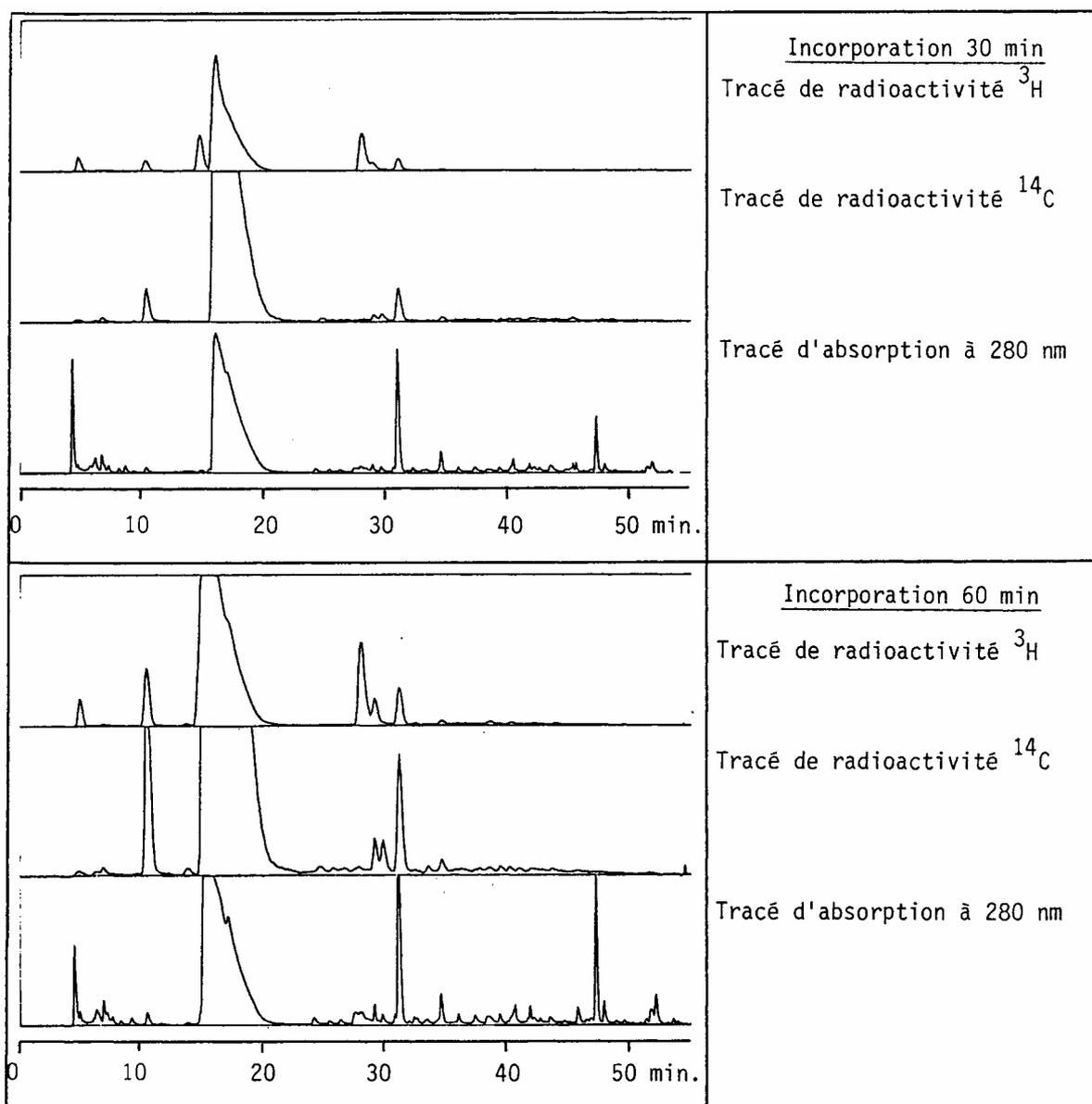
graphique. Le tracé selon l'équation 2 des radioactivités extraites et normalisées par g PF (avec zéro comme point de départ) par rapport au temps d'incubation (Fig. 7.4) produit à nouveau une bonne corrélation linéaire, d'où on peut définir les débits de radioactivités normalisés par g PF (Tab. 7.2). On constate que le débit d'incorporation du ^3H est bien inférieur à celui de l'internalisation

tandis que le débit d'incorporation du ^{14}C est pratiquement inchangé. On peut se servir du rapport des débits d'incorporation, 2.95 (Tab. 7.2) qui tient compte du poids des cellules dans les deux expériences, à la place du rapport des radioactivités $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ extraites.

7.4. La répartition centésimale.

Les mesures simultanées du ^3H et du ^{14}C dans les métabolites s'effectuent en continu lors du passage du flux chromatographique dans une cellule spéciale. Elles nécessitent un réglage particulier des fenêtres d'énergie du compteur, qui confère une plus grande sensibilité au canal du ^{14}C et qui s'accommode en revanche d'une perte dans le canal du ^3H . Le comptage du ^3H est ainsi légèrement inférieur à sa valeur réelle, celui du ^{14}C légèrement supérieur, ce qui implique une erreur systématique. Les profils HPLC et radiochromatogrammes sont présentés dans la Fig. 7.5.

Figure 7.5: Profils HPLC à 280 nm et radiochromatogrammes ^{14}C et ^3H .



Attribution des pics selon Fig 3.2, p.21

L'inégalité des mesures est compensée en exprimant les radioactivités comme pourcentage du total soumis à l'analyse; en même temps les variations expérimentales sont atténuées. Les valeurs de répartition centésimale dans le *Tab. 7.3* (moyennes des données du *Tab. 7exp.*) varient peu avec la durée des essais.

La majeure partie de la radioactivité se trouve incorporée dans la dopamine (61 - 54% dans le cas du ^3H et 91 - 94% dans celui du ^{14}C ; le pourcentage inférieur dans le cas de la tyrosine s'explique par un total de 28 - 32% de la radioactivité ^3H répartie entre la tyrosine et la tyramine. Les pourcentages de radioactivités dans la dopa, le cyclodopa glucoside et la bétanine, en revanche, sont tous bien inférieurs (0.4-4.4%).

Tableau 7.3. Répartitions centésimales des radioactivités et rapports.

Essais:	Répartition dans les métabolites				Rapports $^3\text{H}(\%)/^{14}\text{C}(\%)$	
	essai 30 min		essai 60 min		essai 30 min	essai 60 min
	$^3\text{H}(\%)$	$^{14}\text{C}(\%)$	$^3\text{H}(\%)$	$^{14}\text{C}(\%)$		
Tyrosine	12.7	0.02	13.6	0.12	-	-
Tyramine	15.1	0.02	18.1	0.07	-	-
Dopa	1.9	2.0	4.2	3.7	0.95	1.13
Dopamine	61	93.4	54.5	91.4	0.65	0.6
Cyclodopa-glc	2.4	0.4	4.4	0.9	6.0	4.89
Bétanine	2.0	2.0	3.02	2.1	1.0	1.43

De cette analyse nous retirons le rapport des pourcentages $\%(^3\text{H})/\%(^{14}\text{C})$ comme référence aux radioactivités. Il nous indique un grand avantage d'incorporation de la tyrosine sur la dopa dans le cyclodopa glucoside (rapports 6.0 et 4.89), une contribution presque égale des deux précurseurs dans la dopa et la bétanine et un léger avantage de la dopa sur la tyrosine dans la dopamine (rapports 0.65 et 0.6). Cette information sur l'incorporation des deux précurseurs n'est pourtant que qualitative. Les relations précises restent à établir en fonction des débits réels d'incorporation des radioactivités.

7.5. L'internalisation effective.

La décroissance de la radioactivité du ^3H dans le milieu ne correspond pas au débit effectif d'internalisation. Elle est plus lente car compensée en partie par un débit de radioactivité d'eau tritiée dégagé des cellules lors de l'hydroxylation de la tyrosine.

On peut tenir compte de ce reflux de radioactivité du ^3H sur la base de la répartition centésimale. Le débit de radioactivité équivaut à env. 70% résidant dans les métabolites hydroxylés. Par conséquent le débit effectif d'internalisation du ^3H aurait été d'un facteur 1.7 supérieur à celui mesuré. Ce facteur devrait être réduit de moitié (à 0.85) pour l'incorporation d'un seul des deux ^3H dans la dopa, la dopamine, le cyclodopa glucoside et la bétanine.

7.6. L'incorporation relative et conclusions.

Nous disposons en conclusion des informations précises sur l'internalisation aussi bien que sur l'incorporation des radioactivités sous forme de débits normalisés (*Tab. 7.2*). L'incorporation des radioactivités peut alors être définie relativement à l'internalisation et cette définition s'applique aussi bien au rapport d'incorporation des radioactivités.

Le rapport des débits de radioactivités incorporées s'élève à $1.176/0.398 = 2.95$ (*Tab. 7.2*), et compte tenu de l'internalisation effective (voir ci-dessus) et des données du *Tab. 7.2*, on obtient comme rapport des débits $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ $0.85 \cdot 3.398/0.423 = 6.83$. On obtient ainsi comme coefficient d'incorporation relative $2.95/6.83 = 0.43$. Ce coefficient des rapports de débits, multiplié avec les rapports des pourcentages de radioactivités (*Tab. 7.3*), nous conduit au quotient d'incorporation relative des traceurs (*Tab. 7.4*). A partir des quotients relatifs on calcule les contributions individuelles à la biosynthèse des métabolites.

Tableau 7.4. *Rapports relatifs d'incorporation et contributions individuelles des précurseurs.*

métabolite:	essai 30 min		essai 60 min	
	quotient incorp. relative	contribution tyrosine : dopa	quotient incorp. relative	contribution tyrosine : dopa
dopa	0.41	29 : 71	0.49	33 : 67
dopamine	0.28	22 : 78	0.26	20 : 80
cyclodopa glucoside	2.59	72 : 28	2.11	68 : 32
Bétanine	0.43	30 : 70	0.62	38 : 62

Ce résultat obtenu avec une incorporation simultanée des précurseurs dans une même culture confirme celui de l'analyse compartimentale. Le *Tab. 7.4* met en évidence que l'incorporation de la tyrosine est préférentielle dans le cyclodopa glucoside dans la proportion 70 : 30 par rapport à la dopa. Cette proportion est inversée dans le cas de tous les autres métabolites. Cela témoigne de manière claire de la compartimentation de la biosynthèse entre un compartiment de la dopa issu directement de la tyrosine plus proche métaboliquement du CDG et un compartiment général de dopa dédié aux autres métabolites comme l'acide bétaïamique et la dopamine.

8. Expérience de compétition.

8.1. Le motif de l'étude.

Une incorporation simultanée de la tyrosine-³H et de la dopa-¹⁴C nous a permis de prouver l'avantage cinétique de la tyrosine et en conséquence de consolider l'hypothèse de deux compartiments de dopa. Il faut toutefois relever que la concentration de la tyrosine dans cet essai était largement inférieure à celle de la dopa, ce qui pourrait avoir influencé le résultat. On ne peut dans ce cas pas exclure un effet de compétition entre les deux précurseurs et la présente étude a comme but de clarifier cette possibilité.

8.2. Expérience de compétition.

Nous tiendrons compte des paramètres suivants: a) la cinétique d'internalisation des précurseurs radioactifs par les cellules; b) la radioactivité extraite des cellules; c) la répartition centésimale de la radioactivité entre les métabolites; d) la radioactivité spécifique dans les métabolites isolés; e) la répartition de la radioactivité entre les deux parties de la bétanine.

Pour parvenir à un résultat cohérent nous profiterons des conditions standardisées mis au point au préalable en partant d'une suspension cellulaire unique et homogène répartie entre les 4 expériences.

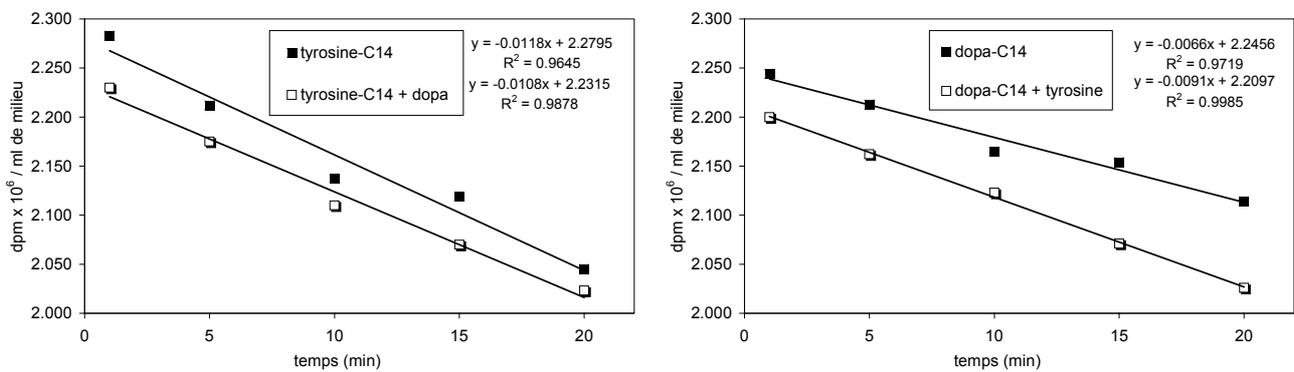
Cette étude comparative sera réalisée dans des conditions expérimentales quasi-stationnaires, avec une durée d'incubation courte. Les précurseurs, marqués par le ¹⁴C de manière identique, seront incubés à concentration égale. L'étude est répartie sur 4 essais, comportant soit l'un, soit l'autre des précurseurs marqués (T*, D*) et respectivement chacun des précurseurs radioactifs incubé en présence de l'autre précurseur non marqué (T*(D), D*(T)) à la même concentration.

8.3. Les cinétiques d'internalisation.

Les radioactivités, mesurées à des intervalles réguliers pendant les incubations de 20 min, sont reportées séparément pour les précurseurs

dans deux graphiques Fig. 8.1. On voit que l'absorption des précurseurs par les cellules suit une allure linéaire dans toutes les expériences, (coefficients de régression compris entre 0,982 et 0,999). La baisse de concentration des précurseurs dans le milieu pendant la durée des essais reste limitée: entre 6 et 10% des valeurs initiales. Le taux de consommation s'avère donc optimal et répond aux exigences des conditions quasi-stationnaires visées dans cette expérience.

Figure 8.1: Evolution de la quantité de précurseur au cours du temps.



Le graphique Fig. 8.2 retrace ces mêmes résultats calculés sur la base d'activité spécifique sous forme de quantités molaires de précurseur internalisé par g poids frais de cellules au cours du temps. De cette corrélation on retire par régression linéaire les débits d'internalisation normalisés des précurseurs (exprimés en nmol*g⁻¹*min⁻¹). Ces résultats sont résumés dans le Tab. 8.1.

Figure 8.2 : Internalisation normalisée par rapport au poids frais des cellules.

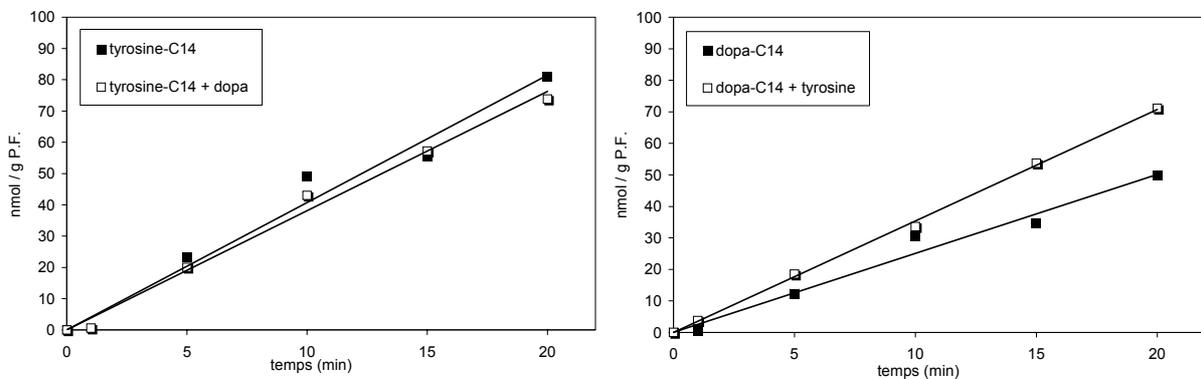


Tableau 8.1: Les débits d'internalisation normalisés en $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
et calcul des quotients des vitesses d'internalisation.

Expérience T*		Expérience T*(D)		quotient des vitesses
tyrosine- ¹⁴ C	-	tyrosine- ¹⁴ C	dopa	T*(D) / T*
4.072	-	3.812	[3500 nmol]	0.94

Expérience D*		Expérience D*(T)		quotient des vitesses
-	dopa- ¹⁴ C	tyrosine	dopa- ¹⁴ C	D*(T) / D*
-	2.504	[3500 nmol]	3.539	1.41

T* / D* = 1.63	T*(D) / D*(T) = 1.08	quotient des vitesses
-----------------------	-----------------------------	-----------------------

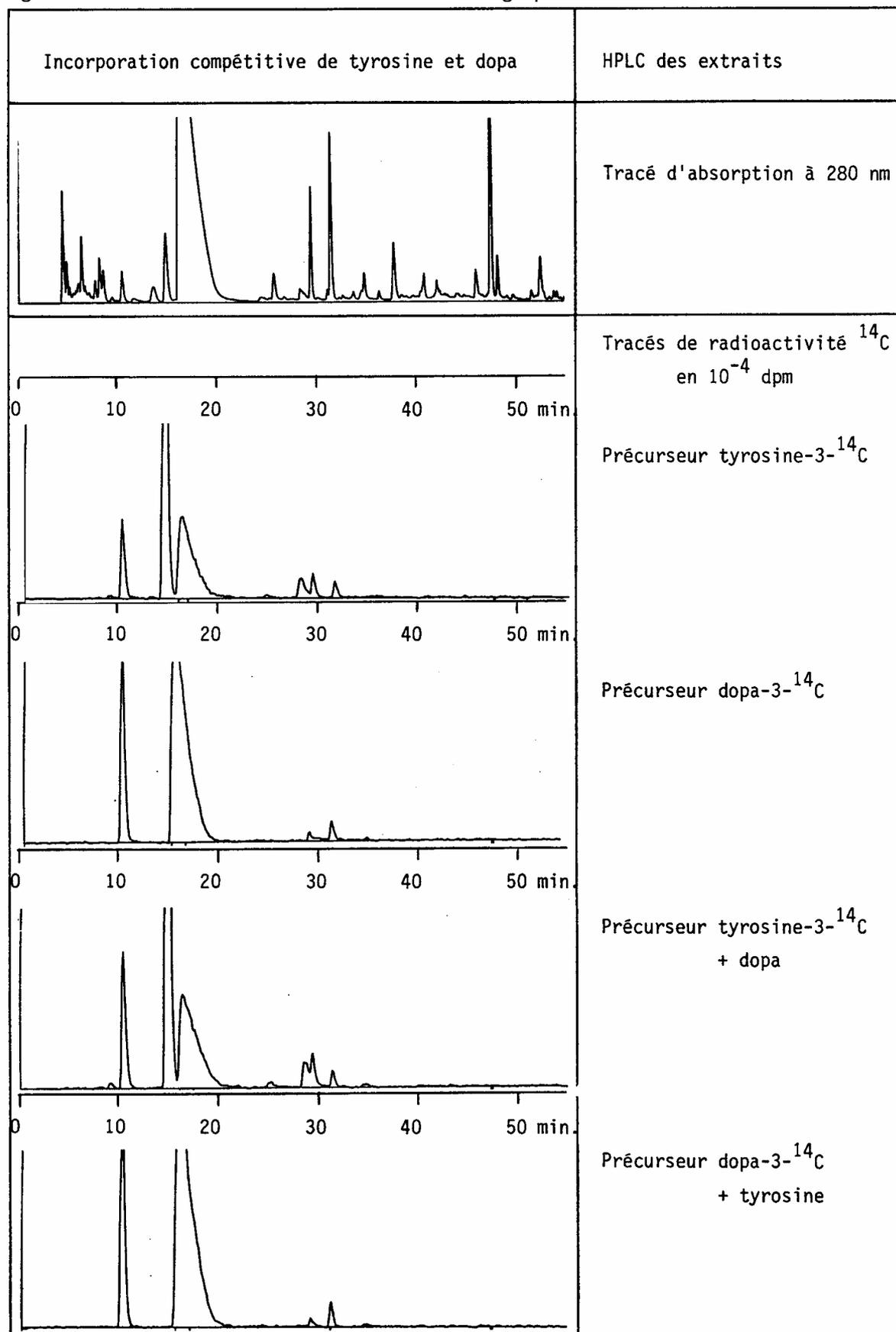
Nous constatons d'abord que le débit d'internalisation de la tyrosine-¹⁴C seule est supérieur d'un facteur 1.63 à celui de la dopa-¹⁴C seule, ce qui est proche des valeurs obtenues dans les précédentes expériences.

En présence de dopa non radioactif le débit d'internalisation de la tyrosine-¹⁴C se trouve légèrement abaissé (d'un facteur 0.94), ce qui témoigne d'un effet de compétition. Cet effet est assez faible et n'a pas pu affecter beaucoup le résultat de l'essai précédent d'application simultanée des deux précurseurs tyrosine-³H et dopa-¹⁴C.

Un effet contraire est observé dans le cas de la dopa-¹⁴C: son débit d'internalisation est supérieur d'un facteur de 1.4 x en présence de tyrosine non radioactive. A l'opposé de ce qu'on attend d'une situation de compétition, on observe une intensification de l'internalisation de dopa-¹⁴C.

8.4. La répartition centésimale.

Les résultats des analyses des métabolites dans les extraits concentrés après séparation par radiochromatographie HPLC (Fig. 8.3) sont présentés en pourcentage de la radioactivité extraite des cellules (Tab. 8.2).

Figure 8.3. Profils HPLC 280 nm et radiochromatographie ^{14}C des 4 extraits.

Attribution des pics selon Fig 3.2, p.21

Tab. 8.2: Débit d'internalisation normalisée de la radioactivité, radioactivité totale extraite et répartition centésimale de la radioactivité extraite sur les métabolites dans les 4 essais

Extrait et débit	T*	T* (D)	D*	D* (T)
débit d'internalisation normalisé dpm*10 ³ *g ⁻¹ *min ⁻¹	188.6	176.5	107.7	152.2
extrait total dpm*10 ⁶	12.57	13.88	9.9	11.44

Métabolites [% de l'extrait]	T*	T* (D)	D*	D* (T)
tyrosine	53.75	55.30	-	-
tyramine	3.69	3.30	-	-
dopa	6.79	9.48	18.91	20.34
dopamine	27.90	25.27	76.86	75.80
cyclodopa glucoside	2.00	1.30	0.78	0.73
bétanine	1.26	0.91	1.55	1.93

Tableau 8.3.1: Rapports des radioactivités.

Rapports extraits et débits	A	B	C	D
	T* / D*	T* (D) / D*	T* / D*(T)	T*(D) / D*(T)
radioactivité dans les extraits	1.27	1.40	1.10	1.21
des débits de radioactivité	1.75	1.64	1.24	1.16
extraits/débits	0.73	0.85	0.89	1.04

Tableau 8.3.2: Rapports d'incorporations relatives des précurseurs (sans et avec compétition).

Rapport incorporation relatif	A	B	C	D
	T* / D*	T* (D) / D*	T* / D*(T)	T*(D) / D*(T)
dopa	0.26	0.43	0.30	0.49
dopamine	0.26	0.28	0.33	0.35
cyclodopa glucoside	1.85	1.42	2.44	1.87
bétanine	0.59	0.50	0.58	0.49

$$\text{(formule 1) rapport d'incorporation relative} = \frac{\text{métabolite T*}\%}{\text{métabolite D*}\%} \times \frac{\text{extrait T*}}{\text{extrait D*}} \times \frac{\text{débit D*}}{\text{débit T*}}$$

Tyrosine-¹⁴C : Plus de la moitié de la radioactivité est présente sous forme de tyrosine après 20 min d'incubation, quantité qui apparaît comme supérieure à celle observée dans les expériences précédentes à durée d'incubation plus longue. Approximativement un quart est transformée en dopamine - métabolite principal - qui s'accumule comme déjà décrit précédemment dans le chapitre sur l'analyse compartimentale. Une petite partie de la tyrosine est décarboxylée en tyramine. Ce premier groupe de métabolites ne semble que peu affecté par l'ajout de dopa non-radioactif à la tyrosine-¹⁴C. Dopa, CDG et bétanine représentent ensemble plus de 10% des métabolites. L'ajout de dopa au milieu nutritif n'a pratiquement pas d'influence sur la vitesse d'internalisation de la tyrosine radioactive, mais entraîne l'accumulation de son métabolite dopa-¹⁴C et une légère baisse de l'incorporation dans le CDG, la bétanine et la tyramine.

Dopa-¹⁴C: Le métabolite principal est la dopamine avec plus de 75% d'incorporation, dopa représente presque 20% du marquage et CDG moins de 1 %. L'ajout de tyrosine non radioactive ne semble pas affecter l'incorporation dans ces métabolites et on note seulement une légère augmentation du marquage dans la bétanine.

Effet de compétition. - Les rapports des répartitions centésimales dans les métabolites ne tiennent pas compte des différences de vitesse d'internalisation des précurseurs. La linéarité de l'internalisation des précurseurs sur l'intervalle de mesure (20 min) nous permet de normaliser les rapports des répartitions centésimales en fonction des différentes vitesses d'internalisation dans les 4 expériences. Ces rapports normalisés sont présentés dans le Tab. 8.3.2.

Comparaison A (référence): Le rapport des vitesses d'internalisation des deux précurseurs dans les cellules est semblable aux rapports calculés lors des expériences précédentes. Les rapports des répartitions centésimales dans les métabolites normalisés calculés selon la formule 1 présentée dans le Tab. 8.3.2 montrent que l'incorporation de la tyrosine-¹⁴C dans le CDG est plus importante qu'avec dopa-¹⁴C ce qui confirme les observations des deux premières séries d'expériences sur l'analyse compartimentale et de

l'incorporation simultanée de tyrosine-³H et dopa-¹⁴C. Les rapports de dopa et dopamine sont quant à eux identiques et ils correspondent à une incorporation approximativement 4 x plus importante à partir de dopa-¹⁴C que de la tyrosine-¹⁴C. La bétanine est en situation intermédiaire avec un facteur proche de 2 x en faveur de dopa-¹⁴C comme précurseur.

Comparaison A avec B : Le rapport des vitesses d'internalisation des deux précurseurs (1.64, Tab. 8.3.1) reste semblable à celui de la référence (1.75, Tab. 8.3.1). L'ajout de dopa non-radioactif à la tyrosine-¹⁴C entraîne une augmentation de la fraction centésimale de dopa^T radioactif (Tab. 8.2.), ce qui conduit à une augmentation de 65% du rapport normalisé (0.26 → 0.43). Paradoxalement cette quantité supplémentaire de dopa radioactif n'affecte pas la dopamine dont le rapport reste presque inchangé (0.26 → 0.28). Il affecte par contre directement et de façon proportionnelle le CDG avec une baisse de 30% (1.85 → 1.42). Le rapport normalisé de la bétanine baisse dans une moindre mesure (0.59 → 0.50).

L'ajout de dopa non-radioactif n'a pratiquement pas d'effet sur la vitesse d'internalisation de la tyrosine-¹⁴C (-7%) alors que paradoxalement il provoque des changements sensibles au niveau du CDG et de la bétanine. Les résultats et observation de cette série d'expériences corroborent notre hypothèse (chapitre 6, conclusions, schéma 6.3) sur l'existence de deux compartiments de dopa métaboliquement distinct.

Comparaison A avec C : Le rapport des vitesses d'internalisation des deux précurseurs (série C) diminue de près de 40% quand on le compare à la série A (Tab. 8.3.1). L'ajout de tyrosine non-radioactive à dopa-¹⁴C n'a pas d'effet notable sur la fraction centésimale de dopa^D, dopamine^D et CDG^D radioactifs (Tab. 8.2).

Dans la comparaison **A** avec **C** l'effet de l'augmentation de la vitesse d'internalisation de dopa-¹⁴C (+40%) expliquerait à lui seul les augmentations des rapports normalisés de dopa, dopamine et CDG (Tab. 8.3.2, **C**). Le compartiment de dopa^D alimente donc aussi bien la dopamine que le CDG. Ces résultats suggèrent une biodisponibilité différente des deux réservoirs de dopa et une certaine redondance des voies

biosynthétiques.

Remarque: l'existence au sein de la cellule de compartiments distincts pour un même composé et d'une certaine redondance dans les voies métaboliques est un phénomène fréquent dans les cellules car elle permet d'assurer la synthèse d'un métabolite même en cas d'épuisement d'un des compartiments de précurseur [66,67,68].

Effet cumulé des deux séries d'expériences (série D): L'effet cumulé des deux séries d'expériences conduit à un rapport des vitesses d'internalisation des deux précurseurs proche de 1 (1.16). Nous avons comparé dans le Tab. 8.4 les rapports des répartitions centésimales normalisés des métabolites de la série D $\{T^*(D)/D^*(T)\}$ avec les rapports de l'expérience d'incorporation simultanée $\{\text{tyr-}^3\text{H}/\text{dopa-}^{14}\text{C}\}$. Dans ces deux séries d'expériences, nous avons comme point commun la présence simultanée des deux précurseurs.

Tableau 8.4 : Comparaison des rapports des répartitions centésimales normalisés des séries (D) et d'incorporation simultanée (tyrosine-³H et dopa-¹⁴C).

	Tab. 8.3	Chapitre 7, Tab. 7.4	
	(D) 20 min	30 min	60 min
rapport normalisés des répartition centésimales dans les métabolites	$T^*(D) / D^*(T)$	$\frac{\text{tyr-}^3\text{H}}{\text{dopa-}^{14}\text{C}}$	$\frac{\text{tyr-}^3\text{H}}{\text{dopa-}^{14}\text{C}}$
dopa	0.49	0.41	0.49
dopamine	0.35	0.28	0.26
cyclodopa glucoside	1.87	2.59	2.11
bétanine	0.49	0.43	0.62

Les rapports normalisés des séries à 20 min et 30 min d'incubation sont proches et ceci malgré la concentration plus basse de tyrosine-³H. L'incorporation dans le CDG (valeurs en gras) est plus favorable à partir de la tyrosine que dopa dans les deux séries d'expériences. L'influence des précurseurs l'un sur l'autre est similaire dans les deux séries d'expériences pour les compartiments métaboliques de dopa, dopamine et bétanine.

Nous en concluons que nos deux approches expérimentales de l'analyse compartimentale avec double traceur et des expériences individuelles donnent des résultats cohérents, ce qui nous conduit à élaborer un modèle compartimental comportant deux réservoirs de dopa avec des échanges préférentiels.

8.5. Répartition du marquage dans la bétanine.

L'analyse de la répartition de la radioactivité dans la bétanine (partie CDG et partie acide bétalamique) a été effectuée sur les produits purifiés après clivage de la bétanine en cyclodopa glucoside et en acide bétalamique, suivie par la condensation de l'acide bétalamique avec la proline pour former l'indicaxanthine. Les résultats sont présentés dans le Tab. 8.5.

L'incorporation dans la partie CDG de la bétanine est meilleure avec tyrosine- ^{14}C seule qu'avec dopa- ^{14}C seul, ce qui est mis en évidence par la radioactivité spécifique mesurée qui est largement supérieure dans $\text{CDG}_{\text{Bét}}^{\text{T}}$ que dans $\text{CDG}_{\text{Bét}}^{\text{D}}$ (4 à 6 x supérieur), de même que par l'incorporation relative. L'ajout de dopa non radioactif à la tyrosine- ^{14}C n'a pas d'effet sur l'incorporation dans la partie CDG, mais diminue de façon sensible la radioactivité spécifique de la partie acide bétalamique. En conséquence la radioactivité spécifique de la bétanine diminue proportionnellement.

L'ajout de tyrosine non-radioactive au dopa- ^{14}C augmente la vitesse d'internalisation du dopa- ^{14}C et conduit à une augmentation de la radioactivité spécifique des deux parties de la bétanine.

Tableau 8.5 : Répartition de la radioactivité dans la bétanine

incorporation relative dans la bétanine [%]	T*	T* (D)	D*	D* (T)
bétanine-partie CDG	33	54	6	7
bétanine-partie ac.bétalamique	67	46	94	93
bétanine	100	100	100	100

radioactivité spécifique [10^{12} dpm/mol]	T*	T* (D)	D*	D* (T)
bétanine-partie CDG	0.057	0.060	0.009	0.015
bétanine-partie ac.bétalamique	0.114	0.052	0.156	0.202
bétanine	0.170	0.112	0.165	0.217

Comme dans les expériences précédentes effectuées tant avec les racines qu'avec les cultures de cellules, la tyrosine est incorporée préférentiellement dans la partie CDG, ce qui confirme le bien fondé de notre système expérimental *in vitro* pour l'étude métabolique. L'apport de dopa ou de tyrosine respectivement à chacun des précurseurs radioactifs conduit à une adaptation sélective de la biosynthèse du CDG, de l'acide bétalamique et de la bétanine. Ces résultats valident l'existence même d'au moins deux compartiments métaboliques distincts de dopa et nous permettent de compléter le modèle métabolique proposé précédemment (schéma 6.3).

8.6. Effet de l'ajout des précurseurs sur les radioactivités spécifiques.

Dans notre approche, les radioactivités spécifiques des métabolites principaux ont été déterminée par radiochromatographie-HPLC en utilisant les paramètres UV-Vis pour la quantification des métabolites (nmol) et la détermination de la radioactivité en continu (cpm). Les résultats des analyses de la taille des réservoirs des métabolites principaux sont présentés dans le Tab. 8.6 et celles des radioactivités spécifiques après correction pour le rendement du comptage dans le Tab. 8.7.

Réservoirs : - Les tailles des réservoirs des métabolites respectifs sont très semblables entre les 4 expériences (Tab. 8.6, moyennes), ce qui témoigne de l'homogénéité des cultures. On remarquera la présence de quantités considérables, mais constantes de dopamine dans les cellules. L'ajout de

précurseur non radioactif n'a pas d'influence sur la taille des réservoirs de tyrosine ou de dopa.

Tableau 8.6 : Réservoirs des métabolites principaux mesurés par HPLC-UV-Vis.

Réservoirs [nmol/g PF]	T*	T* (D)	D*	D* (T)	Moyenne
tyrosine	938	868	827	862	874 ± 46
tyramine [#]	---	---	---	---	---
dopa	115	128	114	129	121 ± 8
dopamine	9067	8622	8597	8863	8787 ± 222
cyclodopa glucoside	355	366	327	368	354 ± 19
bétanine	220	204	205	220	213 ± 9

[#] le réservoir interne de tyramine est trop faible pour être quantifié dans nos conditions expérimentales par UV.

Radioactivités spécifiques: - Les vitesses d'internalisation des précurseurs radioactifs dans les cultures respectives ont une influence sur les radioactivités spécifiques. Il est cependant possible d'évaluer directement les expériences avec la tyrosine-¹⁴C seule ou avec ajout de dopa non radioactif car les vitesses d'internalisation sont pratiquement identiques dans ces deux conditions expérimentales. Une diminution sensible des radioactivités spécifiques du CDG et de la bétanine est constatée (Tab. 8.7), ce qui corrobore les observations effectuées avec les incorporations relatives.

Tableau 8.7 : Radioactivités spécifiques des métabolites principaux.

Radioactivité spécifique [dpm*10 ¹² /mol]	T*	T* (D)	D*	D* (T)
tyrosine	1.781	1.954	0.000	0.000
tyramine [#]	---	---	---	---
dopa	1.841	2.279	3.639	4.033
dopamine	0.096	0.090	0.196	0.218
cyclodopa glucoside	0.142	0.109	0.052	0.050
bétanine	0.178	0.136	0.165	0.224

[#] le réservoir interne de tyramine est trop faible pour être quantifié dans nos conditions expérimentales par UV.

Normalisation et calcul des rapports des radioactivités spécifiques : - les faibles variations entre expériences de la taille respective des réservoirs des métabolites principaux (Tab. 8.6) nous autorisent une comparaison des différentes expériences entre elles après normalisation selon la formule 2.

Cette normalisation conduit aux rapport des radioactivités spécifiques tenant compte des apports à vitesse différente des précurseurs respectifs.

Formule 2

$$[\text{rapport normalisé}] = \frac{\text{Rad. spécif. métabolite [tyr-}^{14}\text{C]}}{\text{Rad. spécif. métabolite [dopa-}^{14}\text{C]}} \times \frac{\text{vitesse [dopa-}^{14}\text{C]}}{\text{vitesse [tyr-}^{14}\text{C]}}$$

(Les termes du numérateur de la première fraction sont regroupés sous 'valeurs Tab. 8.7' et les termes du numérateur de la seconde fraction sous 'valeurs Tab. 8.8')

Tableau 8.8 : Rapports des radioactivités spécifiques dans les métabolites normalisés par les vitesses d'internalisation des précurseurs selon la formule 2.

Rapport des radioactivités spécifiques normalisées	T* / D*	T* (D) / D*	T* / D*(T)	T*(D) / D*(T)
dopa	0.29	0.38	0.37	0.49
dopamine	0.28	0.28	0.35	0.35
cyclodopa glucoside	1.55	1.27	2.27	1.86
bétanine	0.61	0.50	0.64	0.53

Vitesse internalisation				
tyrosine- ¹⁴ C en dpm*g ⁻¹ *min ⁻¹	188.6 x 10 ³	176.5 x 10 ³	188.6 x 10 ³	176.5 x 10 ³
dopa- ¹⁴ C en dpm*g ⁻¹ *min ⁻¹	107.7 x 10 ³	107.7 x 10 ³	152.2 x 10 ³	152.2 x 10 ³
rapport des vitesses	1.75	1.64	1.24	1.16

On peut constater que les tendances observées avec la répartition centésimale normalisée sont semblables. En bref, l'ajout de dopa non radioactif à la tyrosine-¹⁴C diminue légèrement les rapports des radioactivités spécifiques normalisées dans le CDG (1.55 → 1.27) et la bétanine (0.61 → 0.50), avec une baisse correspondante de leurs radioactivités spécifiques respectives (Tab. 8.7), alors que le rapport dopamine reste constant.

L'ajout de tyrosine non radioactive à dopa-¹⁴C contribue à augmenter les rapports de dopa, dopamine et CDG, mais n'affecte que de peu la bétanine.

8.7. Biodilutions internes.

Une des approches possibles pour évaluer l'efficacité avec laquelle un précurseur est transformé en métabolite est la biodilution, paramètre sans

dimension, qui a déjà été définie précédemment (Chap. 6.3). Nous avons choisi de présenter dans ce chapitre les valeurs de biodilution interne, c'est à dire le rapport entre la radioactivité spécifique du produit précédent le métabolite et la radioactivité spécifique du métabolite lui même.

$$\text{Biodilution interne (A} \rightarrow \text{B)} = \frac{\text{Radioactivité spécifique A}}{\text{Radioactivité spécifique B}}$$

Cette façon de procéder ne nécessite pas de recourir à une normalisation, mais elle reste d'ordre qualitatif car elle fortement influencée par la taille des réservoirs endogènes des métabolites. La très grande similitude des réservoirs des métabolites respectifs dans les quatre expériences nous permet d'exploiter cette approche. Pour une biotransformation donnée, une valeur de biodilution basse indique une grande efficacité de l'étape métabolique concernée.

Dans notre démarche nous nous intéresserons plus particulièrement aux biotransformations suivantes: T→D, D→DA, D→CDG et CDG→CDG_{bétanine} dont les valeurs de biodilution sont présentées dans le Tab. 8.9.

Tableau 8.9: Biodilutions internes

Biodilutions internes	T*	T* (D)	D*	D* (T)
tyrosine --> dopa	1.0	0.9	---	---
dopa --> dopamine	19	25	19	19
dopa --> CDG	13	21	70	80
CDG --> CDG_{bétanine}	2.5	1.8	5.8	3.3

La biodilution dopa → CDG des expériences T* et T*(D) est très nettement inférieure à celles calculées pour D* et D*(T) indicateur d'une efficacité 4 à 5 x supérieure à partir de tyrosine-¹⁴C. L'ajout de dopa à la tyrosine-¹⁴C fait passer les valeurs de 13 à 21, alors que l'effet de l'ajout de tyrosine sur dopa-¹⁴C est moindre.

Le même raisonnement appliqué cette fois à la biodilution CDG → CDG_{bétanine} montre que le CDG_T (2.5) s'incorpore mieux dans la bétanine que le CDG_D (5.8). L'ajout des précurseurs non radioactifs fait baisser les deux valeurs.

8.8. Conclusions.

L'objectif de cette étude était de vérifier si la présence simultanée des deux précurseurs tyrosine et dopa pouvait entraîner un effet de compétition et d'en apprécier les éventuels effets sur l'internalisation des précurseurs et leur incorporation relative dans les métabolites.

L'ajout de dopa n'influence pratiquement pas la vitesse d'internalisation de la tyrosine-¹⁴C, mais par contre induit une adaptation sélective de la biosynthèse du CDG, de l'acide béta-lamique et de la bétanine.

L'apport de tyrosine augmente la vitesse d'internalisation de dopa-¹⁴C conduisant à une adaptation à la hausse de l'internalisation dans tous les métabolites.

L'effet des précurseurs non radioactifs ajoutés est visible jusque dans les parties CDG et acide béta-lamique de la bétanine, avec dans le cas de T*(D), une baisse marquée de l'internalisation dans l'acide béta-lamique. Dans le cas de D*(T), on observe une augmentation parallèle dans les deux parties de la bétanine.

Tyrosine: le précurseur tyrosine pénètre dans la cellule. Une petite partie est utilisée pour la synthèse des protéines et de composants de la paroi cellulaire. Une partie de la tyrosine est décarboxylée en tyramine. La large majorité est oxydée en dopa dans le compartiment (1) qui est alimenté principalement par la tyrosine. Le flux de dopa(1) passe alors majoritairement dans le compartiment dopa(2) où il subit une décarboxylation qui conduit à la dopamine (métabolite principal); une partie de dopa(2) subit un clivage extra-diol et cet intermédiaire cyclise spontanément pour former l'acide béta-lamique. Dans une dernière étape le CDG formé préférentiellement à partir de dopa(1) et l'acide béta-lamique provenant de dopa(2) sont condensés en bétanine qui se retrouve confinée dans les vacuoles.

Dopa: le précurseur dopa pénètre dans la cellule. Une petite partie est utilisée pour la synthèse de composants des parois ou d'autres composés. La large majorité accède au compartiment dopa(2) pour y être soit décarboxylée

en dopamine (métabolite principal), soit transformée en acide bétalamique. Une petite partie de dopa(2) arrive dans le compartiment dopa(1): nous proposons un échange entre les deux compartiments de dopa avec un flux orienté majoritairement (1) \rightarrow (2), bien que dopa puisse arriver directement dans le compartiment dopa(1) sans passer par dopa(2). Seule une petite partie de dopa peut être convertie en CDG. La bétanine est alors formée de la même façon au sein de la vacuole.

Ces résultats valident l'existence même d'au moins deux compartiments métaboliques distincts de dopa. Les flux de précurseurs (tyrosine et dopa) entre les compartiments sont illustrés par un modèle métabolique (Chap. 10, schéma 10.1) intégrant l'ensemble des résultats obtenus.

9. Expérience d'incorporation en présence d'un inhibiteur de la dopa-décarboxylase, la 2-(fluorométhyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine (MFMD).

9.1. Le motif de l'étude.

L'hypothèse de la présence de deux réservoirs métaboliquement distincts de dopa nous a paru confirmée par les résultats des trois précédentes séries d'expériences. L'existence de deux compartiments métaboliques, dopa(1) qui alimente préférentiellement la voie biosynthétique du cyclodopa glucoside et dopa(2) qui conduit préférentiellement à la dopamine et à l'acide béta-lamique et dans une moindre mesure vers le CDG, est clairement mis en évidence par:

- Les rapports des incorporations centésimales dans le dopa et le CDG à partir des deux précurseurs qui sont en faveur de la tyrosine comme précurseur préférentiel du CDG.
- Les incorporations relatives dans la partie CDG et l'acide béta-lamique constituant la bétanine sont également en faveur de la tyrosine comme précurseur préférentiel du CDG.
- L'ajout de précurseur non radioactif simultanément au précurseur radioactif perturbe les compartiments de dopa(1) et respectivement dopa(2) et accroît les différences observées.

Une autre approche de cette étude compartimentale consiste à essayer de bloquer avec un inhibiteur de la dopa-décarboxylase la voie métabolique conduisant de dopa à dopamine.

L'objectif principal que nous proposons pour une telle expérience est de bloquer le flux de dopa vers la dopamine et d'en mesurer l'impact sur l'incorporation dans le CDG libre et dans la partie CDG de la bétanine.

9.2. Le MFMD.

Les acides aminés α -fluorométhylés [69] et en particulier l' α -fluoroalanine sont de puissants inhibiteurs des enzymes dépendant du phosphate de pyridoxal (PP), tel l'alanine racémase bactérienne. Ce type de substance a montré des propriétés d'inhibition irréversible (inactivateur suicide) dépendantes du temps [70]. Les α -acides aminés, α -fluorométhylés ont montré un potentiel élevé comme inactivateur suicide des décarboxylases [69]. Les α -acides aminés, α -fluoro-méthylés sont de bons substrats pour ces enzymes et la taille du fluor étant proche de celle de l'hydrogène, les problèmes stériques au niveau du site catalytique de l'enzyme ne devraient pas être un handicap [71].

La 2-(fluorométhyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine (MFMD, Merrell-Dow] est un inhibiteur irréversible et à action rapide, stéréospécifique de la décarboxylase des acides aminés aromatiques (EC 4.1.1.28) appelée également dopa-décarboxylase. Les auteurs [71] ont démontré que la dopa-décarboxylase de porc traitée avec le MFMD subit une perte rapide de son activité catalytique au cours du temps. L'inhibition est dépendante du temps et de la présence de phosphate de pyridoxal (PP) dans le mélange réactionnel. L'inactivation de cet enzyme est irréversible. La présence de (S)- α -méthyl-(L)-dopa (méthyldopa) dans le mélange réactionnel retarde de façon importante l'inactivation de l'enzyme: le méthyldopa joue le rôle d'un inhibiteur compétitif pour le MFMD. La dopa-décarboxylase, en présence de MFMD et de PP, est inactivée à 93 % en 30 min; en présence de 4 mM de méthyldopa, de MFMD et de PP, la diminution de l'activité enzymatique est seulement de 30 % en 30 min (50% en 60 min).

Le MFMD, disponible au moment des expériences, nous a paru être l'inhibiteur idéal pour essayer de comprendre le rôle joué par dopa dans la biosynthèse du cyclodopa glucoside. En effet, la majeure partie de dopa, respectivement de tyrosine radioactifs sont décarboxylés respectivement en dopamine et en tyramine. Une inhibition sélective de la décarboxylation de ces deux acides aminés pourrait perturber les compartiments de dopa et ainsi modifier la répartition centésimale de la radioactivité dans les

métabolites tels le CDG et la bétanine.

9.3. Expérience d'inhibition.

Les conditions expérimentales standardisées mises en place ont pour objectif de minimiser l'impact des variables expérimentales en partant d'une suspension cellulaire unique et homogène, répartie entre les 4 expériences en maintenant constant le volume de milieu de culture et le poids frais des cellules (3 g).

L'étude sera réalisée dans des conditions quasi-stationnaires, avec une durée d'incubation courte (30 min). La concentration de dopa-¹⁴C est dans cette série expérimentale 1.7 ± 0.1 fois supérieure à celle de la tyrosine-¹⁴C dans une tentative d'harmonisation des quantités de précurseurs internalisées par les cellules.

Dans le premier groupe d'expériences, les précurseurs radioactifs sont ajoutés seuls et dans le second groupe une précubation de 60 min avec l'inhibiteur de la dopa décarboxylase (MFMD) est effectuée préalablement à l'ajout des précurseurs radioactifs.

Les paramètres suivants sont mesurés: a) l'internalisation des précurseurs radioactifs par les cellules; b) la radioactivité extraite des cellules; c) la répartition centésimale de la radioactivité entre les métabolites principaux et leur radioactivité spécifique; d) la répartition de la radioactivité entre les deux parties de la bétanine.

9.4. La cinétique d'internalisation.

La linéarité de l'absorption des deux précurseurs en fonction du temps dans les expériences d'incubation ne dépassant pas une heure a été démontrée dans l'expérience de compétition et celle d'incorporation simultanée de tyrosine-³H et de dopa-¹⁴C. Dans ces séries d'expériences, la tyrosine montrait systématiquement une vitesse d'absorption 1.6 à 1.8 x supérieure, à celle de dopa (à concentration égale) et pour tenir compte de cette différence, nous avons maintenu la concentration de dopa à 40 mM et diminué la concentration en tyrosine de 40 % (1.7x). L'estimation des

vitesse d'absorption dans cette série de 4 expériences est obtenue par calcul des différences d'activité dans les milieux dans l'intervalle 1 min à 30 min (début et fin de l'incubation). Les vitesses d'absorption sont présentées dans le Tab. 9.1.

L'inhibiteur n'affecte pas l'internalisation des précurseurs (tyrosine: +5% et dopa +6 %). La concentration moindre de la tyrosine dans le milieu a donc eu l'effet escompté, puisque la vitesse d'absorption de dopa-¹⁴C est environ 30% supérieure à celle de la tyrosine-¹⁴C dans les deux groupes d'expériences.

9.5. Absorption par les cellules et analyse de la répartition centésimale dans les extraits.

L'internalisation de la tyrosine-¹⁴C par les cellules est inférieure d'environ 10% à celle de dopa-¹⁴C comme en témoigne la radioactivité totale extraite des cellules (Tab. 9.1). Le MFMD n'affecte pas l'internalisation des précurseurs dans les extraits, ce qui est important pour l'interprétation des résultats.

Les résultats des analyses des métabolites dans les extraits concentrés après séparation par radiochromatographie HPLC (Fig. 9.1) sont présentés en pourcentage de la radioactivité extraite des cellules dans le Tab. 9.2.

Expériences contrôle sans inhibiteur.

tyrosine-¹⁴C: on constate une grande similitude avec les résultats obtenus avec les expériences précédentes effectuées au temps inférieurs à 60 min et en particulier dans l'expérience de compétition (20 min). La tyrosine et la dopamine restent les deux composés à marquage élevé. Ensemble, ils représentent près de 75% de la radioactivité extraite des cellules. Les autres métabolites sont compris entre 3 et 6%.

dopa-¹⁴C: de même nous constatons une similitude avec les expériences précédentes, avec près de 75% du marquage dans la dopamine, 10% dans la dopa et seulement 1.6 % dans le CDG (quantité inférieure à celle provenant de la tyrosine), avec une valeur relative de la bétanine proche de celle

observée avec la tyrosine.

Expériences avec inhibiteur.

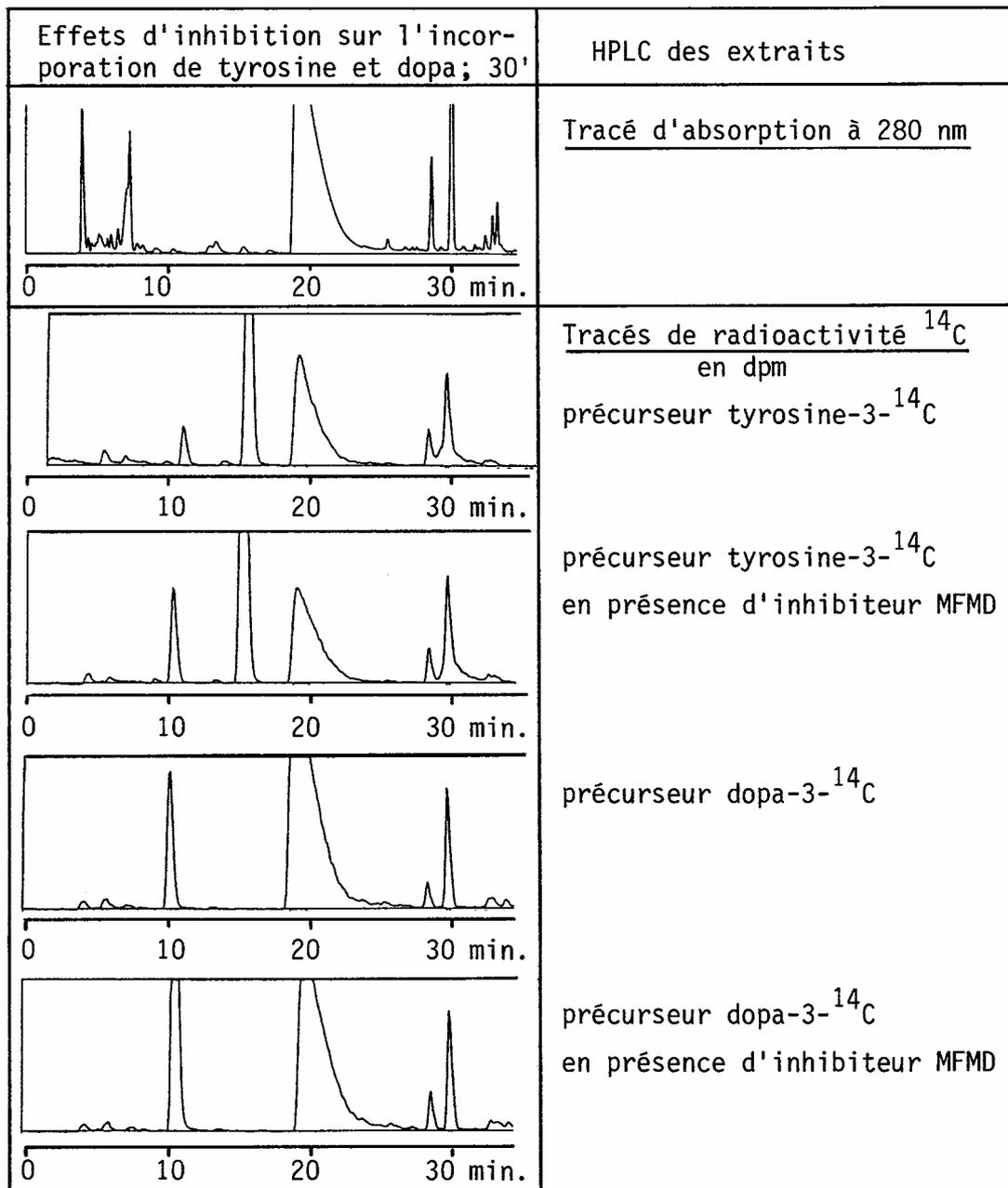
Le MFMD influence la répartition centésimale dans dopa, dopamine et CDG avec les deux précurseurs radioactifs. Son effet est globalement plus important sur la dopa-¹⁴C que sur la tyrosine-¹⁴C.

tyrosine-¹⁴C + MFMD: les effets de cet inhibiteur de la dopa-décarboxylase sont une augmentation des valeurs centésimales de la tyrosine (+20%) et de dopa (+50%) et respectivement une baisse de dopamine (-30%) et du CDG (-40%). Les valeurs de bétanine et tyramine restant stables (variation <10%).

dopa-¹⁴C + MFMD: on observe une augmentation des valeurs centésimales de dopa (+313%) et du CDG (+28%) et respectivement une baisse de dopamine (-30%). Les valeurs de bétanine restant stables (variation <10%).

Les rapports des répartitions centésimales dans les métabolites ne tiennent pas compte des différences de vitesse d'internalisation des précurseurs. La formule 1 permet de normaliser les rapports des répartitions centésimales en fonction des différentes vitesses d'internalisation dans les 4 expériences afin de les comparer entre elles. Ces rapports normalisés sont présentés dans le Tab. 9.3.2.

Figure 9.1 Exemple de profil UV à 280 nm et radiochromatographie des 4 extraits.



Attribution des pics selon Fig 3.2, p.21

Tableau 9.1: Débit d'internalisation normalisée de la radioactivité et radioactivité totale extraite.

Extrait et débit	T*	T* + MFMD	D*	D* + MFMD
débit d'internalisation normalisé dpm*10 ³ *g ⁻¹ *min ⁻¹	0.299	0.315	0.391	0.415
extrait total dpm*10 ⁶	27.91	31.12	31.32	33.95

Tableau 9.2: Répartition centésimale de la radioactivité extraite sur les métabolites.

Métabolites [% de l'extrait]	T*	T* + MFMD	D*	D* + MFMD
tyrosine	40.24	48.42	0.00	0.00
tyramine	5.90	5.56	0.00	0.00
dopa	3.24	6.55	10.58	33.09
dopamine	35.50	27.32	75.90	53.37
cyclodopa glucoside	3.29	2.34	1.61	2.06
bétanine	5.09	4.93	6.90	6.24

Tableau 9.3.1: Rapports des radioactivités des extraits et des débits d'internalisation.

Rapports extraits et débits	T* / D*	T* +MFMD	D* / D* +MFMD	T* +MFMD / D* +MFMD
radioactivité dans les extraits	0.90	0.92	0.89	0.92
des débits de radioactivité	0.76	0.95	0.94	0.76
extraits/débits	1.18	0.97	0.95	1.21

Tableau 9.3.2: Rapports d'incorporations relatives des précurseurs (avec et sans MFMD).

Rapport incorporation relatif	T* / D*	T* / T* +MFMD	D* / D* +MFMD	T* +MFMD / D* +MFMD
dopa	0.36	0.47	0.31	0.24
dopamine	0.55	1.23	1.39	0.62
cyclodopa glucoside	2.38	1.33	0.76	1.36
bétanine	0.86	0.98	1.08	0.95

(formule 1) rapport d'incorporation relative =

$$\frac{\text{métabolite EXP1\%}}{\text{métabolite EXP2\%}} \times \frac{\text{extrait EXP1*}}{\text{extrait EXP2*}} \times \frac{\text{débit EXP2*}}{\text{débit EXP1*}}$$

Comparaison T* / D* (référence): L'incorporation de la tyrosine-¹⁴C dans le CDG est plus importante qu'avec dopa-¹⁴C ce qui confirme les observations des précédentes séries d'expériences sur l'analyse compartimentale, l'incorporation simultanée de tyrosine-³H et dopa-¹⁴C et l'expérience de compétition.

Comparaison T* / T* + MFMD: En présence de MFMD, la dopa (rapport 0.47) issu de la tyrosine-¹⁴C s'accumule, très probablement en raison de l'inhibition de sa décarboxylation en dopamine et parallèlement, le rapport est élevé pour la dopamine (rapport 1.23) ce qui indique une baisse de la quantité de précurseur radioactif atteignant ce compartiment. Le CDG baisse également comme l'indique sont rapport (rapport 1.33). Ce dernier résultat peut paraître contradictoire avec l'hypothèse de deux compartiments de dopa. Une explication possible est que ce dopa supplémentaire s'accumule dans le compartiment dopa(2) sans retour vers le compartiment dopa(1) voir schéma 9.1.

Comparaison D* / D* + MFMD: L'inhibition de la dopa-décarboxylase conduit à la baisse de la quantité de dopamine-¹⁴C (rapport 1.39) et il en résulte une accumulation de dopa (rapport 0.31) qui correspond à une augmentation d'un facteur > 3x de la concentration de dopa-¹⁴C par rapport à la référence sans MFMD. L'incorporation dans le CDG (rapport 0.76) augmente (même si la radioactivité spécifique de CDG^{D*} reste faible par rapport à CDG^{T*}) suggérant un échange entre les compartiments de dopa(2) et dopa(1).

Comparaison D* + MFMD / T* + MFMD: Lorsqu'on compare les rapports d'internalisation relatifs des deux expériences avec MFMD avec les rapports correspondants des expériences sans MFMD (référence) on observe surtout des changements pour le CDG (rapport 2.38 → 1.36) et dans une moindre mesure pour dopa (rapport 0.36 → 0.24). L'impact sur dopamine est similaire.

9.6. Répartition du marquage dans la bétanine.

L'analyse de la répartition de la radioactivité dans la bétanine (partie CDG et partie acide bétalamique) a été effectuée sur les produits purifiés après clivage de la bétanine en cyclodopa glucoside et en acide bétalamique, suivie par la condensation de l'acide bétalamique avec la proline pour former l'indicaxanthine. Les résultats des radioactivités spécifiques et des incorporations relatives sont présentés dans le Tab. 9.5.

Tableau 9.5 : Répartition de la radioactivité dans la bétanine.

incorporation relative dans la bétanine [%]	T*	T* + MFMD	D*	D* + MFMD
bétanine-partie CDG	32	20	7	9
bétanine-partie ac.bétalamique	68	80	93	91
bétanine	100	100	100	100

radioactivité spécifique [10 ¹² dpm/mol]	T*	T* + MFMD	D*	D* + MFMD
bétanine-partie CDG	0.255	0.131	0.075	0.108
bétanine-partie ac.bétalamique	0.542	0.536	0.949	1.095
bétanine	0.755	0.735	1.178	1.388

Tryosine-¹⁴C + MFMD. - L'incorporation relative dans la partie CDG de la bétanine et sa radioactivité spécifique diminuent fortement en présence de MFMD. Ceci est indéniablement la conséquence directe de la baisse de l'incorporation dans le réservoir de CDG libre. L'internalisation relative dans la partie acide bétalamique augmente en proportion avec une radioactivité spécifique qui reste inchangée. Ce dernier résultat renforce notre concept de l'existence d'au moins deux compartiments de dopa distincts.

Dopa-¹⁴C + MFMD. – En présence de MFMD, l'incorporation relative et surtout la radioactivité spécifique du CDG augmentent légèrement. La radioactivité supplémentaire dans le réservoir de CDG est en relation directe avec l'augmentation mesurée dans la partie correspondante de la bétanine. En revanche celle de l'acide bétalamique n'est que peu modifiée, ce qui est une preuve de la nature compartimentale de réservoirs de dopa à biodisponibilité différentielle.

Comme observé précédemment, l'incorporation à partir de la tyrosine-¹⁴C dans le CDG et dans la partie correspondante de la bétanine est clairement préférentielle par rapport à dopa-¹⁴C. L'existence de compartiments métaboliques distincts de dopa (dopa(1) et dopa(2)) dotés de capacités d'échange et modulables est confirmé par les analyses de la répartition dans la bétanine.

9.7. Effet de l'ajout des précurseurs sur les réservoirs et les radioactivités spécifiques.

Les radioactivités spécifiques des métabolites principaux déterminée par radiochromatographie-HPLC utilisent les paramètres UV-Vis pour la quantification des métabolites (nmol) et la détermination de la radioactivité en continu (cpm). Les valeurs des réservoirs des métabolites principaux sont présentés dans le Tab. 9.6 et celles des radioactivités spécifiques après correction pour le rendement du comptage dans le Tab. 9.7.

Réservoirs des métabolites : - Les tailles des réservoirs des métabolites respectifs sont très semblables entre les 4 expériences (Tab. 9.6), ce qui témoigne de l'homogénéité des cultures. Le réservoir de dopamine est de très grande taille (moyenne de 6662 nmol/g PF). CDG (351 nmol/g PF) et de bétanine (467 nmol/g PF) ont des tailles voisines. Fait remarquable, seule la taille du réservoir de dopa dans l'expérience D* + MFMD augmente, ce qui est une confirmation directe de l'effet de cet inhibiteur. L'augmentation d'un facteur 3 x du réservoir cellulaire de dopa (par rapport à l'expérience T* et T*+MFMD) a un impact direct sur la radioactivité spécifique calculée qui baisse d'autant.

L'action du MFMD est différentielle selon l'origine de la source de dopa. Le réservoir reste stable avec la tyrosine-¹⁴C alors qu'il triple avec dopa-¹⁴C. Ces faits expérimentaux sont des indices supplémentaires de la nature complexe des compartiments de dopa.

Tableau 9.6: Réservoirs des métabolites principaux mesurés par HPLC-UV-Vis.

RÉSERVOIRS nmol/g PF	T*	T* + MFMD	D*	D* + MFMD	Moyenne
tyrosine	132	115	98	110	114 ± 14
tyramine #	---	---	---	---	---
dopa	20	20	29	62	33 ± 20
dopamine	6600	6674	6855	6520	6662 ± 143
cyclodopa glucoside	326	362	344	371	351 ± 20
bétanine	476	458	473	460	467 ± 9

le réservoir interne de tyramine est trop faible pour être quantifié dans nos conditions expérimentales par UV.

Radioactivités spécifiques: - La faible incidence du MFMD sur la vitesse d'internalisation des précurseurs respectifs nous permet de comparer directement les radioactivités spécifiques des deux expériences avec tyrosine-¹⁴C et respectivement les deux expériences avec dopa-¹⁴C. Les résultats sont présentés dans le Tab. 9.7.

Tyrosine-¹⁴C + MFMD: - Un des effets de l'inhibiteur est clairement une accumulation interne du précurseur sous la forme de tyrosine, respectivement de dopa radioactifs qui contribue à l'augmentation spectaculaire de leurs radioactivités spécifiques. Cela s'explique par la diminution de la décarboxylation de dopa. Paradoxalement celle du CDG diminue, de même que celle de la partie correspondante de la bétanine que nous avons présentée dans le Tab. 9.5.

Dopa-¹⁴C + MFMD: - On observe une augmentation spectaculaire de la radioactivité spécifique en présence de MFMD. La répercussion sur le CDG est relativement faible, ce qui serait un indicateur de la biodisponibilité différente de cette dopa compartimentalisée.

Tableau 9.7 : Radioactivités spécifiques des métabolites principaux.

radioactivité spécifique [dpm*10 ¹² /mol]	T*	T* + MFMD	D*	D* + MFMD
tyrosine	28.23	44.60	---	---
tyramine #	---	---	---	---
dopa	14.64	34.59	37.48	61.51
dopamine	0.50	0.43	1.12	0.94
cyclodopa glucoside	0.81	0.62	0.44	0.60
bétanine	0.99	1.14	1.48	1.56

le réservoir interne de tyramine est trop faible pour être quantifié dans nos conditions expérimentales par UV.

9.8. Biodilution interne.

L'approche par les biodilutions internes des flux métaboliques entre deux composé qui sont métaboliquement consécutifs a déjà été abordée dans le Chap. 8.

Pour une biotransformation donnée, une valeur de biodilution interne basse indique une grande efficacité de l'étape métabolique concernée. Dans le Tab. 9.8 nous présentons les valeurs de biodilution des biotransformations suivantes: T→D, D→DA, D→CDG et CDG→CDG_{bétanine}.

Tableau 9.8: biodilutions internes.

Biodilutions internes	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + MFMD	$\frac{T^* + MFMD}{T^*}$	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + MFMD	$\frac{D^* + MFMD}{D^*}$
tyrosine --> dopa	1.9	1.3	0.7	---	---	---
dopa --> dopamine	29.4	79.8	2.7	33.4	65.5	2.0
dopa --> CDG	18.0	55.6	3.1	85.5	102.5	1.2
CDG --> CDG _{bétanine}	3.2	4.7	1.5	5.9	5.6	1.0

Tyrosine-¹⁴C et dopa-¹⁴C sans MFMD: Les valeurs de biodilution des deux expériences de contrôle incubées pendant 30 min avec les précurseurs sans MFMD sont parfaitement semblables avec celles des expérience de contrôles précédente réalisée sur 20 min (Chap. 8). La biodilution D→CDG est largement supérieure avec dopa comme précurseur que à partir de tyrosine

suggérant une biodisponibilité différente des deux précurseurs, ce qui en soit n'est pas une surprise par rapport aux résultats précédents.

Les effets du MFMD sont par contre très bien mis en évidence, mais l'interprétation des résultats est rendue plus délicate, car le MFMD engendre de par son action sur la dopa-décarboxylase une accumulation de dopa. Ceci nous place dans une situation où la comparaison des deux expériences par le calcul des biodilutions n'est pas idéale.

Tyrosine-¹⁴C + MFMD: la biodilution augmente de façon majeure entre dopa et dopamine (2.7x), CDG (3.1x) et CDG_{bétanine} (1.5x), ce qui indique d'une part que l'inhibiteur est efficace (dopamine ↘) et d'autre part que le flux de la synthèse du CDG diminue à partir du dopa.

Dopa-¹⁴C + MFMD: la biodilution dopa → dopamine (2x) augmente également mais dans une moindre mesure que celle des expériences tyrosine ± MFMD. Cette augmentation est inférieure à celle que nous attendions en raison de l'accroissement de la taille du réservoir de dopa (voir Tab. 9.6) qui a un impact direct sur la radioactivité spécifique. La biodilution du CDG (1.2x) n'augmente que marginalement ce qui indique une augmentation proportionnelle de l'activité spécifique de dopa et du CDG: il n'y aurait donc pas de changement de flux du compartiment de dopa(2) vers le compartiment de dopa(1).

9.9. Conclusions.

Le MFMD inhibe partiellement la dopa-décarboxylase dans les suspensions cellulaires de *Beta vulgaris*. Dans l'expérience avec dopa-¹⁴C comme précurseur, le blocage par le MFMD, d'une partie de l'activité de la dopa-décarboxylase est mis en évidence par l'accumulation de dopa par rapport à l'expérience contrôle, effectuée sans MFMD. En présence de l'inhibiteur, la radioactivité incorporée et la taille du réservoir de dopa augmentent de façon significative. La radioactivité spécifique du cyclodopa glucoside augmente parallèlement à celle de dopa. Simultanément, on observe une augmentation de l'incorporation dans la partie dihydroindolique de la bétanine; en effet, l'analyse de la répartition de la radioactivité dans

cette dernière montre une augmentation sensible de l'incorporation dans la partie CDG. Avec tyrosine- ^{14}C comme précurseur et en présence de l'inhibiteur, la radioactivité incorporée dans le réservoir de dopa augmente de façon significative, par contre l'incorporation dans le CDG diminue, ce qui est à notre avis un indicateur d'une biodisponibilité très différente entre les deux réservoirs de dopa. La baisse observée dans le CDG se manifeste dans la partie correspondante de la bétanine.

L'apport exogène des précurseurs tyrosine- ^{14}C , dopa- ^{14}C et de l'inhibiteur MFMD ajoutés en faible quantité dans le milieu extra-cellulaire sont des situations expérimentales. Le MFMD est déjà présent dans les cellules au moment de l'ajout des précurseurs au milieu de culture. Le modèle métabolique présenté dans les conclusions (Chap. 10, schéma 10.1) résulte de l'interprétation de l'ensemble de nos résultats.

Le MFMD perturbe les flux de dopa(1) et dopa(2) comme le montrent les résultats de l'accumulation de dopa radioactif dans les deux séries d'expériences. Nous essayerons de décrire les effets du MFMD sur les deux compartiments de dopa (1) et (2), qui joueraient on l'a vu précédemment des rôles différents au sein de la cellule.

Tyrosine + MFMD. - Le précurseur tyrosine pénètre dans la cellule. Une petite partie est utilisée pour la synthèse des protéines et de composants de la paroi cellulaire. Une partie de la tyrosine est décarboxylée en tyramine. La large majorité est oxydée en dopa dans le compartiment (1) qui est alimenté principalement par la tyrosine. Le flux de dopa(1) passe alors majoritairement dans le compartiment dopa(2). En présence de l'inhibiteur MFMD la décarboxylation de dopa en dopamine (métabolite principal) diminue, ce qui se traduit par une augmentation du dopa- ^{14}C dans le compartiment dopa(2); une partie de dopa(2) subit un clivage extra-diol et cet intermédiaire cyclise spontanément pour former l'acide bétalamique. Dans une dernière étape la quantité de CDG- ^{14}C formé préférentiellement à partir de dopa(1) diminue en présence de MFMD, ce que nous ne pouvons pas expliquer par ce modèle simplifié à deux compartiments. Le CDG

provenant de dopa(1) et l'acide bétalamique provenant de dopa(2) sont condensés en bétanine qui se retrouve confinée dans les vacuoles.

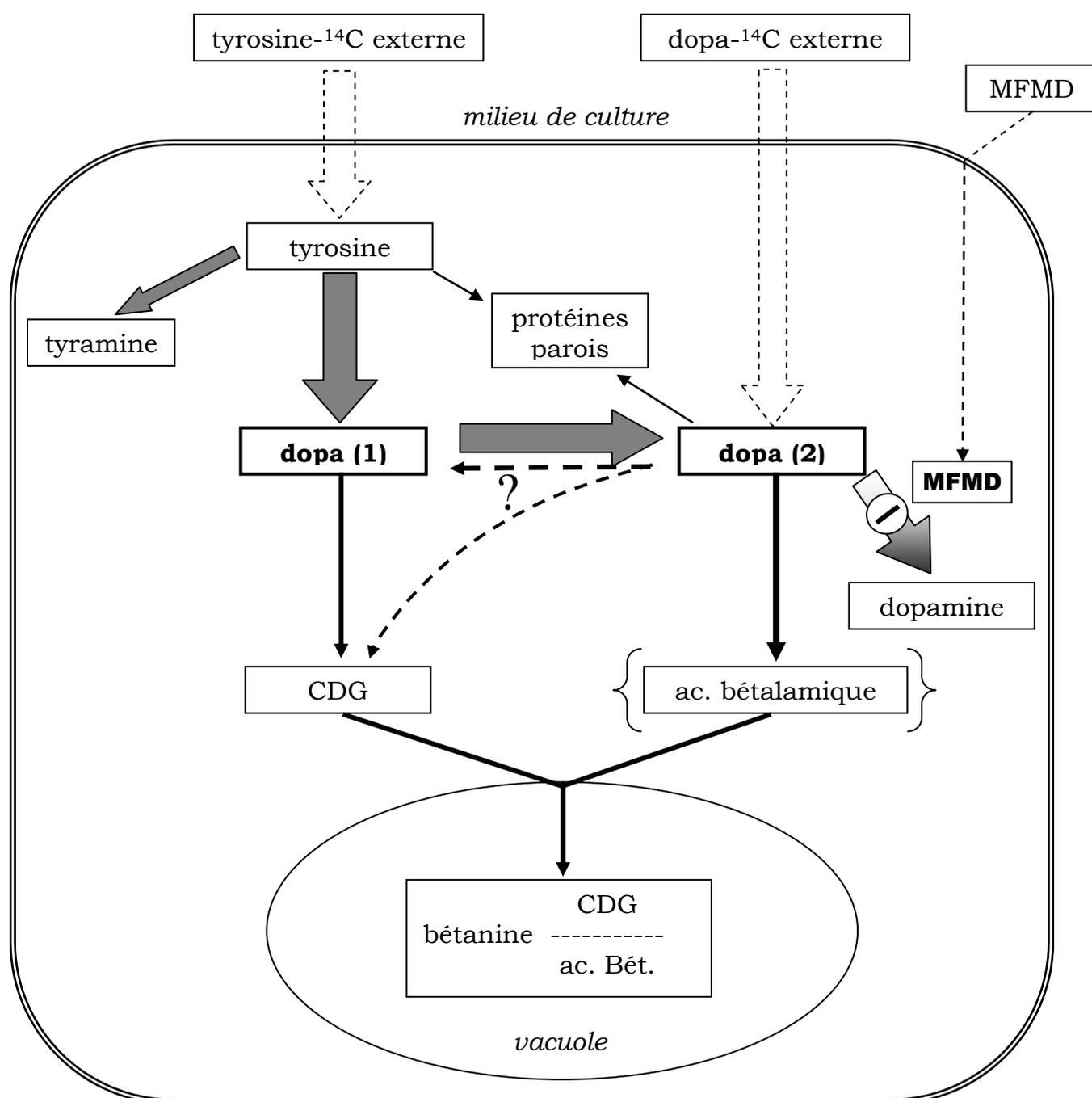
Dopa + MFMD. - Le précurseur dopa pénètre dans la cellule. Une petite partie est utilisée pour la synthèse de composants des parois ou d'autres composés. La large majorité accède au compartiment dopa(2) pour y être soit décarboxylée en dopamine (métabolite principal), soit transformée en acide bétalamique. La présence de l'inhibiteur MFMD bloque partiellement la décarboxylation en dopamine, entraînant une accumulation massive du précurseur radioactif dans le compartiment dopa(2). L'échange entre les deux compartiments de dopa est indiqué avec un flux orienté majoritairement (1) → (2). Seule une petite partie de dopa enrichi en dopa-¹⁴C grâce à l'action inhibitrice du MFMD passe de (2) à (1) pour être convertie en CDG, ce qui se traduit par l'augmentation de la radioactivité du CDG qui se dilue dans le réservoir de CDG. La bétanine est alors formée par condensation du CDG et de l'acide bétalamique au sein de la vacuole.

10. Modèle et conclusions.

10.1. Modèle.

Nous décrivons dans le schéma 10.1 un modèle métabolique tenant compte des résultats obtenus dans ce travail. Les chapitres ou paragraphes dont les résultats étayent les flux métaboliques illustrés dans le schéma 10.1 sont indiqués entre parenthèses.

Schéma 10.1. Esquisse du schéma métabolique et sa compartimentation



Légende du schéma 10.1: Dans ce modèle provisoire qui invoque l'existence de deux compartiments de dopa (1) et (2), on postule qu'ils ont des rôles différents au sein de la cellule. La dimension des flèches dans le schéma se veut le reflet des flux entre compartiments et entre métabolites.

L'apport exogène des précurseurs tyrosine-¹⁴C et dopa-¹⁴C ajoutés dans le milieu extracellulaire sont des situations expérimentales. Dans la nature ils sont synthétisés par la voie métabolique menant à la tyrosine: shikimate à chorismate à préphénate à tyrosine à dopa

Pour éviter toute induction d'un changement de régulation de la synthèse endogène de tyrosine et de dopa, les concentrations des précurseurs ajoutés au milieu de culture ont été choisies suffisamment basses.

Précurseurs et inhibiteur: Les flux importants des précurseurs tyrosine et dopa pénétrant dans la cellule sont symbolisés par des flèches en pointillé car ce sont des situations expérimentales. L'internalisation des précurseurs a été suivie par des études cinétiques 20 min (Chap. 8.3) et 3h (Chap. 6.3 c) et intermédiaires 30 min et 60 min (Chap. 7.2 et 9.5).

L'internalisation de l'inhibiteur de la dopa-décarboxylase MFMD dans les cellules est également symbolisé par une flèche en traitillé. Un cercle barré symbolise l'effet inhibiteur du MFMD sur la décarboxylation de dopa en dopamine (Chap. 9.5, 9.7 et 9.8).

Métabolites: La biotransformation de la tyrosine internalisée par les cellules est subdivisée en trois flux métaboliques. Les deux premiers flux sont minoritaires avec d'une part l'incorporation dans les protéines et parois et d'autre part la décarboxylation en tyramine (Chap. 6.3c, 7.4, 8.4, 9.5). Le troisième flux, de loin le plus important est l'oxydation de la tyrosine en dopa dans le compartiment dopa(1). Ce compartiment s'échange rapidement avec le compartiment dopa(2) qui se décarboxyle en dopamine (Chap. 6.3c, 7.4, 8.4, 9.5). L'étape compartimentale et l'étape métabolique sont symbolisées par de grandes flèches car la dopamine, identifiée comme métabolite principal (Chap. 4.2), est présente en concentrations très importantes dans la cellule (Chap. 8.6, 9.7, Exp. Tab. 8.6, Exp. Tab. 9.2).

Le cyclodopa glucoside est issu préférentiellement du compartiment dopa(1) comme l'illustrent les résultats obtenus (Chap. 6.3c, 7.4, 8.4, 9.5). Le flux de dopa(1) vers CDG est symbolisé par une flèche en trait plein alors que la

redondance métabolique est illustrée par des traitillés avec un point d'interrogation. L'acide bétalamique est indiqué entre parenthèses puisqu'il n'a pas été observé dans les cellules en culture (réservoir très petit); les résultats obtenus (Chap. 8.5, 9.6) suggèrent un lien préférentiel avec dopa(2) symbolisé par une flèche en trait plein.

Finalement l'assemblage des deux entités cyclodopa glucoside et acide bétalamique conduit à la bétanine qui est séquestrée dans la vacuole. L'assemblage est illustré par deux flèches convergeant vers la membrane vacuolaire. La répartition inégale dans les deux parties de la bétanine est confirmée par l'incorporation différentielle à partir des deux précurseurs (Chap. 5.3, 6.3, 8.5, 9.6).

Les réservoirs de dopa: Notre hypothèse sur l'existence de deux réservoirs de dopa métaboliquement distincts est confirmée par les résultats suivants:

- Toutes les expériences effectuées montrent que l'incorporation dans le CDG sous forme libre est supérieure à partir de la tyrosine qu'à partir de dopa donnés comme précurseurs. En particulier:
 - La modélisation de l'expérience cinétique indique un rapport des flux au moins 2 x supérieur vers le CDG dans l'expérience avec le précurseur tyrosine (Chap. 6.4).
 - Le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ du CDG est largement supérieur à celui de dopa (Chap. 7.4 et 7.6).
 - Les rapports des flux et les biodilutions internes dopa → CDG sont en faveur d'un compartiment dopa(1) dédié à la biosynthèse du CDG (Chap. 7.6, 8.7, 9.8).
 - L'ajout de précurseurs non radioactifs et d'un inhibiteur modulent l'incorporation dans les compartiments dopa(1) et dopa(2) et leurs échanges sont mis en évidence par des changements de l'incorporation dans le CDG et dans les deux parties de la bétanine (Chap. 8.4-8.7 et 9.6-9.8).

Ces résultats convergents nous conduisent à dessiner un équilibre des deux compartiments dopa(1) et dopa(2) en faveur de ce dernier.

CDG, acide bétalamique et bétanine: Le flux conduisant au CDG provient de dopa(1). Une flèche supplémentaire a été ajoutée sous la forme d'un flux direct de faible importance entre dopa(2) et CDG indiquant une redondance du métabolisme sous la forme de deux voies d'accès au CDG dont une est préférentielle (dopa(1) → CDG).

- L'incorporation dans la partie dihydroindole de la bétanine est favorisée à partir de la tyrosine (Chap. 6.3c, 8.5, 9.6 et Chap. 5.3) ce qui est une conséquence directe de la meilleure incorporation dans le réservoir de dopa(1) et nous conduit à mettre un flux dopa(1) → CDG → bétanine en trait plein.
- La taille du réservoir de CDG est importante (Chap. 8.6 et 9.7, Exp. Tab. 8.6 et 9.2), alors que celle de l'acide bétalamique est de très petite taille puisque nous ne le détectons pas, même avec notre méthode d'analyse. L'acide bétalamique a été détecté dans les racines de *Beta vulgaris* (Chap 4.1.5) comme dans d'autres plantes productrices de bétaxanthines et de bétacyanes [8]. L'absence d'acide bétalamique dans les suspensions cellulaires pourrait être expliquée par sa condensation, au fur et à mesure de sa formation, avec le cyclodopa glucoside. La réaction de condensation serait non-enzymatique [38] et compartimentée puisque la bétanine est confinée dans les vacuoles. La radioactivité spécifique plus élevée de la partie acide bétalamique de la bétanine pourrait être expliquée par la très petite taille du réservoir d'acide bétalamique, ce qui conduit à la quasi absence de dilution de dopa(2) → {acide bétalamique} → partie ac. bétalamique de la bétanine .
- L'influence des précurseurs non radioactifs tyrosine ajouté simultanément à dopa-¹⁴C et respectivement dopa ajoutés à la tyrosine-¹⁴C se manifeste par des changements sélectifs dans l'incorporation dans le CDG libre et respectivement la partie de CDG de la bétanine et l'acide bétalamique. L'internalisation supérieure dans le CDG à partir de la tyrosine n'est pas la conséquence d'un effet cinétique, mais bel et bien d'un effet de compartimentation.

- La biodisponibilité différente de dopa et tyrosine comme source de dopa pour la synthèse des entités CDG et acide bétalamique est mise en évidence par l'inhibition sélective de la dopa-décarboxylase par le MFMD.
- L'étude des biodilutions dans les expériences effectuées en conditions quasi-stationnaires, en particulier compétition et inhibition avec le MFMD, suggèrent une forte compartimentation métabolique.

10.2. Conclusions.

L'étude des voies métaboliques conduisant à la bétanine dans des cultures de *Beta vulgaris* L. par incorporation de tyrosine et de dopa a fait l'objet de nos recherches.

Le travail préliminaire effectué avec des racines de *Beta vulgaris* L. nous a mis sur la piste d'un intermédiaire nouveau le cyclodopa glucoside (CDG), abondamment présent dans les jeunes racines et également dans des racines plus âgées, mais en moindre quantité.

Il faut mentionner que le CDG n'a pas été isolé sous sa forme libre avant nos travaux. Nos essais d'incorporation de jeunes racines de *Beta vulgaris* avec dopa-¹⁴C et tyrosine-¹⁴C ont démontré que le CDG était un intermédiaire biosynthétique à part entière. La présence de CDG va de pair avec celle de l'acide bétalamique qui a été également isolé comme métabolite sous forme libre. Une incorporation inégale du marquage est observée dans les deux parties de la bétanine (CDG et acide bétalamique).

L'étude de l'incorporation préférentielle de la tyrosine, par rapport à dopa, dans le CDG et dans la bétanine a été effectuée avec des cultures de cellules en suspension *in vitro* productrices de bétanine.

Les suspensions cellulaires de *Beta vulgaris* L. sélectionnées pour leur teneur élevée en bétanine ont été standardisées. Un système d'analyse HPLC performant capable de séparer en une seule étape les métabolites avec quantification par détection spectrophotométrique UV-Vis suivie de la mesure de la radioactivité en continu a été développé.

Les premières études d'incorporation des précurseurs dopa-¹⁴C et tyrosine-¹⁴C que nous avons menées avec les suspensions cellulaires ont confirmé l'existence du CDG comme intermédiaire biosynthétique sur la voie conduisant de la tyrosine et de dopa à la bétanine, avec une incorporation préférentielle à partir de la tyrosine.

La présence de CDG radiomarké sous forme libre en quantité importante dans les cellules indique que la glycosylation a lieu avant l'étape de condensation avec l'acide bétalamique conduisant à la bétanine. L'acide bétalamique n'a pas été observé sous forme libre dans les cultures de cellules.

Le métabolite le plus important est la dopamine, issue de la décarboxylation de dopa par l'enzyme dopa-décarboxylase. La concentration cellulaire de dopamine est très élevée, dépassant de loin le seuil des autres métabolites. Selon la durée des incubations avec les précurseurs tyrosine ou dopa, 25 à 80% de la totalité de la radioactivité internalisée par les cellules sont incorporés dans la dopamine. En contraste, la tyramine se trouve en quantité beaucoup plus faible parce que d'autres voies métaboliques concurrencent la décarboxylation de la tyrosine.

Le jeu des compartiments métaboliques a été étudié selon 4 approches:

- Dans une première approche cinétique, nous avons suivi au cours du temps (3 h) l'évolution des internalisations relatives de tyrosine et dopa radioactifs dans les métabolites principaux: tyrosine, dopa tyramine, dopamine, CDG et bétanine. Plusieurs modèles mathématiques ont été testés pour essayer de simuler, à partir des données expérimentales, l'évolution de l'incorporation relative dans les métabolites respectifs. Cette étude cinétique simulant à partir d'un seul compartiment de dopa la biosynthèse de la dopamine, de l'acide bétalamique, du CDG et leur assemblage en bétanine démontre que la constante de vitesse de la biotransformation dopa → CDG est supérieure dans le modèle à partir de la tyrosine-¹⁴C que à partir de dopa-¹⁴C comme précurseur. Cette simulation nous a conduit à envisager l'existence d'un second compartiment de dopa permettant d'expliquer l'incorporation différentielle de tyrosine et de dopa dans le CDG et dans la partie dihydroindolique de la bétanine.

Des conditions expérimentales stationnaires avec une internalisation dans les cellules linéaire au cours du temps ont été recherchées dans les trois autres expériences afin de pouvoir procéder à une étude compartimentale.

- L'incubation des cultures simultanément avec la tyrosine-³H et dopa-¹⁴C effectuée avec peu de cellules et en conditions quasi-stationnaires a clairement mis en évidence une incorporation préférentielle de la tyrosine dans le CDG avec un rapport ³H/¹⁴C du CDG supérieur au rapport ³H/¹⁴C de dopa.

- Les expériences de compétition effectuées sur 20 min en présence des deux précurseurs en quantité équimolaires, l'un marqué au ¹⁴C et l'autre non radioactif, ont démontré une incorporation préférentielle de la tyrosine-¹⁴C dans le CDG et dans la partie dihydroindole de la bétanine. L'apport de tyrosine non radioactive interfère avec dopa-¹⁴C internalisé, renforçant notre hypothèse des compartiments métaboliquement distincts de dopa: dopa(1) donnant un accès préférentiel à CDG et dopa(2) alimentant en majorité les réservoirs de dopamine et d'acide bétalamique.

- Les expériences réalisées avec un inhibiteur de la dopa décarboxylase le MFMD confirment que l'accumulation temporaire de dopa radioactif observée n'est pas équivalente pour la biosynthèse du CDG et de l'acide bétalamique si elle provient de dopa issu de la tyrosine-¹⁴C ou de dopa-¹⁴C administré directement aux cellules, suggérant que notre hypothèse décrite sous la forme d'un modèle à deux compartiments va dans la bonne direction, mais reste encore trop simple pour expliquer tous les résultats expérimentaux obtenus.

L'homogénéité des résultats obtenus tant sur les racines de *Beta vulgaris* qu'avec les cultures de cellules en suspension est remarquable indiquant que le modèle *in vitro* choisi reflète assez fidèlement la réalité de la biosynthèse observée *in vivo*.

Les méthodes novatrices développées au cours de ce travail nous ont permis d'étudier avec une certaine finesse le système biologique complexe de la compartimentation de la biosynthèse du cyclodopa glucoside et de la bétanine à partir de tyrosine et de dopa. D'autres travaux pourront sans doute un jour faire la lumière sur la compartimentation de la biosynthèse de la bétanine comme par exemple:

Les systèmes enzymatiques liés à la glucosylation de cyclodopa en cyclodopa glucoside et respectivement de bétanidine en bétanine n'ont pas été isolés chez *Beta vulgaris* [72] et la 5-O-glucosyltransférase n'a pas été identifiée dans cette espèce [73]. Une redondance métabolique dotée de mécanismes régulateurs pourrait être envisagée et les études de ces voies métaboliques complexes pourraient être élucidées en reprenant la méthodologie des précurseurs multiples [66-68]. Parmi les précurseurs possibles, nous suggérons deux expériences: l'une avec du glucose activé sous la forme d'UDP-glucose-³H en présence de dopa-¹⁴C et l'autre en présence de tyrosine-¹⁴C. En calculant les rapports ³H/¹⁴C des métabolites et leurs biodilutions internes, l'apport respectif de l'UDP-glucose et des compartiments dopa(1) et dopa(2) pourrait être apprécié.

L'exploration d'autres inhibiteurs de la dopa-décarboxylase plus actifs pourraient être également d'utilité pour mieux cerner la complexité de la biosynthèse de la bétanine et élucider le rôle des compartiments.

Des méthodes faisant appel à de nouvelles anti-protéases pour isoler des complexes multienzymatiques stabilisés [74] chez les plantes supérieures associées aux méthodologies de la protéomique et de la génomique [75, 76] pourraient être exploitées à des fins de caractérisation des enzymes concernées.

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Généralités.

1.1 Appareillage et mesures.

Résonance magnétique nucléaire: ^1H -RMN: *Brucker 360 et 90.6 MHz*; δ = déplacements chimiques en ppm par rapport au standard interne 3-triméthyl-silyl-propionate de sodium ($\text{Me}_3\text{Si-CD}_2\text{CD}_2\text{-COONa}$ = TSP), pour les mesures effectuées dans D_2O ou au TMS avec CDCl_3 comme solvant. Abréviations: s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet. ^{13}C -RMN: les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TSP ou au TMS. **Spectrométrie de masse:** *Finnigan 1020 GC-MS*, impact électronique (i.e.) et introduction directe; tension d'ionisation $70 \text{ eV} \pm 3 \text{ eV}$; les pics sont reportés en unités m/z et en % du pic de base. *Hewlett Packard 5980A*, ionisation chimique, par introduction directe; les pics sont reportés en unités m/z. **Spectres d'absorption infrarouge:** *Beckmann IR 4230*, bandes d'absorptions en cm^{-1} , intensités s (forte), m (moyenne) w (faible), b (large) et sh (épaulement). **Spectres d'absorption UV-Visible:** *Cecil 2012-EV* monofaisceau, *PYE UNICAM SP 1800* double faisceau et *Hewlett Packard HP 8450A et HP 1040A* détecteur UV-Vis à barrette de diodes. **Polarimétrie:** *Perkin-Elmer 241* cellule de 1 cm. **Points de fusion:** *Mettler FP 5* observation au microscope à platine thermostatisée. **Mesures de la radioactivité en ^{14}C et ^3H - statiques:** compteurs à scintillation *Packard Tricarb* et *Kontron Betamatic*. - **dynamiques:** en chromatographie *FLOONE HP* ou *HS* (R.I.C. Radiomatic Instruments & Chemical Co., Inc. Tampa, Fl, USA) équipé de: a) d'une cellule remplie avec un scintillateur solide de 0.25 ml pour mesure de la radioactivité du ^{14}C , b) d'une cellule en Teflon de 0.5 ml ou de 2.5 ml 'cellule liquide' et d'une pompe HPLC délivrant le mélange scintillant, *Floscint II* pour les mesures de ^{14}C et de ^3H . **Centrifugation:** centrifugeuse MSE Multex équipée d'un rotor Universal Swing-Out Head à 4 tubes de 50, 100 ou 200 ml, ou de 16 tubes de 15 ml. (Measuring & Scientific Equipment LTD: London, England). **Homogénéisation des cellules:** extraction par homogénéisation des tissus dans un potter Elvjem ou un broyeur mécanique Polytron PCU-4 de Kinematica AG, GmbH, équipé d'une tige de 10 mm de \varnothing . Solvant: H_2O - HCOOH 0.1M pH 2.4 ou NaH_2PO_4 0.05M, pH 2.4.

1.2 Méthodes de séparation.

Electrophorèse: sur papier Whatman #1 en chambre humide (Durrum) à 500 V.

Chromatographie échangeuse d'ions: sur SEPHADEX SP-C-25 fine Na⁺ *Pharmacia* après immersion dans l'eau; l'échangeur est chauffé 1 h au bain marie à 95°C (1 g de gel sec donne 8 ml de gel gonflé). Après sédimentation, le surnageant est prélevé et on ajoute à température ambiante 0.5N HCl pour l'échange du Na⁺ contre H⁺. Après 15 min de sédimentation, le surnageant est prélevé et remplacé avec HCOOH 0.1 N ou CH₃COOH 0.6 %; la procédure de décantation, suivie de l'élimination du surnageant et du remplacement de celui-ci par du tampon frais est répétée jusqu'à obtention d'un surnageant au pH du tampon. La suspension de gel est chauffée au bain-marie à 60°C et dégazée à pression réduite (12 Torr). La colonne est remplie par sédimentation; pour équilibrer, on laisse 12 heures dans le tampon choisi pour l'élution. Un débit constant de tampon est assuré par une pompe péristaltique.

HPLC - analytique et préparatif: - pompes analytiques: *Waters* avec programmeur de gradient linéaire et non-linéaire équipé d'un mélangeur pour deux phases mobiles; *Spectra-Physics SP 8700* avec programmeur de gradient linéaire et mélangeur pour 3 phases mobiles. - **pompes préparatives:** *Spectra-Physics SP 8700* avec programmeur de gradient linéaire et mélangeur pour 3 phases mobiles; *Dupont 830 liquid chromatograph*. **Colonnes analytiques:** 0.45 mm Ø x 300 mm ou 0.45 mm Ø x 500 mm remplies avec support *Spherisorb ODS-2 (Shandon)* 5 µm sphérique ou *Lichrosorb RP-18 (Merck)* 5 µm irrégulier; **Colonnes préparatives:** 25 mm Ø x 250 mm remplie avec support: *Lichrosorb (Merck) RP-18* de 5 µm irrégulier et *Zorbax (Dupont) RP-18* ou *RP-8* de 7 µm. **Phases mobiles:** NaH₂PO₄ 0.05 M pH 2.5 et 4.5, HCOOH 0.01M, CH₃COOH 0.6%, préparés avec de l'eau bidistillée et filtrés sur *Schleicher & Schuell* type RC 0.45 µm. L'acétonitrile et le méthanol sont de qualité HPLC, livrés par *Fluka*. Les solvants sont dégazés en continu par un flux de microbulles d'He. **Vanne d'injection:** *Rheodyne 7125* volumes analytiques de 10 µl à 100 µl et volumes préparatifs de 1 à 5 ml.

Conditions de séparation: L'analyse des métabolites contenus dans les extraits à été effectuée selon différentes méthodes HPLC avec un support en phase inverse et un gradient de solvants décrit dans les expériences concernées.

1.3 Quantification des métabolites par spectrophotométrie UV-Visible.

Coefficients d'absorption molaire: Les coefficients d'absorption molaire (ε) des produits séchés, de qualité puriss ont été déterminés par spectroscopie dans du tampon NaH₂PO₄

0.05 M à pH 4.5. Tyrosine, tyramine et dopamine-HCl proviennent de *Fluka*. La 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) est un don de *F. Hoffmann La Roche*. Le cyclodopa glucoside (CDG) a été isolé après dégradation de la bétanine (Exp. chap. 5) et recristallisé. Des quantités suffisantes ont été pesées (entre 15 et 25 mg, CDG 4 mg, par 50 - 100 ml) pour assurer la plus grande précision des mesures. Les valeurs présentées ci-après sont la base de nos quantifications.

Coefficients d'absorption molaire des métabolites

tyrosine	$\epsilon_{275 \text{ nm}} = 1380 \pm 7$, $\epsilon_{275 \text{ nm}} = 1413$ Handbook of Chemistry $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 1180 \pm 6$
tyramine	$\epsilon_{280 \text{ nm}} = 1260 \pm 14$
dopa	$\epsilon_{280 \text{ nm}} = 2730 \pm 14$
dopamine	$\epsilon_{280 \text{ nm}} = 2640 \pm 13$
cyclodopa glucoside [57]	$\epsilon_{280 \text{ nm}} = 2900 \pm 40$
N-formyl-cyclodopagluco-side [57]	$\epsilon_{280 \text{ nm}} = 2400 \pm 70$; $\epsilon_{310 \text{ nm}} = 10000 \pm 300$
bétanine	$\epsilon_{280 \text{ nm}} = 8220 \pm 140$; $\epsilon_{536 \text{ nm}} = 60000 \pm 1000$

Mesures en flux continu, détecteur monofaisceau monochromatique CECIL-2012: Les métabolites sont détectés à 280 nm, au travers d'une cellule de 1 cm à la sortie de la colonne HPLC. L'échelle d'absorbance (OD) la plus adéquate est sélectionnée, 0.2 OD, ce qui correspond à une sortie maximale de 10 mV du spectrophotomètre. Les mesures sont totalisées en continu par un intégrateur *Hewlett Packard 3380A* en unités d'intégration; une unité (u.i.) correspond à 1 μV x sec. Les quantités de substances sont calculées par rapport aux surfaces intégrées pour des concentrations connues de tyrosine (0.001 M), dopa (0.001M), dopamine (0.0025 M) injectés avant chaque série. Le calcul de la quantité de métabolite injecté dans l'aliquote est effectué à l'aide d'une calibration:

$$\text{nmol métabolite} = \frac{\text{u.i. du métabolite}}{\text{u.i. par nmol du standard}} = \frac{\text{u.i.}}{\text{u.i./nmol}} \quad \text{u.i.} = \text{unité d'intégration}$$

Exemple d'étalonnage des unités d'intégration pour chaque série d'injections:

Produit	nmol injecté	unité d'intégration (u.i.)	u.i./nmol
dopa	20	185300	9265
tyrosine	20	71000	3550
dopamine	50	338000	6760

Détecteur à barrette de diodes Hewlett Packard HP 8450A: Les premières mesures effectuées avec un spectrophotomètre monofaisceau n'ont pu fournir des informations qu'à une seule longueur d'onde. Le détecteur à barrette de diodes couvre simultanément toute la gamme de longueurs d'ondes et permet l'analyse de tous les métabolites. Les mesures d'absorbance (mAU) sont effectuées à des intervalles de 2 secondes à 230, 280, 310, 480 et 536 nm, compatibles avec la détection en chromatographie liquide à haute pression. La quantité de métabolite contenue dans chaque pic est calculée à partir de la surface du pic fournie par l'instrument en mAU*sec à la longueur d'onde choisie et avec le coefficient d'absorption molaire (ϵ) du métabolite à cette longueur d'onde:

$$\text{nmol} = \frac{\text{mAU} \cdot \text{sec} \cdot \text{débit (ml/min)}}{\epsilon \cdot 0.6}$$

Programme d'acquisition et de traitement des données chromatographiques UV-VIS:

Pour accéder aux données spectroscopiques, nous avons connecté un ordinateur *Hewlett Packard HP 200 (HP 9816)*, comprenant une unité centrale équipée d'un microprocesseur *Motorolla 68000*, de 500 K de mémoire RAM, de trois interfaces (deux sérielles et une parallèle de type HPIB). Les périphériques utilisés sont un double lecteur de disquettes 3.5" pour le stockage des données, une imprimante matricielle pour l'impression des valeurs de type alphanumérique et un traceur graphique XY pour la présentation des profils chromatographiques.

Un programme a été développé en langage interprété *HP-Basic-2.0* dans le but d'acquisition de données chromatographiques comprenant: le choix de 5 longueurs d'ondes comprises entre 200 et 800 nm, l'enregistrement de spectres complets, la visualisation des profils chromatographiques en temps réel sur le moniteur de l'ordinateur, la mémorisation des données, l'intégration numérique des surfaces des pics séparés par HPLC et le stockage des informations sur disquette. Brièvement, le programme est constitué d'unités structurales appelés sous-programmes qui assurent les fonctions suivantes:

Définition des variables:

- Gestion de la mémoire et des arrays dans lesquels les données seront stockées en cours de chromatographie;
- Définition des variables.

Sous-programmes:

- **Choix des variables** d'après un questionnaire couvrant: durée de la chromatographie, intervalle de temps entre deux mesures, débit, nombre et valeurs des longueurs d'ondes auxquelles les mesures doivent être effectuées (au maximum 5), option de prise de spectres complets, nom du fichier de stockage sur disquette.
- **Visualisation des profils chromatographiques:** nombre de profils qui seront visualisés sur le moniteur en temps réel, choix des échelles en unité de densité optique, intervalle de temps que l'utilisateur désire visualiser ou par défaut, l'ensemble de la chromatographie définie précédemment.
- **Procédure d'initialisation de la chromatographie:** ouverture du ou des fichiers sur la disquette, gestion graphique de l'écran avec axes: en x, le temps en secondes et en y, les échelles de densité optique choisies sous 2. Menu sous la forme de 10 icônes accessibles par les touches de fonction F1 à F10. Ligne de base, Start, Stop (si désiré), Acquisition de spectres complets, Intégration, Impression des données, Chargement de fichiers
- **Chromatographie:** Start: départ de l'acquisition; Stop: arrêt automatique ou manuel de l'acquisition; Spectre: prise de spectre complet, 200 à 800 nm, à n'importe quel moment au cours de la chromatographie.
- **Stockage sur disquette:** stockage des informations suivantes: durée de la chromatographie (nombre de points), intervalle de mesure, débit, absorbance aux différentes longueurs d'onde et spectres complets.
- **Visualisation à l'écran:** après acquisition, possibilité de visualiser partiellement ou en totalité, de 1 à 5 chromatogrammes en modifiant les échelles de l'absorbance et du temps.
- **Transfert des spectres UV-VIS:** les spectres stockés sur disquette peuvent être transférés vers le spectrophotomètre où ils seront analysés.
- **Intégration numérique des surfaces des pics:** qui comprend une routine d'intégration des pics comportant le paramétrage de la *sensibilité* définissant la ligne de base, la détection

pour chaque pic du début, du sommet et de la fin. La fin d'un pic est définie soit par le retour du niveau d'absorbance à la valeur de la précédente ligne de base, soit par un changement de pente inférieur à un *seuil* (voir ci-dessous) ou lorsque la séparation entre deux pics n'atteint pas la ligne de base, par un changement durable du signe de la pente. Le *seuil* à partir duquel on considère le début ou la fin d'un pic est défini par un changement significatif de la pente de l'absorbance en fonction du temps. Ce *seuil* paramétrable est exprimé en millième d'unité d'absorbance par seconde (mAU/sec) et lorsque la valeur calculée de la pente est inférieure à la valeur paramétrée, les mesures d'absorbance sont considérées comme faisant partie intégrante de la ligne de base. L'utilisation du *seuil* est indispensable lorsqu'on travaille en mode gradient en HPLC, car lors du changement de composition de la phase mobile aqueuse - organique en cours de gradient, la ligne de base accuse une légère pente. Un troisième paramètre définit le nombre de points utilisés dans le test de la ligne de base ou des limites d'un pic. Ce dernier paramètre est utile lorsqu'on travaille avec des pics de largeur très variable dans le même chromatogramme (par exemple un pic large provenant d'une substance telle que la dopamine qui traîne sur la colonne) ou avec des colonnes possédant un nombre de plateaux élevé (pic très étroit). Dans nos expériences, les mesures d'absorbance sont effectuées à des intervalles de 2 secondes aux longueurs d'ondes choisies et transférées à l'ordinateur en unités d'absorbance (mAU*sec). La surface des pics est exprimée en *mAU*sec* et la quantité de substance présente dans chaque pic est calculée à l'aide des coefficients d'absorption molaire (ϵ) individuels.

- **Impression des résultats:** les valeurs d'intégration sont imprimées sous la forme d'un tableau avec le *temps de rétention* des substances, la surface en *mAU*sec*, la hauteur en *mAU* et le *type de pic*: BB = intégration de la ligne de base à la ligne de base, VB et BV = vallée - ligne de base, DH = saturation etc.

- **Impression graphique des chromatogrammes:** sur une table traçante en fonction du paramétrage établi à l'écran sous *visualisation des profils*.

- **Chargement des fichiers:** les chromatogrammes déjà stockés sur disquette peuvent être réintégrés et redessinés; les spectres enregistrés en cours de chromatographie peuvent être traités en tout temps.

1.4 Comptage des échantillons radioactifs par scintillation liquide.

Des aliquotes des solutions radioactives (0.020 à 0.200 ml pipetés par Socorex) sont déposées sur des filtres en fibre de verre Whatman GF/A (diamètre 25 mm) disposés dans des tubes en polyéthylène de 4 ml; on ajoute 3 ml de liquide de scintillation (*FLOSCINT II, R.I.C.*) et on place les tubes dans des récipients en verre spécialement destinés au comptage de la radioactivité par scintillation liquide. Les comptages- β sont effectués sur un *Packard Tricarb* ou *Kontron Betamatic* dont les fenêtres sont réglées pour la mesure du ^{14}C ou du ^3H - ^{14}C combinés. L'étalonnage est établi par la mesure de standards calibrés à quenching croissant fournis par les constructeurs des deux instruments.

2. Chromatographie HPLC.

2.1. Méthodes de séparation HPLC analytiques.

L'analyse des métabolites radioactifs contenus dans les extraits a été effectuée selon différentes méthodes HPLC. Les échantillons entre 2 mesures ont été conservés congelés à -20°C. Les méthodes de séparation et de mesures ont été adaptées au fur et à mesure de développements techniques réalisés dans le courant des années 81 - 84. La seule modification importante remarquée dans le contenu des extraits est la transformation lente du **cyclodopa glucoside** (CDG) en **N-Formyl-cyclodopa glucoside** (FCDG); ce produit a été identifié dans les chromatogrammes après coup et quantifié. Les séparations ont été effectuées au moyen de colonnes analytiques remplies avec un support en phase inversée et d'une pompe HPLC équipée d'un générateur de gradient; à l'exception de la méthode D, on utilise un gradient linéaire pour trois solvants. Pour éluer les différentes classes de substances, nous avons combiné les phases mobiles suivantes: tampon phosphate NaH_2PO_4 0.05 M, aux pH 4.5 et 2.5, acétonitrile et méthanol. Les gradients appliqués sont décrits dans le tableau 2.1.

Les premières mesures, faites immédiatement après l'expérience (expérience de cinétique: série D), n'ont fourni qu'une information partielle; le système de solvant utilisé, à pH acide, ne permettait pas la séparation complète de tous les métabolites, les seuls mesurables étant CDG et dopa. **L'utilisation d'un détecteur à scintillation équipé d'une cellule à scintillateur solide permet d'isoler les métabolites après la radiochromatographie.** Après passage à travers une cellule à scintillateur solide, les pics de CDG et de bétanine sont collectés. La concentration du CDG est déterminée par spectrophotométrie à 283 nm et la radioactivité en dpm est mesurée par scintillation liquide. La concentration de la bétanine est déterminée par spectrophotométrie; elle est concentrée à sec pour purification ultérieure par électrophorèse sur papier. La série D donne des informations précises sur le % de radioactivité contenu dans le CDG par rapport à la totalité de l'extrait; la radioactivité spécifique et la taille des réservoirs de CDG et de bétanine est également déterminée.

A pH 4.5, une meilleure séparation est réalisée (séries A et B). Pour éluer les différentes classes de substances, nous avons combiné le tampon phosphate, l'acétonitrile et le méthanol.

La dopamine, métabolite majoritaire traîne ("tailing") lors des séparations sur un support en phase inversée de telle sorte que sa quantification a posé des problèmes; sa position dans le chromatogramme est fortement influencée par les conditions de chromatographie. L'effet de

tailing est diminué par la présence d'un solvant organique, en l'occurrence l'acétonitrile, qui de surcroît déplace l'élution de ce métabolite dans une zone ne contenant pas d'autres métabolites. La bétanine est éluée seulement en présence de solvants organiques. Les séries A et B auxquelles se réfère ce paragraphe ne se distinguent que de peu. La série de mesure A étant incomplète, une deuxième série B s'est avérée nécessaire, avec comme amélioration un changement de gradient et un nouveau détecteur à scintillation liquide en continu.

Une dernière **série C** a été entreprise avec un équipement plus sophistiqué. Les conditions de chromatographie avec le système décrit offrent **une séparation optimale de tous les métabolites**; le support chromatographique choisi, à particules sphériques, plus hautement recouvertes de phase C18, s'est avéré beaucoup moins polaire et plus sélectif. Dans cette série de mesures, la quantification des métabolites en mesure UV-VIS et en scintillation liquide est perfectionnée comme mentionné sous 1.3 et 1.4. Nous considérons les valeurs acquises dans la série C comme les plus justes. Nos calculs se baseront là-dessus. Pourtant, le temps de stockage prolongé, dans le cas de l'expérience de cinétique, a pu engendrer une diminution de la concentration de certains produits, comme notamment le CDG (valeurs inférieures à celles de la méthode D).

Tableau 2.1: comparaison des méthodes de séparation.

	Méthode A	Méthode B	Méthode C	Méthode D
Expérience	cinétique double marquage compétition inhibition	cinétique double marquage compétition	cinétique	cinétique
Pompe	Spectra Physics	Spectra Physics	Spectra Physics	2 x Waters ¹⁾
Injection ml	0.020 à 0.100 ml	0.020 à 0.100 ml	0.020 à 0.100 ml	0.020 à 0.100
Colonne	Lichrosorb RP-18, 5 µm 0.5 x 50 cm	Lichrosorb RP-18, 5 µm 0.5 x 50 cm	Spherisorb ODS-2, 5 µm 0.5 x 50 cm	Lichrosorb RP-18, 5 µm 0.45 x 30 cm
Débit	1.0 ml/min	1.0 ml/min	1.0 ml/min	1.5 ml/min
Solvant A	NaH ₂ PO ₄ 0.05 M pH 4.5	NaH ₂ PO ₄ 0.05 M pH 4.5	NaH ₂ PO ₄ 0.05 M pH 4.5	NaH ₂ PO ₄ 0.05 M pH 2.5
Solvant B	CH ₃ CN	CH ₃ CN	CH ₃ CN	CH ₃ OH-H ₂ O 80/20
Solvant C	CH ₃ OH	CH ₃ OH	CH ₃ OH	
Gradient	t' A B C	t' A B C	t' A B C	t' A B
t' en min	0' 100 0 0	0' 100 0 0	0' 100 0 0	0' 100 0
A,B,C en %	8' 100 0 0	25' 100 0 0	12' 100 0 0	16' 100 0
	30' 90 10 0	45' 90 10 0	32' 90 10 0	76' 80 20
	60' 40 30 30	60' 90 10 0	60' 40 30 30	93' 80 20
	70' 0 0 100	80' 85 15 0	70' 40 30 30	94' 20 80
		100' 0 0 100		120' 0 80
Détection	Cecil 2012-UV OD à 280 nm	Cecil 2012-UV OD à 280 nm	HP 8450-UV-VIS OD à 230,280,310 480,536 nm	Cecil 2012-UV OD à 280 nm
	0 à 0.2 OD	0 à 0.2 OD	0 à 2.0 OD	0 à 0.2 OD
Intégration	HP 3380A att. 16	----	HP 9816 programme 2)	----
Mesures ¹⁴C				mes. statiques
appareil	FLOONE-ES	FLOONE-HP	FLOONE-HP	FLOONE-HP
cellule	2.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.25 ml
type	liquide	liquide	liquide	solide
débit	6.0 ml/min	6.0 ml/min	6.0 ml/min	1.5 ml/min
rendement	92 %	25 %	65 %	45 % ³⁾
Mes. ¹⁴C/³H				
appareil	FLOONE-ES			
cellule	2.5 ml			
type	liquide			
débit	6.8 ml/min			
rendement	¹⁴ C: 65% ³ H: 30%			

1) gradient convexe no 7 de 16' (100 % A) à 76' (80 % A - 20 % B)

2) voir texte paragraphe 1.3 et 1.4.

3) mesures en scintillation liquide statique des fractions collectées à l'effluent.

Tableau 2.2: Temps de rétention des métabolites dans les différentes méthodes de séparation: méthodes A, B, C et D.

Méthode de séparation ¹⁾		A	B	C	D
tampon phosphate à pH		pH 4.5	pH 4.5	pH 4.5	pH 2.5
début du gradient organique à		8'	25'	12'	16'
support de chromatographie		RP-18	RP-18	ODS-2	RP-18
longueur de la colonne		50 cm	50 cm	50 cm	30 cm
débit [ml/min]		1.0	1.0	1.0	1.5
métabolite	T _R rel/dopa ²⁾	T _R ³⁾	T _R	T _R	T _R
dopa	1.0	6.3	12.0	10.5	14
CDG	1.2-1.3	7.6	14.5	13.6	8
tyrosine	1.4-1.5	9.0	17.5	15.5	19
FCDG	2.7-3.5	20.1	42.0	28.8	--
bétanine	2.9-4.4	22.6	43.5	30.2	59
dopamine ⁴⁾	1.8-4.2	25.0	50.0	19.1	20
tyramine	2.6-7.1	45.0	82.0	27.6	71

1) Les méthodes de séparation sont décrites dans le tableau 3.

2) T_R rel/dopa = temps de rétention des métabolites relatif au temps de rétention de dopa (T_R rel.= 1).

3) T_R = temps de rétention en minutes.

Dans le Tab. 2.2, nous avons rapporté les temps de rétention des métabolites. Avec le tampon phosphate, nous éluons les acides aminés et le CDG; les bétalaïnes et les acides éhénylpropénoïques sont élués à leur tour par des concentrations croissantes d'acétonitrile et de méthanol. La séparation des acides aminés et amines aromatiques par HPLC en phase inverse est influencée par la nature du tampon et le pH. A pH 4.5, méthodes A,B,C, l'ordre d'élution est dopa - cyclodopa glucoside - tyrosine; les temps de rétention relatifs de ces métabolites par rapport à celui de dopa varient peu. En choisissant un pH acide (2.5), l'élution du CDG seul est accélérée (méthode D); cette méthode D nous permet d'isoler et de quantifier de manière prioritaire le CDG.

La dopamine est le métabolite majoritaire; cette substance traîne lors des séparations sur un support en phase inverse de telle sorte que sa quantification pose des problèmes. La présence d'un solvant organique mélangé au tampon diminue ce tailing. Nous avons utilisé un gradient d'acétonitrile pour déplacer l'élution de ce métabolite dans une zone ne contenant pas d'autres métabolites radioactifs. La présence d'un solvant organique est même indispensable pour éluer la bétanine d'un support C-18. L'ordre d'élution de la dopamine et de la bétanine est déterminé par le choix du moment où on initie le gradient. Le tableau 4 démontre la large variabilité dans l'élution de ces métabolites. La méthode C offre les meilleures caractéristiques de séparation pour l'ensemble des métabolites, car la dopamine élue dans une zone dépourvue de

tout métabolite radioactif. Toutes les 3 méthodes A,B,C, se prêtent à une bonne séparation des métabolites concernés.

3. Radiochromatographie.

3.1. Radiochromatographie en continu.

- **Radiochromatographie en continu avec cellule pour scintillateur liquide.** L'effluent de la colonne HPLC analytique est connecté directement au mélangeur du compteur où le liquide scintillant est débité avec précision par une pompe HPLC. La sortie du mélangeur est connectée à une cellule équipée d'une spirale de téflon de 0.5 ml, respectivement de 2.5 ml, qui est placée entre deux tubes photomultiplicateurs placés en coïncidence. Les photons émis par le scintillateur sont comptés par les deux tubes en cpm. Le résultat est encore modifié en fonction de quelques paramètres programmés (bruit de fond pour les deux isotopes, débit total en ml/min à travers la cellule de mesure, volume de la cellule, temps d'échantillonnage de 6 sec en général).

- **Radiochromatographie en continu avec cellule à scintillateur solide.** L'effluent de la colonne passe dans une cellule de 0.25 ml, contenant un scintillateur noyé dans un support synthétique, qui est placée entre les tubes photomultiplicateurs. Les résultats sont corrigés et exprimés en cpm comme décrit ci-dessus.

- **Traitement des données radiochromatographiques:** Les comptages de radioactivité sont totalisés par l'interface sérielle du FLOONE et transmises à l'ordinateur toutes les 6 secondes. Ces données sont traitées par le même programme mentionné sous 1.3. (visualisation, stockage et intégration). La surface de chaque pic de la radiochromatographie est intégrée et exprimée en cpm.

Ajustement des fenêtres d'énergie:

1. Mesures ^{14}C : Un standard de radioactivité connue est introduit dans un mélange de phase mobile (NaH_2PO_4 0.05 M pH 4.5) constituant l'effluent de la colonne HPLC et de liquide scintillant (FLOSCINT II, RIC) dans une proportion de 1:5, vol/vol. Ce mélange radioactif est introduit dans la cellule de mesure du FLOONE (cellule de 0.5 ml), les mesures sont effectuées durant 10 min. Le bruit de fond de l'appareil est déterminé de la même façon à partir d'un mélange de tampon et de liquide scintillant sans radioactivité. Les réglages des fenêtres d'énergie du compteur est présenté dans le Tab. 3.1. Le rendement est calculé selon la formule 3.1:

Formule 3.1 rendement (%) =
$$\frac{100 * (\text{cpm mesuré} - \text{cpm bruit de fond})}{\text{dpm dans la cellule de mesure}}$$

Tableau 3.1. Réglage des fenêtres et autres paramètres pour le ^{14}C

Fenêtres(*)	$U^{14}\text{C}$ 3.27 V	$L^{14}\text{C}$ 216 mV	$U^{3}\text{H}$ 510 mV	$L^{3}\text{H}$ 32 mV			
Haute tension	8.11 V						
Expériences	cinétique		compétition	inhibiteur			
Méthodes de séparation(**)	a	b	c	d	b	c	d
Volume cellule [ml]	0.25	2.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Débit cellule [ml/min]	1.5	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Rendement ^{14}C [%]	45	92	25	65	80	72-76	90-95

(*) U = limite supérieure de la fenêtre et L = limite inférieure de la fenêtre (**) voir Tab. 2.1.

2. Mesures simultanées de ^3H et ^{14}C : (a) On introduit un standard tritié dans la cellule, on mesure le rendement du comptage dans le canal du tritium. Si nécessaire, la fenêtre de la bande d'énergie du ^3H est ajustée. La fenêtre inférieure du ^{14}C est ajustée de sorte qu'aucune radioactivité provenant du tritium ne soit perçue dans ce même canal. (b) On introduit un standard marqué au ^{14}C dans la cellule et mesure le rendement dans le canal du ^{14}C et l'excédent d'énergie détecté par le canal du ^3H (la bande d'énergie commune au ^{14}C et au ^3H se remarque par une mesure positive dans le canal du ^3H). (c) Pour compléter l'étalonnage, on compte un échantillon contenant les deux isotopes dans un rapport de radioactivité $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ de 3:1. Ces mesures sont vérifiées par scintillation statique. Les réglages des fenêtres d'énergie du compteur sont présentés dans le Tab. 3.2.

Tableau 3.2. Réglage des fenêtres et autres paramètres en mode $^3\text{H} + ^{14}\text{C}$

Fenêtres(*)	$U^{14}\text{C}$ 3.2 V	$L^{14}\text{C}$ 300 mV	$U^{3}\text{H}$ 300 mV	$L^{3}\text{H}$ 30 mV
Haute tension	7.80 V			
Expérience	tyrosine ^3H /dopa ^{14}C			
Méthode de séparation(**)	b et c			
Volume cellule [ml]	0.5			
Débit cellule [ml/min]	6.8			
Rendement $^{14}\text{C} / ^3\text{H}$ [%]	65 / 30			
^{14}C compté comme ^3H [%]	14.5			

(*) U = limite supérieure de la fenêtre et L = limite inférieure de la fenêtre (**) voir Tab. 2.1

Corrections cpm --> dpm: L'efficacité du comptage de l'effluent, fonction de la teneur en solvant organique, varie au cours du gradient. Une correction s'effectue par un programme de

compensation de l'efficacité (on parle parfois de quenching). Celui-ci est établi dans une expérience au cours de laquelle on utilise un mélange scintillant radioactif (300 ml de Floscint II-R.I.C.) à 20'000 dpm ^{14}C par ml que l'on mélange avec l'effluent de la colonne HPLC provenant de la chromatographie d'un échantillon d'extrait non radioactif. La valeur de comptage obtenue (cpm) est comparée avec la valeur connue constante en dpm du mélange scintillant; le rendement (%) ainsi établi en fonction du temps de chromatographie fournit la courbe de calibration du quenching, appliquée automatiquement par le programme pour la conversion *cpm* --> *dpm*.

3.2. Mesures d'efficacité du détecteur à scintillation FLOONE HP équipé d'une cellule téflon.

Après calibration du système d'analyse selon les spécification données par le constructeur (voir plus haut mesures ^{14}C et ^3H , réglage des fenêtres), nous avons injecté des aliquotes de radioactivité connue dans le système d'analyse HPLC-UV-FLOONE. L'acquisition des données à été effectuée avec le système informatisé et le traitement des données par le programme d'intégration mis au point par nos soins. Nous avons prélevé 0.050 ml de la solution stock de tyrosine-3- ^{14}C à 18.1×10^7 dpm/ml et dilué celle-ci avec 1.5 ml de tampon phosphate 0.05 M à pH 4.5. Après avoir préparé une série de dilutions de cette solution concentrée de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 et 256 fois dans le même tampon, des aliquotes de 0.1 ml de chacune des solutions diluées ont été prélevées en duplicat pour mesure de la radioactivité en scintillation statique. (KONTRON Betamatic II). Deux aliquotes de 0.1 ml de chacune des dilutions ont été injecté sur le système de mesure HPLC-UV-FLOONE: exp2, Tab. 2.1, méthode (D). Les résultats de cette analyse sont décrits dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3. Mesure du rendement du comptage du ^{14}C en scintillation liquide dynamique: FLOONE HP, série (C).

Dilution	dpm statique	cpm FLOONE	rendement
64 x	1933 ± 0.9 %	1161 ± 4.2 %	60 %
32 x	3822 ± 3.6 %	2011 ± 4.1 %	53 %
16 x	7624 ± 1.6 %	4352 ± 7.3 %	57 %
8 x	15389 ± 2.6 %	9006 ± 2.5 %	59 %
4 x	30389 ± 2.5 %	18375 ± 7.0 %	60 %
2 x	62057 ± 0.6 %	39347 ± 1.4 %	63 %
sol. stock	120638 ± 2.2 %	80756 ± 6.0 %	67 %

Rendement moyen mesuré en comptage ^{14}C dynamique: 60 % ± 4 %

Problèmes rencontrés et solutions. - L'efficacité du comptage en flux homogène est dépendante d'un mélange régulier et intime entre l'effluent de la colonne - contenant sous forme de soluté organique les métabolites radioactifs - et le cocktail scintillant. Pour assurer un bon mélange, l'effluent HPLC doit entrer en contact avec un débit de liquide scintillant aussi constant que possible. Dans la première version du compteur à scintillation hétérogène/homogène, nous disposions d'une pompe de type F.M.I. dont le débit n'était pas constant au cours de la radiochromatographie. D'autre part, la géométrie du mélangeur n'était pas optimisée pour nos conditions d'analyses. Nous avons modifié trois composants de l'instrument:

1. La pompe F.M.I. a été remplacée par une pompe de type HPLC sans pulsations et à débit et pression constants.
2. Le mélangeur et les tubes téflon[®] ont été remplacés par de l'acier inoxydable 316S (l'acier, contrairement au téflon[®] ne retient pas la radioactivité et offre de meilleures caractéristiques de flux)
3. La cellule de mesure placée en coïncidence entre les deux tubes photomultiplicateurs a été modifiée en augmentant le diamètre du tube téflon[®]. La géométrie de l'enroulement du tube a également été changée pour assurer un meilleur centrage entre les deux photomultiplicateurs.

Ces trois modifications ainsi qu'un réglage optimisé des fenêtres d'énergie ont amélioré de façon perceptible la reproductibilité et le rendement du système de mesure. Le système a finalement été adapté avec succès pour des mesures en double marquage avec les isotopes ³H et ¹⁴C avec correction du quenching pour les deux radionucléides.

3.3. Calcul de la radioactivité spécifique des métabolites (méthode C).

Quantité d'un métabolite se trouvant dans un pic chromatographique:

$$\text{nmol (métabolite)} = (\text{Surface intégrée} \times 2)/\varepsilon$$

Radioactivité spécifique d'un métabolite mesurée de manière dynamique par le système "On-Line" HPLC - UV-Vis HP 8450 - FLOONE:

$$\text{Radioactivité Spécifique [dpm/mol]} = (\text{dpm} \times \varepsilon \times 10^9)/(\text{Surface intégrée} \times 2)$$

3.4. Choix de la méthode la plus adéquate pour la détermination de la distribution de l'activité (méthode C).

On constate en comparant les séries de mesures acquises par les méthodes A et B que le pourcentage est systématiquement plus élevé que celui noté par la méthode C. Lors du traitement de l'évolution dans le temps du pourcentage de l'activité incorporée dans les métabolites par tracé logarithmique (comme décrit dans le chapitre du modèle d'incorporation), on obtient des droites parallèles pour les résultats des méthodes A et B d'une part et C d'autre part. L'écart constant entre ces droites manifeste la proportionnalité des valeurs.

La raison de cette divergence est inhérente à la méthode de détection. Dans les méthodes A et B (les plus anciennes), le seuil de détection des cpm est donné par la limite de sensibilité de l'instrument (FLOONE). Ainsi, une considérable partie de l'activité répartie dans le chromatogramme (estimée à 20 %), non attribuable à des métabolites spécifiques n'a pas été comptabilisée lors de la radiochromatographie. Ceci a entraîné une surévaluation systématique de l'ordre de 20 %. La méthode C diffère des précédentes par quelques améliorations décisives dans la technique de comptage en scintillation liquide par flux continu avec le FLOONE. Ces améliorations apparues dès 1984 sont: 1. Une pompe HPLC assurant un débit constant de liquide scintillant; 2. La construction d'une cellule de mesure avec un tube en Téflon plus transparent et mieux centré entre les deux tubes photomultiplicateurs. Grâce à ces modifications améliorant la sensibilité et au programme d'acquisition développé dans la même période, l'exploitation des données a été optimisée. Dans nos calculs, nous nous référons essentiellement aux résultats acquis par la méthode C.

3.5. Mesures d'efficacité du détecteur à scintillation FLOONE HP équipé d'une cellule à scintillateur solide: expérience de cinétique (méthode D).

une aliquote de 0.1 ml d'un extrait radioactif de *Beta vulgaris* concentré (2.0 ml, voir Exp. chap. 8) est injectée directement dans le système de séparation et de mesure HPLC - UV - FLOONE. Le radiochromatographe est équipé d'une cellule à scintillateur solide permettant de collecter des fractions à la sortie de celle-ci (Exp. 2, Tab. 2.1, méthode (D)). Une quantité égale de l'extrait est comptée séparément, par scintillation statique. Le rendement de mesure de la cellule de détection du FLOONE est calculé comme rapport entre la somme des activités mesurées par le radiochromatographe (moyenne de 2 injections en cpm \pm 1 %) et l'activité

totale injectée mesurée par comptage statique (moyenne de 2 mesures $\pm 1\%$). Le calcul du rendement est décrit pour cet exemple dans le Tab. 3.4.

Tableau 3.4. Rendement du détecteur à scintillation FLOONE: méthode (A) selon Exp. 2, Tab. 2.1. , expérience de cinétique: activité mesurée dans 0.1 ml de l'extrait injecté

précurseur	tyrosine-3- ¹⁴ C			dopa-3- ¹⁴ C		
	33	66	180	30	65	180
temps [min]						
dynamique [10 ⁶ cpm]	2.424	3.942	6.084	1.567	3.280	5.505
statique [10 ⁶ dpm]	5.378	8.723	13.293	3.481	7.290	12.981
rendement [± 0.01]	0.45	0.45	0.46	0.45	0.45	0.42

Rendement moyen mesurée en comptage ¹⁴C dynamique: 44.7 ± 1.3

3.6. Purification et contrôle de pureté des précurseurs radioactifs.

Purification: Les précurseurs, [tyrosine-3-¹⁴C (6 mg), dopa-3-¹⁴C (3 mg)] sont dissous dans un minimum de tampon NaH₂PO₄ 0.05 M à pH 4.5 contenant 10 % de méthanol (4 ml). Ces solutions sont filtrées sur cartouche Hamilton Chrom-Prep PRP-1, de 0.32 ml RP-18; avec la seringue on reprend 0.8 ml du même solvant pour rincer la cartouche. Les filtrats réunis sont ajustés à 5.0 ml et injectés en une fois sur une colonne HPLC (2.4 x 30 cm) Zorbax RP-8, 7 μ m (Dupont), laquelle est chargée par un débit constant de tampon phosphate - pH 4.5, de 10 ml/min. La tyrosine élue après 14.5 min, dopa après 12.5 min. La fraction pure de tyrosine (33.7 ml, OD₂₇₅ = 1.29) contient 0.0315 mM, celle de dopa (25.2 ml, OD₂₈₀ = 1.80), 0.01662 mM. Les éluats sont évaporés à sec au Rotavapor. Les résidus secs sont repris dans 20.0 ml H₂O. Ces solutions stock de précurseurs purs sont conservées sous Argon à -30°C, par portions de 5 ml. Avant l'utilisation, les solutions stock sont décongelées, on prélève 0.1 ml de la solution de tyrosine et 0.2 ml de dopa). Le volume est amené à 1.0 ml en ajoutant respectivement 0.9 et 0.8 ml H₂O distillée. La concentration et la radioactivité spécifique des solutions stock des deux précurseurs radioactifs est déterminée par spectroscopie UV mesure de la radioactivité par comptage statique sur des aliquotes de ces solutions spectroscopiques: tyrosine-3-¹⁴C : radioactivité spécifique = 1.022×10^{14} dpm/mol ($\pm 2.5\%$), DO₂₇₅ 0.245, concentration 178 nmol/ml, stock 20 ml à 1775 nmol/ml, radioactivité de la solution spectroscopique 1.8136×10^7 dpm/ml.; dopa-3-¹⁴C : radioactivité spécifique = 1.006×10^{14} dpm/mol ($\pm 2.5\%$), DO₂₈₀ 0.443, concentration 162 nmol/ml, stock 20 ml à 811 nmol/ml, radioactivité de la solution spectroscopique 1.6321×10^7 dpm/ml,

Ces mesures initiales ont été effectuées après coup et les résultats des mesures expérimentales effectuées ultérieurement ont été utilisées:

$$\text{tyrosine-3-}^{14}\text{C } 1.04 \times 10^{14} \text{ dpm/mol et dopa-3-}^{14}\text{C } 1.065 \times 10^{14} \text{ dpm/mol.}$$

Contrôle de la pureté des précurseurs radioactifs par HPLC-UV-FLOONE: On injecte une aliquote de 0.015 ml des solutions de précurseurs radioactifs diluées 10 fois avec NaH_2PO_4 0.05 M - pH 4.5. La séparation est effectuée par HPLC selon la méthode d (Tab. 1.5). Sur le radiochromatogramme, on ne constate qu'une seule bande radioactive pour chaque précurseur. La sensibilité de la méthode de détection indique une pureté des précurseurs supérieure à 98%.

4. Incubation de racines de *Beta vulgaris* avec des précurseurs radioactifs: dopa-2-¹⁴C et tyrosine-3-¹⁴C.

4.1. Incorporation de dopa-2-¹⁴C dans une jeune racine de *Beta vulgaris*.

Matériel végétal et incubation: Une jeune betterave rouge (variété Boule de Feu) âgée de 40 à 45 jours, cultivée dans la région lausannoise est soigneusement prélevée avec les feuilles et la terre qui l'entoure. La racine, de diamètre maximum 2.5 cm et de 8 cm de hauteur, est délicatement lavée. On prépare 10 ml d'une solution de MES 1N (acide 2N-Morpholino-éthane-sulfonique) à 0.2 g par 100 ml ajusté à pH 6.0 avec NaHCO₃. Au milieu d'incubation, on ajoute 4.23 mg (0.01185 mmol) de dopa-2-¹⁴C de radioactivité spécifique 9.99 x 10¹² dpm/mol. Deux prélèvements de 50 et 100 µl sont effectués pour déterminer la radioactivité initiale de la solution. Au temps 0 min, la racine est plongée dans le milieu d'incubation. Celle-ci est fixée avec du Parafilm, les feuilles bien présentées à la lumière d'une lampe à incandescence de 60 Watts, placée à 35 cm des feuilles. Température 26°C. Après 6 heures d'incubation, la racine est sortie du milieu. Le volume du milieu est mesuré 8.9 ml; la racine est lavée avec de l'eau distillée (volume du milieu et de la solution de lavage réunis 22.0 ml) et deux prélèvements de 50 et 100 µl sont effectués. La racine est soigneusement lavée avec de l'eau distillée, puis les feuilles sont coupées au niveau de la naissance des pétioles, juste au-dessus de la racine. Poids de la racine 8.68 g; poids des feuilles 12.32 g.

Extraction: La racine est coupée en morceaux de 1 g environ dans une solution de H₂O-HCOOH pH 2.0 (l'extraction est effectuée à bas pH pour inactiver les enzymes), puis pressés dans la solution avec un presse-ail. L'extrait contenant les débris cellulaires est mélangé avec la solution de rinçage du matériel. L'extrait est ajusté à pH 2.4 avec HCOOH, puis filtré sur une colonne de Sephadex G-25, de 40 mm Ø x 30 mm. Les débris cellulaires retenus sur la surface du gel sont lavés avec HCOOH 0.1 N pH 2.4 jusqu'à décoloration complète. Le filtrat, 300 ml, est concentré jusqu'à 50.0 ml au Rotavapor, 12 Torr, 35°C. Quatre prélèvements sont effectués, 2 x 50 µl, 100 et 200 µl la mesure de la radioactivité soluble. La concentration de bétanine est déterminée par spectrophotométrie ($\epsilon_{536\text{ nm}} = 60'000$). L'extrait est concentré à 5.0 ml au Rotavapor. La radioactivité de l'extrait concentré est mesurée sur deux aliquotes de 50 µl et la concentration de bétanine à nouveau déterminée par spectrophotométrie.

Tableau 4.1: Bilan de l'incubation d'une jeune racine de *Beta vulgaris* avec dopa-2-¹⁴C.

Racine de <i>Beta vulgaris</i> variété Boule de Feu, âge 6 semaines, incubation d'une durée de 6 heures en présence de dopa-2- ¹⁴ C			
<u>Conditions initiales</u>			
Précurseur	dopa-2- ¹⁴ C		
Activité spécifique [dpm/mol]	9.99 x 10 ¹²		
Concentration du précurseur [nmol/ml]	2147 (en tout 4.23 mg)		
Poids de la racine [g PF]	8.68		
Volume du milieu (MES 0.1M) [ml]	10.0		
<u>Incorporation</u>			
	<u>10⁶ dpm</u>	<u>nmol/ml</u>	<u>%</u>
Incubation 0 heures	221.6	2218	100.0
Incubation 6 heures	184.9	1851	83.5
Différence d'activité	36.7		16.5
Calcul			
Vitesse d'absorption [10 ⁶ dpm/h]	6.12		
Vitesse d'absorption [10 ⁶ dpm*h-1*g P.F-1]	0.70		
<u>Extraction</u>			
Racine avec feuilles [g PF]	23.00		
Poids de la racine [g PF]	8.68		
Poids des feuilles [g PF]	12.32		
Volume de l'extrait [ml]	300		
Activité soluble [dpm x 10 ⁶]	8.69		3.92
Activité insoluble [dpm x 10 ⁶]	non mesuré		
Bétanine totale [mol x 10 ⁶]	11.0		
Bétanine par g PF [nmol/g PF]	1267		
<u>Séparation sur Sephadex SP-C-25 (H+)</u>			
Volume total de l'extrait concentré [ml]	5.0		
Volume séparé sur Sephadex [ml]	2.0		
Activité totale [dpm x 10 ⁶]	2.05		

Séparation et purification des métabolites de la dopa-2-¹⁴C présents dans l'extrait aqueux de *Beta vulgaris*:

Purification de la bétanine, de l'acide bétalamique et du CDG radioactifs par chromatographie échangeuse de cations: 2.0 ml d'extrait concentré sont placés sur une colonne de Sephadex SP-C-25 forme H⁺ de 15 mm Ø x 600 mm hauteur. Un débit de 1.0 ml/min de H₂O-HCOOH pH 2.5 est appliqué avec une pompe péristaltique. La détection est assurée à 280 nm en continu. Des fractions de 5 ml (5 min/ tube) sont prélevées.

Description des fractions: fraction 1, de 10 à 40 min, incolore; fraction 2, de 40 à 80 min, acide bétalamique, λ max. à 410 nm (jaune); fraction 3, de 140 à 250 min, bétanine, λ max. à 536 nm (rouge); fraction 4, de 450 à 700 min, CDG, λ max. 284 nm, (incolore), cette fraction a été partagée en deux fractions appelées CDG 1 et CDG 2. Les tubes contenant

respectivement l'acide bétalamique, la bétanine et le CDG 1 et 2 sont regroupés et les 4 fractions sont concentrées au Rotavapor, puis ajustées à 5.0 ml.

Purification du CDG par chromatographie échangeuse d'ions: Les fractions contenant du CDG séparées préalablement sont concentrées jusqu'à 2.0 ml. Le CDG est chromatographié sur une colonne de 15 mm Ø x 300 mm, support Sephadex SP-C-25 forme [H⁺], phase mobile H₂O-HCOOH 0.001 N, pH 3.5, débit 1.4 ml/min, détection à 280 nm. Le CDG est élué entre 6 heures et 7.5 heures. Les fractions sont concentrées au Rotavapor et le volume ajusté à 5.0 ml (Tab. 4.2 et 4.3).

Tableau 4.2: Incorporation dans l'acide bétalamique, la bétanine et le CDG.

Métabolite	Vol [ml]	L max [nm]	dil. [x]	Abs. [O.D.]	Conc [nmol]	dpm/100µl [dpm]	Act.tot [dpm]	Act.Spéc. [dpm/mol]
Bétanine	5.0	536	40	0.470	1567	2856	142800	9.11 x 10 ¹⁰
Ac. Bétalam.	5.0	410	5	0.465	388	2901	145050	37.4 x 10 ¹⁰
CDG no 1	5.0	284	-	1.57	2309	1033	51650	2.24 x 10 ¹⁰
CDG no 2	5.0	284	-	0.275	402	248	12400	3.08 x 10 ¹⁰
CDG purifié	5.0	284	-	0.60	877	282	14100	1.61 x 10 ¹⁰

Tableau 4.3: Répartition de l'incorporation dans les métabolites.

Incorporation	Radioactivité		Bétanine	
	dpm x 10 ⁵	%	nmol	%
Activité placée sur la colonne	20.50	100.0	4680	100.0
<u>Activité dans les métabolites:</u>				
Bétanine	1.43	6.98	1567	33.5
Acide Bétalamique	1.45	7.07		
CDG	0.64	3.12		
Autres fractions réunies (tête)	1.67	8.15		
Autres fractions réunies (fin)	0.36	1.76	358	7.6

Activité collectée	5.55	27.1	1925	41.1
Pertes	14.95	72.9	2755	58.9

4.2. Incorporation de tyrosine-3-¹⁴C dans une jeune racine de Beta vulgaris.

Matériel végétal et incubation: Une jeune betterave rouge de 4.5 mois (variété Boule de Feu), est préparée comme décrit sous 4.1. La racine mesure 6 cm au diamètre maximum et de 6 cm de hauteur. On prépare 200 ml d'une solution de MES 1M (acide 2N-Morpholino-éthane-sulfonique) à 0.2 g par 100 ml ajustée à pH 6.0 avec NaHCO₃. Au milieu d'incubation, on ajoute 1.46 mg (8.11 µmol) de tyrosine-3-¹⁴C de radioactivité spécifique 1.044 x 10¹⁴

dpm/mol. Deux prélèvements de 25 μ l sont effectués pour déterminer la radioactivité initiale. Au temps 0 min, la racine est plongée dans le milieu d'incubation. Celle-ci est fixée avec du Parafilm, les feuilles bien présentées à la lumière d'un fluorescent. Après 6 heures d'incubation, la racine est sortie du milieu. Le volume du milieu est mesuré et deux prélèvements de 25 μ l sont prélevés. La racine est soigneusement lavée avec de l'eau distillée, puis les feuilles sont coupées. Poids de la racine 127.5 g; celle-ci est pelée: poids 115.3 g (Tab. 4.4).

Extraction: La racine est découpée en morceaux de 5 g environ, qui sont immédiatement plongés dans 300 ml H₂O-HCOOH pH 3.0. Les fragments sont broyés au Tourmix et le pH de l'extrait est ajusté à 2.5 avec HCOOH (l'extraction est effectuée à bas pH pour inactiver les enzymes). L'homogénat est filtré sur un Büchner muni de deux papiers filtres. Les débris cellulaires et le récipient sont lavés avec 200 ml HCOOH pH 3.0. Les deux solutions sont réunies et concentrées au Rotavapor, 12 Torr, 35°C. Le volume est ajusté à 20.0 ml dans un jaugé. La radioactivité extraite (Tab. 4.4) est déterminée sur deux prélèvements de 25 μ l et la concentration de bétanine mesurée par spectrophotométrie ($\epsilon_{536\text{nm}} = 60'000$).

Tableau 4.4: Valeurs expérimentales de l'incubation d'une jeune racine de *Beta vulgaris* avec tyrosine-3-¹⁴C.

Racine de <i>Beta vulgaris</i> variété Boule de Feu, âge 4.5 mois, incubation d'une durée de 6 heures en présence de tyrosine-3- ¹⁴ C			
<u>Conditions initiales</u>			
Précurseur	Tyrosine-3- ¹⁴ C		
Activité spécifique [dpm/mol]	1.044 x 10 ¹⁴		
Concentration du précurseur [nmol/ml]	40.35 (en tout 1.46 mg)		
Poids frais [g PF]	127.5		
Volume du milieu (MES 0.1M) [ml]	200.0		
<u>Incorporation</u>			
	<u>10⁶ dpm</u>	<u>nmol/ml</u>	<u>%</u>
Incubation 0 heures	855.9	41.00	100.0
Incubation 6 heures	738.8	35.38	86.3
Lavage			
Différence d'activité	117.1		13.7
Vitesse d'incorporation [dpm x 10 ⁶ /h]	19.52		
Vitesse d'incorporation par g PF	0.153		
<u>Extraction</u>			
Poids total de la racine [g PF]	127.5		
Poids de la racine pelée [g PF]	115.3		
Volume de l'extrait [ml]	300		
Activité soluble [dpm x 10 ⁶]	1.52		0.178
Bétanine totale [mol x 10 ⁶]	126.7		
Bétanine par g PF [nmol/g PF]	1100		
<u>Séparation sur Sephadex SP-C-25 (H+)</u>			
Volume total de l'extrait concentré [ml]	20.0		
Volume séparé sur Sephadex [ml]	14.0		
Activité totale [dpm x 10 ⁶]	1.52		

Purification de la bétanine radioactive: Chromatographie échangeuse de cations: 14 ml d'extrait concentré (1.52 x 10⁶ dpm) sont placés sur une colonne de Sephadex SP-C-25 forme H⁺ de 60 mm Ø x 100 mm hauteur (30 g de gel sec). Un débit de 2.0 ml/min de H₂O-HCOOH pH 3.0 est appliqué avec une pompe péristaltique. La détection est assurée en continu à 280 nm et des fractions de 10 ml (5 min par tube) sont collectées.

Description des fractions: Fraction 1, de 45 à 77' (incolore); fraction 2, de 78' à 130' (d'abord rose, puis jaune pâle); fraction 3, de 131 à 235', bétanine (rouge); fraction 4, de 236' à 360', reste de bétanine (rouge); fraction 5. de 360' à 460', λ max. à 275 nm, milieu basique 311 nm (incolore); fraction 6. de 461' à 540'; λ max. à 283 nm, milieu basique 311 nm, CDG (incolore). La fraction de bétanine est évaporée à sec au Rotavapor.

Purification de la bétanine par électrophorèse: La fraction de bétanine concentrée est solubilisée dans un minimum de tampon d'électrophorèse pyridine-formiate 0.05 M, pH 4.5. Une colonne de 25 mm Ø x 650 mm hauteur est remplie avec de la cellulose Whatman CF 11 préalablement lavée avec EDTA 0.01 M et équilibrée avec le tampon d'électrophorèse pyridine-formiate 0.05 M, pH 4.5. L'échantillon de bétanine est déposé au sommet de la colonne et il est recouvert de tampon. Deux électrodes de platine sont disposées aux deux extrémités de la colonne. Une différence de potentiel de 800 V , 45 mA, en courant continu est appliquée entre les deux électrodes pendant 14 heures et 20 minutes, puis 1000 V pendant 14 heures et 40 minutes. La vitesse de migration de la bétanine est 2.03 cm/heure. Migration totale en 29 heures: 59 cm. La bande de bétanine est éluée en faisant coulé le tampon pyridine-formiate goutte à goutte. Bétanine totale dans la fraction 1 = 49 µmol (27.0 mg).

Purification de la bétanine par HPLC semi-préparatif: La totalité de la bétanine purifiée par électrophorèse est injectée en deux fois sur une colonne DUPONT, 24 mm Ø x 250 mm, Zorbax RP-18, 7 µm, avec une phase mobile constituée d'un mélange méthanol-eau-acide acétique (20:78:2). 16.3 µmol (8.94 mg) de bétanine sont collectés, temps de rétention 8 min. Le volume de la fraction est ajusté à 10.0 ml dans un jaugé.

Radioactivité spécifique de la bétanine: 4 prélèvements de la solution de bétanine pure sont effectués et leur radioactivité comptée: a) 2 x 25 µl; 27.8 dpm, 40.6 nmol; As 6.85×10^8 dpm/mol; b) 2 x 100 µl; 113.0 dpm, 162.5 nmol; As 6.95×10^8 dpm/mol; **Radioactivité spécifique moyenne: $6.9 \pm 0.6 \times 10^8$ dpm/mol**

Réaction d'échange de base: La bétanine pure 6.5 µmol (3.57 mg) est placée dans un ballon avec 261 µmol (30 mg) de Proline. Dans un deuxième ballon, on met 20 ml de NH₄OH 1 N. Les deux ballons sont reliés à l'aide d'un pont pour le vide. La solution d'ammoniaque est congelée et le vide effectué dans le système. La solution est dégelée et dégazée pour éliminer les traces d'O₂. L'opération est effectuée deux fois. La solution d'ammoniaque est distillée et condensée dans le ballon contenant la bétanine. Temps de réaction, 80 min à 22°C. La solution est distillée et recondensée dans le premier ballon. Tout le système est alors placé sous atmosphère d'Argon et on ajoute 5 ml HCOOH pH 2.0 au mélange réactionnel sec; pH final 2.6.

Séparation de l'Indicaxanthine et du CDG par chromatographie échangeuse de cations:

Colonne de Sephadex SP-C-25 forme H⁺, 30 mm Ø x 160 mm, 13 g de gel sec. Solvant HCOOH pH 3.5. Débit 1.8 ml/min. Détection à 283 nm. La totalité du mélange réactionnel est solubilisé dans 5 ml de H₂O-HCOOH pH 3.5, puis déposé sur la colonne. Les fractions néobétanine, bétanine + indicaxanthine, indicaxanthine et CDG sont collectées (Tab. 4.5).

Tableau 4.5. Description des fractions

Produit	Volume [ml]	DO [DO]	L max [nm]	ϵ	total [nmol]	¹⁴ C [dpm]	Act. Spécif. [dpm/mol]
néobétanine	12.2	0.13	470	18200	87	433±11	50.0 x 10 ⁸
bétanine + inx.	15.1	1.26	481	-----	446	229±11	-----
indicaxanthine	36.9	1.11 ¹⁾	485	42660	4800	3446±236	7.18 x 10 ⁸
cyclodopagluoside	67.4	0.26	284	3420	5120	1004±48	1.96 x 10 ⁸
----- Rapport As CDG / As Indicaxanthine = 1 / 3.7 -----							

1) dilué 5 fois

Dosage du cyclodopa glucoside par HPLC dans l'extrait de Beta vulgaris:

Une aliquote de 100 µl de l'extrait de betterave rouge est séparé par HPLC en phase inverse, Lichrosorb RP-18, 5 µm, 4.6 mm Ø x 250 mm, débit 1.0 ml/min: de 0 à 22 min, tampon NaH₂PO₄ 0.01M, acidifié à pH 2.5 avec H₃PO₄ concentré, de 22 min à 40 min, un mélange H₂O-CH₃OH (80%-20%) pour éluer la bétanine et les autres pigments. La fraction contenant le cyclodopa glucoside est collectée à 7 min: volume de la fraction 1.2 ml, ajusté à 5.0 ml, puis mesure de la DO ($\epsilon_{283\text{nm}} = 3400$) = 0.0825; concentration 121 nmol pour 0.1 ml d'extrait. Expression des résultats en nmol par g PF: CDG = 210 ; bétanine = 1100 ; rapport CDG / bétanine = 0.19

5. Le cyclodopa glucoside.

5.1. Formation du CDG à partir de la bétanine.

acide (2S)-5-(β-D-Glucopyranosyloxy)-6-hydroxyindoline-2-carboxylique.

Le CDG obtenu selon [57] est recristallisé dans H₂O. Point de fusion 159.5 à 162.5 °C (décompose > 167°C); $[\alpha]_D$ à 20.5 °C = -110.7° (H₂O, pH 3.0; c = 4.65 mg/ml); UV (H₂O, pH 3): 284 nm, epsilon 3400; UV (H₂O pH 11): 311 nm, epsilon 5000. IR: (KBr; bandes d'intensité s, sinon spécifié): 3540, 3470, 3185, 3230, 3160, 2980, 2950, 2935, 2920, 2885, 2865, 2580m, 2500m, 1643, 1628, 1600, 1505, 1460, 1450, 1415, 1395, 1380-1370, 1350, 1328, 1295, 1273, 1255, 1230, 1208, 1191, 1661, 1140, 1131, 1121m, 1108, 1090, 1068, 1058, 1050, 1032, 1022, 1015, 1008, 990m, 943m, 912w, 900m, 865, 850, 830, 785, 755, 713, 698-690, 665, 629, 611.

MS: 357 (trace), 274 (0.6), 252 (0.6), 223 (2), 194 (11, C₆H₁₁O₅⁺), 171 (1), 150 (5), 149 (4.5), 98 (9), 81 (16), 71 (100), 69 (23), 68 (23).

1H - RMN (360 MHz) dans D₂O: 3.30 (dd, 6.4 et 16.1 Hz, 1H, H_βC(3)); 3.53 (ddd, 16.1 et 1.9 Hz, 1H, H_αC(3)); 3.49 à 3.54 (m, 1H, HC(4')); 3.57 à 3.66 (m, 3H, HC(2'), HC(3'), HC(5')); 3.76 (dd, 5.3 et 12.4 Hz, 1H, H_βC(6')); 3.92 (dd, 2.3 et 12.4 Hz, 1H, H_AC(6')); 4.68 (dd, 9.7 et 6.4 Hz, HC(2)); 5.07 (m, 1H, H_βC(1')); 6.99 (s, 1H, HC(4)); 7.19 (s, 1H, HC(7)) (Tab. 5.2)

Détermination des pK par spectroscopie UV: 1. Des aliquotes d'une solution aqueuse de CDG sont ajoutés à des solutions diluées de HCl et les spectres immédiatement mesurés (spectrophotomètre Hewlett Packard Diode Array 8450A); le pH des solutions est mesuré après. 2. Une solution de CDG dans H₂O ajustée à pH 2.75 avec HCl dilué est graduellement alcalinisée à l'exclusion d'oxygène. Les spectres UV et le pH de la solution aqueuse de CDG sont mesurés à travers une cuvette en quartz à circulation en continu. Une pompe péristaltique assure un débit constant à travers la cellule de mesure. Les résultats de 1 et 2 sont compilés dans le Tab. 5.1. Le spectre UV change avec le pH en fonction des différents états de protonation du CDG. Les pK_a du CDG ont été déterminés graphiquement à partir des données du Tab. 5.1 et sont représentés dans la Fig. 5.1: voir Fig. 4.3.1 partie théorique: pK_{a1} = 1.58, pK_{a2} = 4.75, pK_{a3} = 9.42 (c = 7.7 x 10⁻⁵ mol/l)

Fig. 5.1: Détermination des pKa du cyclodopa glucoside par spectroscopie UV.

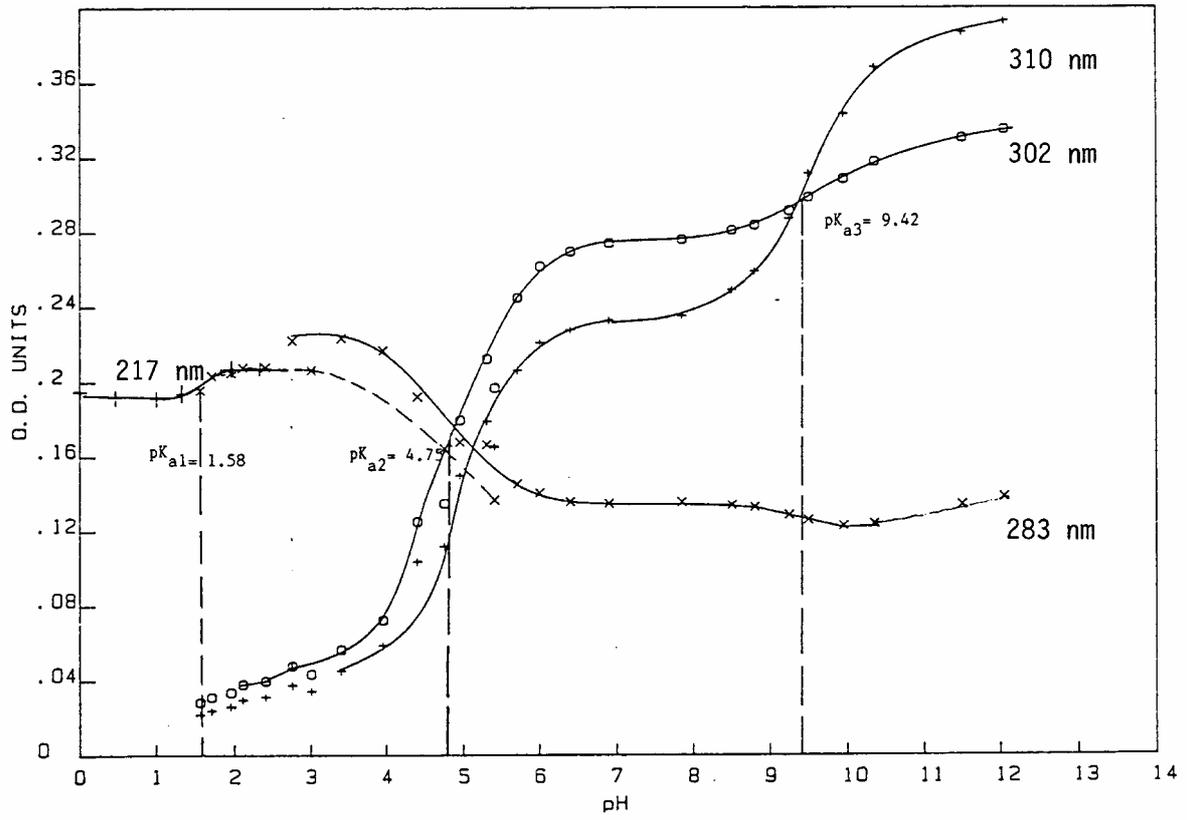


Tableau 5.1: Spectroscopie UV du CDG à différents pH

pH	L max	OD à L max	OD à 283 nm	OD à 302 nm	OD à 310 nm
1ère série de mesures					
0	218	0.792	0.490		
0.5	217	0.777	0.490		
1.0	217	0.783	0.492		
1.35	217	0.793	0.494		
2.0	217	0.834	0.505		
2.35	217	0.837	0.499		
2ème série de mesures					
2.75	283	0.222	0.222	0.047	0.037
3.40	283	0.223	0.223	0.056	0.045
3.95	284	0.217	0.216	0.072	0.059
4.40	286	0.197	0.192	0.125	0.104
4.95	292	0.190	0.167	0.179	0.150
5.30	301	0.212	0.166	0.212	0.179
5.70	302	0.245	0.145	0.245	0.206
6.00	302	0.261	0.140	0.261	0.221
6.40	302	0.269	0.135	0.269	0.228
6.90	302	0.274	0.134	0.274	0.233
7.85	302	0.276	0.135	0.276	0.235
8.50	303	0.281	0.133	0.280	0.249
8.80	304	0.285	0.132	0.283	0.259
9.25	305	0.299	0.128	0.291	0.287
9.50	308	0.316	0.125	0.298	0.311
9.95	309	0.344	0.122	0.308	0.343
10.35	310	0.368	0.124	0.317	0.368
11.50	311	0.387	0.134	0.330	0.386
12.05	311	0.334	0.138	0.334	0.392

5.2. Isolement du CDG, de l'acide bétalamique et de la bétanine à partir de racines de betteraves rouges.

a) dans une racine jeune.

Une jeune racine de *Beta vulgaris* (variété Boule de Feu) d'un poids de 23 g et âgée de 30 jours est soigneusement lavée. La racine est pelée (poids 16 g) et broyée au "turmix" avec 50 ml de HCOOH 0.1 N. L'homogénat est filtré sur un Büchner muni d'un papier filtre et le filtrat est concentré jusqu'à 17.5 ml. Un spectre UV-Vis est effectué, OD à 536 nm = 1.56 (dilution 40 x) et la concentration de bétanine est calculée à 1140 nmol/g PF

Une aliquote de 4.0 ml de cet extrait est chromatographié sur une colonne de Sephadex SP-C-25 (H⁺), 30 x 2.5 cm, avec un débit de HCOOH 0.1N de 1.0 ml/min. Dans l'ordre d'élution apparaissent d'abord une bande mauve, suivie d'une bande jaune claire (acide bétalamique), puis les bétacyanes, les bétaxanthines et finalement le cyclodopa glucoside.

Acide bétalamique: fr. 11 à 15, 16 ml, $OD_{420\text{nm}} = 0.70$; fr. 18 à 21, 18 ml, $OD_{420\text{ nm}} = 0.325$; fr. 22 à 25, 19 ml, $OD_{420\text{nm}} = 0.22$; $\epsilon_{420\text{ nm}} = 30000^*$), 708 nmol.

*) Linda Kimler, thèse sur l'identification de l'acide bétalamique dans les fleurs de *Portulaca grandiflora*.

Bétanine: fr. 18 à 48, vol 168 ml, $OD_{536\text{ nm}} = 0.996$; $\epsilon_{536\text{ nm}} = 60000$, 2690 nmol.

Bétaxanthines: fr. 34 à 37, 18 ml, $OD_{474\text{ nm}} = 0.42$; fr. 38 à 40, $OD_{474\text{ nm}} = 0.635$; $\epsilon_{474\text{ nm}} = 41800$, 390 nmol.

Cyclodopa glucoside: fr. 49 à 62, concentré à 18 ml, $OD_{284\text{ nm}} = 0.25$; $\epsilon_{284\text{ nm}} = 3400$, 1320 nmol.

Test d'identification de l'acide bétalamique: 0.5 ml de la fr. 11 à 15 d'acide bétalamique (12 nmol) sont ajoutés à 0.5 ml de la fr. CDG (37 nmol); le pH est ajusté à 6 avec NaOH 0.1 N et la solution est placée sous Argon dans une cuvette en quartz de 1 cm pour spectroscopie UV. La formation de la bétanine est mesurée à 536 nm. La réaction est complète après 24 heures à 20°C. $\epsilon_{420\text{ nm}}$, pH 3.2 calculé pour l'acide bétalamique: 33000.

Concentration des différents métabolites exprimée en nmol/g PF:

bétacyanes, 760; bétaxanthines, 110; CDG, 360; acide bétalamique, 190.

Rapport des concentrations:

CDG/bétacyanes = 0.47; ac.bétalamique/bétacyanes = 0.25 ; CDG/ac. bétalamique = 1.9

b) dans une racine mûre.

Une racine de *Beta vulgaris* (var. Boule de Feu) de 239 g est soigneusement lavée et pelée (poids 193 g). La racine est découpée et broyée dans un "turmix" équipé de filtres de nylon de 0.3 mm de porosité. Le jus de betterave est collecté dans un Bécher et acidifié avec 0.85 ml HCOOH concentré, pH mesuré 3.3, volume 94 ml. Le jus de betterave est filtré sur un tampon d'ouate, puis centrifugé à 3500 rpm pendant 15 min. Le surnageant est prélevé et le pH ajusté à 2.5 avec 1.6 ml HCOOH concentré.

Chromatographie: 15 ml du jus de betterave acidifié (correspond à 30.8 g de racine) sont chromatographiés sur une colonne de Sephadex SP-C-25 (H^+), 30 x 2.5 cm, avec un débit de 2.0 ml de HCOOH 0.1 N. La détection est effectuée à 280 nm par un spectrophotomètre Cécil 202. Un collecteur partage l'effluent en fractions de 20 ml.

Fr 2-3, 40 ml, $OD_{255} = 0.52$ (dil 2x); fr. 5, acide bétalamique, 20 ml, $OD_{435} = 1.52$ (dil 2x), $\epsilon = 30000$, 0.00203 mmol; fr. 7-9, 60 ml, rouge-orangé, trois maxima à 320, 410 et 530 nm; fr. 10-14, bétanine, 100 ml, $OD_{536} = 1.42$ (dil 5x), $\epsilon = 60000$, 0.0118 mmol; fr. 15-18, bétanine + bétaxanthines, 80 ml, épaulement à 480 nm, $OD_{536} = 0.285$ (dil 2x), $\epsilon = 60000$,

0.00076 mmol; fr. 20-22, isobétanine, 60 ml, $OD_{536} = 0.30$, $\epsilon = 60000$, 0.0003 mmol; fr. 40-48, cyclodopa glucoside, 173 ml, $OD_{283} = 0.09$, $\epsilon = 3400$, 0.00458; fr. 96-97, jaune, $OD_{467} = 0.14$.

Concentration en nmol par g de racine (poids frais): bétacyanes totales = 429 nmol/g; acide bétalamique = 65 nmol/g; cyclodopa glucoside = 149 nmol/g

Rapport des concentrations: CDG/bétacyanes = 0.35; ac. bétalamique/bétacyanes = 0.15; CDG/ac. bétalamique = 2.3

5.3. Le N-formyl-cyclodopa glucoside (FCDG) et le 5-O-glucoside de l'acide 5,6-dihydroxy-indolacétique à partir du cyclodopa glucoside.

Isolement par chromatographie échangeuse de cations: Une solution de CDG (68 mg) conservée 3 mois au réfrigérateur en solution aqueuse d'HCOOH 0.1N est chromatographiée sur une colonne de Sephadex SP-C-25 H⁺ (15 x 3 cm) à pH 3.5. La détection est effectuée à 284 nm. Après un volume mort de 43 ml, deux pics de 43 ml chacun apparaissent, suivis par 280 ml d'effluent ne contenant pas de produit; puis une bande légèrement rose apparaît (86 ml), suivie par le pic de cyclodopa glucoside (450 ml). Les deux premiers pics sont concentrés et leurs caractéristiques physicochimiques déterminées.

Isolement par HPLC préparatif en phase inverse: Une solution de CDG (54 mg) conservée 3 mois au réfrigérateur en solution aqueuse d'HCOOH 0.1N (100 ml) sous Argon. Elle est concentrée à 5 ml puis chromatographie sur une colonne HPLC de 25 x 2.5 cm préparée avec un support Merck: Lichrosorb RP-18, 5 μ m. Les conditions de chromatographie sont les suivantes: débit 8.0 ml/min; de 0 à 41 min, 100 % H₂O-HCOOH 0.1N, puis un gradient de 0 à 10 % CH₃CN en 30 min, suivi par un lavage de la colonne avec 40 % H₂O - 30 % CH₃CN - 30 % CH₃OH. Le CDG élue vers 13 min (200 ml) et le N-formyl-cyclodopa glucoside vers 60 min (100 ml). La fraction contenant le FCDG est concentrée au Rotavapor à 28°C échangée avec D₂O et séchée sous un courant d'azote. Après 12 h de séchage sur CaCl₂ dans un dessiccateur, le FCDG (27.5 mg) est mis en solution dans D₂O pour spectroscopie RMN ¹³C (360 MHz).

N-formyl-cyclodopa glucoside: acide (2S)-1-formyl-5-(β -D-glucopyranosyl-oxy)-6-hydroxy indoline-2-carboxylique

UV (H₂O, pH neutre): λ max. 253 (ϵ =11000) et 307 (10500); λ min 232 (ϵ =6500) et 276 (ϵ =2400). UV (H₂O/2 gouttes de NaOH 0.1 N): λ max. 255 (épaulement ϵ =8800), λ max. 324 (ϵ =10200); L min 286 (ϵ =1800).

¹H RMN (360 MHz): voir Tab. 5.2

¹³C RMN (360 MHz): déplacement chimique en [ppm] par rapport au TSP, dans D₂O.

Glucose : C1, 104.9; C2, 75.8; C3, 79.1; C4, 72.3; C5, 78.4; C6, 63.4. **Formyl-cyclodopa**: C0, 178.6; C1, 62.6 / 64.6; C2, 35.0; C3, 124.7; C4, 117.6 / 116.9; C5, 148.8; C6, 145.2; C7, 104.9 / 107.8; C8, 138.6; C9, 162.9 / 165.8 70% forme (E) / 30 % forme (Z)

acide 5-(β -D-Glucopyranosyloxy)-6-hydroxyindol-2-carboxylique

UV (H₂O, pH neutre): λ max. 310 (0.42), infl L 246 (0.23), λ min 268 (0.14). UV (H₂O, pH alcalin): λ max. 326 (0.40), infl. λ 252 (0.24), λ min. 280 (0.12). UV (CH₃OH neutre): λ max. 251 (0.165), λ max. 312 (0.312), λ min. 240 (0.160), 271 (0.11).

UV (CH₃OH alcalin): λ max. 264-5 (0.15), 331 (0.32), λ min. 252 (0.095).

Tableau 5.2: RMN-¹H à 360 MHz du cyclodopa glucoside et du N-formyl-cyclodopa glucoside

Position du proton	cyclodopa glucoside	N-formyl-cyclodopa glucoside	
	solvant D ₂ O	solvant D ₂ O forme E 61 %	solvant D ₂ O forme Z 39%
H-C(2)	4.68 (dd, J(2,3 α)=9.7)	4.91 (dd, J(2,3 α)=11.5)	4.99
H β -C(3)	3.30 (dd, J(2,3 β)=6.4)	3.08 (dd, J(2,3 β)=3.9)	3.19
H α -C(3)	3.53 (ddd, J(3 α ,3 β)=16.1, J(3,4)=1.9)	3.46 (dd, J(3 α ,3 β)=16.2)	3.52
H-C(4)	6.99 (s)	7.06 (s)	7.06 (s)
H-C(7)	7.19 (s)	6.86 (s)	7.50 (s)
H-C=O		8.73 (s)	8.31 (s)
H-C(1')	5.07 (m)	4.96 (m)	4.99 (m)
H-C(2')	3.57-3.66 (m)	3.5-3.7 (m)	3.5-3.7 (m)
H-C(3')	3.57-3.66 (m)	3.5-3.7 (m)	3.5-3.7 (m)
H-C(4')	3.49-3.54 (m)	3.5-3.7 (m)	3.5-3.7 (m)
H-C(5')	3.57-3.66 (m)	3.5-3.7 (m)	3.5-3.7 (m)
HA-C(6')	3.92 (dd, J(5',6'A)=2.3, J(6'A,6'B)=12.4)	3.93 (dd, J(6'A,5')<2, J(6'A,6'B)=12.3)	
HB-C(6')	3.76 (dd, J(5',6'B)=5.3)	3.77 (dd, J(6'B,5')=4.2)	

6. Cultures de cellules.

6.1 Composition des milieux de culture: milieu B5 et MS.

Milieu B5 (Gamborg O.L., Plant. Physiol., 1970, 45,p.372-375)

Milieu MS (Murashige & Skoog, Physiol. Plant., 1962, 15, 473)

Constituants en mg/L	milieu B5	milieu MS ³⁾
(NH ₄) ₂ SO ₄ ¹⁾	134	0
NH ₄ NO ₃	0	1650
KNO ₃ ¹⁾	2500	1900
H ₃ BO ₄	3	6.1
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150	0
KH ₂ PO ₄	0	1.70
KI	0.75	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0	0.025
CaCl ₂	150	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	250	370
MnSO ₄ .H ₂ O	10	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
K ₂ EDTA	40.5	40.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	27.85
Myo-inositol	100	100
Glucose ²⁾	3 %	2 %
pH	5.8	5.8
Vitamines de Morel	milieu B5	milieu MS
Thyamine HCl	1	1
Ac. Nicotinique	1	0
Pantothénate de Calcium	1	0
Biotine	0.01	0
Pyridoxine HCl	1	0
Ac. Folique	10	0

1) le rapport de l'azote sous forme NO₃ par rapport à l'azote sous la forme NH₄ est de 347/28.9 = 12.0 dans le milieu B5. 2) la solution de glucose est stérilisée séparément. 3) milieu H: milieu MS dilué 1:1 et contenant 1 % de saccharose, pH 5.8 et milieu H modifié: milieu H dont le NH₄NO₃ est remplacé par 950 mg/l de KNO₃; myo-inositol à 110 mg/l; 5 g mannitol/l; pH 5.8. [67]

6.2 Sélection de cellules contenant des bétalaïnes et dépourvues de pigment.

Les cultures de cellules de **Beta vulgaris L.** sur Agar sont un cadeau du professeur M.H. Zenk [39]. Les cellules ont été anergiées. La méthode utilisée ne nous a pas été communiquée. Deux techniques sont fréquemment utilisées: la première consiste à blesser une jeune racine de betterave rouge à la naissance de la tige, en condition stérile; la blessure est alors infectée avec *Agrobacterium tumefaciens* et après 2 semaines, une tumeur apparaît généralement. L'extérieur de la tumeur est stérilisé et plusieurs prélèvements sont effectués au centre de celle-ci. Les prélèvements sont disposés séparément sur du milieu sans hormones. Des cals peuvent alors se développer et usuellement, une partie de ceux-ci ne sont pas infectés par *Agrobacterium*. Un antibiotique est parfois ajouté au milieu de culture. La deuxième technique fait appel à l'observation de cals cultivés sur du milieu avec des hormones. Parfois, sur un cal, un groupe de cellules se développe plus vite que les autres et par sélection, ces cellules se développent sur du milieu dépourvu d'hormones [40].

Les cellules anergiées sont d'abord transférées sur Agar avec du milieu B5 frais sans hormones. Après plusieurs transferts, les cals sont sélectionnés pour leur pigmentation ou l'absence de pigment. La souche pigmentée est appelée **BVR** et la souche qui en est dépourvue, **BVW**. Ces cals sont transférés plusieurs fois et ils sont chaque fois sélectionnés. Les cals rouges, et respectivement incolores, qui sont très friables, sont induits en suspension liquide avec le même milieu. Ils sont ensuite transférés et maintenus dans du milieu B5 pendant la durée de toutes les expériences. Le transfert dans du milieu frais est effectué tous les 3.5 jours.

6.3 Préparation des cultures pour l'analyse des acides aminés.

Deux Erlenmeyers de 300 ml contenant chacun 100 ml de milieu avec des cultures âgées de 3.5 jours sont réunies. La suspension homogène est partagée en 7 portions contenant chacune environ 1 g PF de cellules. Chaque inoculum est complété à 100 ml avec du milieu frais. L'opération est effectuée de la même manière avec les deux souches de cellules BVR et BVW.

6.4 Mesure de la vitesse de croissance.

La première mesure est effectuée 2 heures après le transfert, puis les suivantes toutes les 24 heures. Des prélèvements de 2 ml de suspension cellulaire sont effectués et déposés dans un

tube de 50 ml à fermeture étanche (Sovirel). On ajoute 8 ml d'une solution d'acide chromique à 10 %. Le tube fermé est mis à incuber 30' à 60°C. Le tube est placé sur un agitateur "Baird & Taitlock" pendant 5' (agitation très violente). Une goutte de la préparation est placée sur une cellule de comptage (type Neubauer) quadrillée dont le volume est connu. Les cellules sont comptées au microscope sous le champ d'un objectif de 10 X. La dilution est calculée pour obtenir environ 300 cellules pour 3 champs de comptage. Une moyenne est calculée sur 3 à 5 champs. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules x 10⁵ par ml de milieu dans le tableau 6.1. L'erreur systématique est estimée comme étant inférieure à 10% sur la base d'essais préliminaires (non présentés ici).

6.5 Mesure de la teneur en protéines par gramme de tissu frais.

Méthode turbidimétrique: les avantages de cette méthode sont la rapidité, la possibilité de traiter un grand nombre d'échantillons et particulièrement dans notre cas, elle se montre exempte d'interférences avec les pigments et composés phénoliques qui sont toujours présents dans les tissus végétaux. La méthode turbidimétrique* permet une mesure dans une gamme spectrale où les interférences sont rares: bande de 750 à 800 nm.

* Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., J. Biol. Chem., **1951**, 234, 2133-2137

Des prélèvements de 3 à 5 ml de suspension cellulaire sont prélevés et filtrés sur un filtre Millipore de 5 µm. Les cellules sont pesées (poids frais, g PF) et homogénéisées avec 5 ml de tampon Tris-HCl 1 mM à pH 7.80 pendant 2' dans un bain de glace. L'homogénat est centrifugé 10' à 10000 rpm (5°C). Le surnageant est récupéré et le culot est lavé une fois avec 5 ml de tampon et centrifugé. Les deux surnageants sont réunis et le volume complété à 10 ml si nécessaire. L'extrait est conservé au bain de glace. 5 solutions standard d'albumine sérique de boeuf (BSA) sont préparées: concentration de 0.5 à 2.5 mg/ml. L'analyse de ces standards est effectuée immédiatement avant celle des échantillons. Une série de tubes à essais contenant 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10 % sont placés dans un bain de glace. Les échantillons sont analysés successivement. Au temps 0", 0.5 ml de l'échantillon est ajouté à la solution de TCA froide. La solution est homogénéisée pendant 15" avec un "vortex". La mesure est effectuée à 30" avec un spectrophotomètre Hewlett Packard HP-8450 à 750 nm. Les résultats sont exprimés en [µg équivalent BSA par mg PF] dans les tableaux 6.1 et 6.2.

Tableau 6.1.: *Beta vulgaris*: souche rouge BVR

Age[jour]	0	1	2	3	4	5
cellule ¹	2.10	2.15	3.42	4.03	5.03	5.45
rel. ²	1.00	1.02	1.63	1.92	2.39	2.59
ln ³	0	0.02	0.49	0.65	0.87	0.95
mg/ml ⁴	27	29	36	68	91	97
rel. ²	1.00	1.07	1.33	2.52	3.37	3.59
ln ³	0	0.07	0.28	0.92	1.21	1.28
protéines ⁵	4.30	6.23	7.73	15.87	18.87	26.23

Tableau 6.2.: *Beta vulgaris*: souche incolore BVW

Age[jour]	0	1	2	3	4	5
cellule ¹	1.68	1.59	1.79	2.15	3.01	3.59
rel. ²	1.00	0.95	1.06	1.28	1.79	2.13
ln ³	0	-0.05	0.06	0.25	0.58	0.75
mg/ml ⁴	29	26	29	42	57	64
rel. ²	1.00	0.90	1.00	1.45	1.96	2.20
ln ³	0	-0.10	0	0.37	0.67	0.79
protéines ⁵	3.60	4.21	5.20	7.68	11.79	12.14

1) 10⁵ cellules/ml; 2) valeur relative; 3) logarithme naturel de la valeur relative; 4) poids frais en mg/ml.

5) protéines en µg équivalent BSA par mg PF

6.6 Mesure de la concentration de bétanine et du taux d'acides aminés libres.

Le restant de chaque culture est filtré sur un Büchner muni d'un filtre nylon de 100 µm. Une légère succion est appliquée pendant 60" avec une trompe à eau. Les cellules sont pesées, puis extraites avec 30 à 50 ml H₂O-HCOOH 0.01 M pH 2.8 avec un Potter-Elvehjm. L'homogénat est alors centrifugé à 5000 rpm pendant 10'. Le surnageant est prélevé et le culot est extrait avec 20 ml H₂O, puis centrifugé. Les deux surnageants sont réunis et filtrés avec un filtre de 0.5 µm. Le système de filtration est rincé avec 4 à 5 ml H₂O. Le volume de l'extrait est mesuré. Le spectre UV-Visible de la solution limpide est mesuré et la D.O. à 536 nm est relevée. Le culot de centrifugation est déshydraté dans un dessiccateur sur CaCl₂ pour estimer le résidu sec des tissus extraits. Les résultats sont exprimés en [10⁻⁶ mol de bétanine par g PF] dans le tableau 6.3.

L'extrait est concentré au Rotavapor à 35°C et 12 Torr. L'analyse des acides aminés est effectuée sur un autoanalyseur LC 7000 de Spectra Physics et les résultats sont exprimés en [nmol d'acide aminé par g PF] dans les tableaux 6.4a et 6.4b. Un soin tout particulier a été

porté à l'identification de la dopa qui n'est pas un acide aminé protique et n'est de ce fait pas caractérisé dans le système d'analyse original ¹⁾).

1) Analyses par Dr Lavanchy, Institut Suisse de Recherche Laitière, Liebefeld, Suisse.

Tableau 6.3: Données expérimentales.

Age [jour]	0	1	2	3	4	5	8
poids frais en g:							
BVR	0.69	1.01	1.67	1.37	2.18	1.48	1.5
BVW	1.01	2.15	1.5	1.22	2.18	1.68	1.5
résidu sec en mg:							
BVR	16.1	22.2	40.5	38.3	53.2	39.8	32.7
BVW	37.3	78.3	60.3	44.3	76.3	58.5	42.1
résidu sec x100/poids frais							
BVR	2.3	2.2	2.4	2.8	2.4	2.7	2.2
BVW	3.7	3.6	4	3.6	3.5	3.5	2.8
volume de l'extrait							
BVR	52.5	56.1	56.3	57	58.4	55.4	55.7
BVW	57.4	62.2	63.8	55.7	60.4	53.7	59
densité optique à 536 nm							
BVR	0.54	0.75	1.14	1.235	1.831	1.395	1.627
BVW	0	0	0	0	0	0	0
µmol bétanine par g PF							
BVR	0.685	0.694	0.641	0.856	0.817	0.87	1.007
BVW	0	0	0	0	0	0	0

italique: dilution de l'extrait deux fois pour la mesure de la D.O à 536 nm

Tab. 6.4.a: acides aminés libres dans les cultures BVR en fonction du temps

Jour	0	1	2	3	4	5	8
Poids cellulaire relatif	1.0	1.07	1.33	2.52	3.37	3.59	ND
aspartate	ND						
thréonine	ND						
sérine	ND						
glutamine	1369	1904	1823	1552	1424	1597	836
glutamate	887	2100	928	757	224	288	155
proline	ND						
glycine	115	89	101	75	35	36	30
alanine	972	1004	1629	885	630	496	501
citrulline	ND	ND	31	28	15	15	ND
valine	157	643	616	583	135	148	119
methionine	18	82	52	28	9	10	9
dopa	62	439	554	607	117	136	92
isoleucine	54	222	237	215	52	55	46
leucine	70	282	275	207	44	45	53
tyrosine	50	136	165	164	39	52	57
phenylalanine	41	70	56	58	22	30	30
β-alanine	49	53	50	53	42	45	59
β-amino butyrate	678	555	551	569	415	376	692
éthanolamine	90	143	93	80	57	69	121
ammonium	ND						
ornithine	45	15	20	8	7	4	4
lysine	40	142	122	54	32	33	41
histidine	20	115	130	78	16	15	14
arginine	8	93	74	34	8	4	5
bétanine	685	694	641	856	817	870	1007

Tab. 6.4.b: acides aminés libres dans les cultures BVW en fonction du temps

Jour	0	1	2	3	4	5	8
Poids cellulaire relatif	1.0	0.9	1.0	1.45	1.96	2.21	ND
aspartate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
thréonine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
sérine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
glutamine	976	4245	7037	3268	3589	2258	695
glutamate	1719	10178	3997	493	196	183	52
proline	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
glycine	68	251	441	152	53	71	45
alanine	3219	5342	6030	2950	2865	1773	1001
citrulline	ND	ND	17	21	ND	ND	ND
valine	171	1494	1306	454	204	164	75
methionine	21	208	73	19	15	16	7
dopa	0	139	64	27	16	0	0
isoleucine	36	237	189	72	53	43	28
leucine	75	413	229	71	78	53	44
tyrosine	40	176	185	94	54	50	23
β-alanine	50	56	69	48	45	38	20
β-amino butyrate	1800	1848	1820	1302	1189	817	716
éthanolamine	222	420	356	263	420	284	160
ammonium	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ornithine	15	28	24	7	3	7	4
lysine	63	232	100	56	ND	36	45
histidine	28	199	92	18	ND	36	15
arginine	14	190	43	8	5	4	3

ND = non-déterminé

7. La dopamine dans les suspensions cellulaires de *Beta vulgaris*.

7.1. Isolement, purification et identification de la dopamine comme métabolite principal dans les cultures de cellules de *Beta vulgaris*.

Extraction: deux suspensions âgées de respectivement 7 et 13 jours, cultivées dans les conditions standard (Exp. chap. 6) avec 200 ml de milieu B5 sont mélangées et filtrées sur Büchner muni d'un filtre de 100 µm. Les cellules sont lavées avec 50 ml H₂O distillée et pesées (55 g PF). La biomasse est homogénéisée dans 200 ml HCOOH pH 3.0 par un broyeur mécanique (Polytron) tournant à 18'000 rpm. L'homogénat est centrifugé 15 min à 5000 x G. Le surnageant est filtré 0.45 µm et l'extrait aqueux clarifié est concentré à sec au Rotavapor. Le volume de l'extrait sec est amené à 5.0 ml. 100 µl de cette solution sont prélevés et dilués à 58.0 ml pour spectroscopie UV-visible, DO à 536 nm = 0.47, bétanine totale = 22.7 µmol (12.5 mg) pour 55 g P.F, soit 413 nmol par g PF

Chromatographe HPLC préparative: l'extrait concentré (5 ml) est filtré à travers une précolonne Hamilton Chrom-Prep contenant un support RP-18. Le filtrat est injecté sur une colonne préparative DUPONT Zorbax RP-8. Dans les conditions décrites ci-dessous

Séparation HPLC colonne débit phases mobiles	préparative Dupont Zorbax RP-8, 7 µm, 2.5 Ø x 25 cm 10 ml/min A = NaH ₂ PO ₄ 0.01 M, pH 4.5 B = HCOOH pH 3.0 + 10 % CH ₃ OH C = HCOOH pH 4.0 + 10 % CH ₃ OH			
gradient par "step"	temps	% A	% B	% C
	0 min	100	0	0
	16	100	0	0
	16	0	100	0
	50	0	100	0
	50	0	0	100
	62	0	0	100
détection UV intégration	280 nm, échelle 0 à 2.0 DO intégrateur HP 3380A			

Le pic principal, temps de rétention 16 à 18 min est collecté: UV max. (H⁺) = 280 nm, (OH⁻) = 296 nm. La fraction est concentrée à sec au Rotavapor. Cette fraction contient du phosphate provenant de la phase mobile A et pour éliminer ce sel, elle est injectée sur la même colonne

avec comme phase mobile HCOOH pH 3.0 + 1 % CH₃OH à 10 ml/min. La fraction est collectée entre 13 et 20 min: UV max. (H⁺) = 280 nm, (OH⁻) = 297 nm.

HPLC analytique: cette fraction est concentrée à sec au Rotavapor et injectée avec 100 µl HCOOH pH 3.0 sur une colonne de 4.5 x 25 cm, Lichrosorb RP-18, 5 µm. Conditions isocratiques: phase mobile HCOOH pH 3.0 et débit 1 ml/min, détection à 280 nm. Le produit purifié est collecté entre 3 et 14 min. La fraction est concentrée à sec. Le produit est dissous dans D₂O et évaporé deux fois avec le même solvant pour échange isotopique. Un spectre RMN-¹H 360 MHz est effectué dans D₂O. Les spectres de masse en impact électronique (IE) et en ionisation chimique (IC) sont déterminés.

Radiochromatographie: une aliquote de 20 µl d'un extrait radioactif provenant de l'expérience d'incorporation à 60 min avec tyrosine-3',5'-³H et dopa-3-¹⁴C comme précurseurs est cochromatographié avec 10 µl de la solution pour RMN. La détection est effectuée en UV à 280 nm et la radiodétection des isotopes ¹⁴C et ³H par le FLOONE. Le temps de rétention mesuré en UV est de 8'42" pour le produit isolé et de 8'48" ± 6" pour le produit radioactif ¹⁴C et ³H. Conditions HPLC décrites ci-dessous. Voir également Exp. chap. 8.3.

Séparation HPLC colonne débit phases mobiles	analytique Lichrosorb RP-18, 5 µm, 0.45 Ø x 25 cm 1 ml/min A = NaH ₂ PO ₄ 0.05 M, pH 4.5; B = CH ₃ CN; C = CH ₃ OH			
gradient	temps	% A	% B	% C
	0 min	100	0	0
	25	95	5	0
	35	40	30	30
	40	40	30	30
équilibration	50	100	0	0
	60	100	0	0
détection UV intégration détection ¹⁴ C+ ³ H	280 nm intégrateur HP 3380A FLOONE HP, réglage des fenêtres pour les deux isotopes, voir exp chapitre 2			

Identification du produit: la dopamine a été identifiée selon les critères du poids moléculaire, des spectres UV en conditions acide et basique, du spectre RMN-¹H et par le temps de rétention en cochromatographie avec les extraits radioactifs de suspensions de *Beta vulgaris* incubées avec dopa-¹⁴C et tyrosine-³H.

Dopamine:

C₈H₁₁O₂N PM = 153.18

UV: λ max. (H₂O pH 2.5) = 280 nm; (H₂O pH 13) = 296 nm

RMN ¹H: 360 MHz; solvant D₂O; 2.87 (t, 14 Hz, 2H, C(1')H₂); 3.22 (t, 14 Hz, 2H, C(2')H₂); 6.76 (dd, 8 Hz et 2 Hz, 1H, HC(6)); 6.85 (d, 2 Hz, 1H, HC(2)); 6.91 (d, 8 Hz, 1H, HC(5))

MS (IE): 153 (14.8), 136, 124 (PB), 106, 94, 77, 51

MS (IC): 153, 140, 101, 83, 76, 73

HPLC: Cochromatographie avec le produit radioactif: temps de rétention UV = 8'41" et radioactif = 8'48" ± 6".

8. Cinétique d'incorporation dans les cultures de tissus.

8.1. Introduction.

Dans ce chapitre, sont décrits les expériences d'incubation de tyrosine-3-¹⁴C et dopa-3-¹⁴C dans les cultures de cellules. Les résultats de ces deux séries d'expériences sont présentés dans deux tableaux principaux regroupés par précurseur: le premier groupe décrit l'internalisation de la tyrosine-3-¹⁴C et la répartition des activités dans les réservoirs des métabolites; le deuxième groupe décrit l'internalisation de la dopa-3-¹⁴C et la répartition des activités dans les réservoirs des métabolites. L'ordre de présentation des paragraphes suit celui des tableaux.

8.2. Internalisation des précurseurs tyrosine-3-¹⁴C et dopa-3-¹⁴C dans les cultures de cellules.

Cultures: Une suspension cellulaire de *Beta vulgaris* âgée de 3 jours est répartie à parts égales avec du milieu B5 dans 7 Erlenmeyers. Les suspensions sont cultivées durant 3 jours dans les conditions décrites (Exp. chap. 6). Une des suspensions cellulaires est utilisée pour l'analyse de la teneur en acides aminés libres et en bétanine. Les six autres suspensions, contenant approximativement la même charge cellulaire, serviront aux expériences d'incubation avec les précurseurs radioactifs: tyrosine-3-¹⁴C et dopa-3-¹⁴C.

Analyse de la teneur en acides aminés libres de la culture témoin: Une des suspensions cellulaires est filtrée, les cellules sont lavées, pesées (2 g PF) et la biomasse extraite selon la procédure décrite (Exp. chap. 6). L'extrait a une teneur en bétanine de 716 nmol/g PF. Il est concentré à sec au Rotavapor et la teneur en acides aminés libres est déterminée sur un autoanalyseur (Tab. 8.1).

Tableau 8.1. Réservoirs des acides aminés libres exprimés en nmol/g PF

Acide Aminé	[nmol/g PF]	Acide Aminé	[nmol/g PF]
Thrénine	206	Serine	241
Glutamine	487	Acide Glutamique	1861
Citrulline	23	Glycine	66
Alanine	626	Valine	274
Méthionine	9	Isoleucine	114
Leucine	91	Tyrosine	145
Phénylalanine	40	dopa	254
β -Alanine	59	Acide γ -amino-butérique	497
Ornithine	8	Ethanolamine	121
Lysine	34	Histidine	38
Arginine	10	Bétanine	716

Les acides aminés libres d'un des extraits ont été dosés avec un autoanalyseur après dérivatisation post-colonne avec la ninhydrine: Analyse des acides aminés: M. Lavanchy, Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Sektion analytische Chemie, CH-3097 Liebefeld-Bern.

Incubation avec les précurseurs radioactifs tyrosine-3-¹⁴C et dopa-3-¹⁴C: Pour chaque série cinétique avec l'un des précurseurs, on utilise 3 suspensions cellulaires qui sont incubées pendant trois périodes différentes. Au temps 0 min, la solution de précurseur est ajoutée et après 2 min d'agitation, deux prélèvements de 100 μ l sont effectués pour mesure de la radioactivité par scintillation liquide. Au temps final (environ 30, 60 et 180 min), les suspensions cellulaires sont filtrées avec une légère succion sur un Büchner recouvert d'un tamis de 100 μ m (volume du filtrat = volume du milieu) et les cellules retenues sur le filtre sont lavées avec 30 à 40 ml H₂O distillée. Les deux solutions sont réunies, le volume est déterminé et la radioactivité subsistant dans le milieu est comptée par scintillation liquide (Tab. 8.3 et 8.5)

Extraction: Les cellules sont pesées (poids frais = g PF), broyées au Potter Elvjem et extraites à deux reprises avec au total 90 ml HCOOH 0.1 N. L'extrait est centrifugé, le surnageant est collecté, le volume mesuré et la teneur en bétanine quantifiée par spectrophotométrie à 536 nm; deux aliquotes de 100 μ l sont prélevées pour comptage de la radioactivité internalisée. L'extrait est évaporé à sec au Rotavapor, 12 Torr, 35°C. L'extrait sec est ajusté à 2.0 ml dans des jaugés et conservé à -20°C avant d'être chromatographié. Les résultats de l'internalisation des précurseurs sont présentés dans les tableaux récapitulatifs sous tyrosine-3-¹⁴C et dopa-3-¹⁴C.

Débris cellulaires: Le culot de centrifugation contenant les débris cellulaires est séché 48 h sur CaCl₂ dans un dessiccateur sous vide, puis les débris cellulaires séchés sont pesés (poids sec = g PS) et leur radioactivité est mesurée par combustion d'une aliquote (activité

insoluble). Comme le montre le tableau 8.2, les pourcentages en poids sec sont presque identiques, témoignant d'une part de la précision des mesures: écart type $\pm 2\%$ et d'autre part, de la reproductibilité des mesures du poids frais; nous n'avons pas d'information sur la retenue d'eau résiduelle dans les mesures de poids frais.

Tableau 8.2. Rapport poids frais/poids sec et radioactivité mesurée dans les débris cellulaires.

précurseur	tyrosine-3- ¹⁴ C			dopa-3- ¹⁴ C		
	33	66	180	30	65	180
temps d'incubation [min]						
poids frais [g PF]	4.61	5.00	5.45	5.25	5.35	4.13
poids sec [g PS]	0.136	0.144	0.164	0.153	0.174	0.127
poids sec / poids frais [%]	2.95	2.88	3.01	2.91	3.25	3.07
combustion*) [mg]	12.5	8.6	9.0	7.8	27.9	32.0
combustion [10 ⁶ dpm]	1.614	2.367	3.724	0.545	4.084	6.030
radioactivité totale [10 ⁶ dpm]	17.5	39.6	67.8	10.7	25.5	23.9

*) Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich, Mikroanalytische Abt., direction H.Frohofer.

8.3. Séparation et quantification des métabolites.

Les échantillons de 2 ml d'extraits ont été conservés à -20°C. La seule modification apparente a été la formylation du cyclodopa glucoside en formylcyclodopa glucoside due à la présence d'acide formique dans le tampon d'extraction. Ces échantillons de 2 ml ont été chromatographiés à plusieurs reprises selon le développement des méthodes d'analyse. Nous les présenterons dans les paragraphes suivants sous l'appellation « méthode (a), (b), (c), (d) ». Les résultats des analyses sont compilés dans les tableaux récapitulatifs sous tyrosine-3-¹⁴C et dopa-3-¹⁴C (Tab. 8.4 et 8.6).

Méthode (a) dynamique et statique: les premières mesures, faites immédiatement après l'expérience, n'ont fourni qu'une information partielle sur le pourcentage de radioactivité incorporée dans CDG et bétanine, ainsi que sur la taille des réservoirs de ces deux métabolites. La phase mobile A, constituée de tampon phosphate de sodium à pH 2.5 ne permettait pas la séparation de tous les métabolites, les seuls mesurables étant CDG et dopa. L'utilisation d'un détecteur à scintillation en flux continu (*FloOne*) équipé d'une cellule à scintillateur solide offrait l'avantage de permettre de compter et d'isoler CDG et bétanine à la sortie de la cellule de mesure. Les concentrations sont déterminées par spectrophotométrie à 283 nm pour le CDG, à 536 nm pour la bétanine. La radioactivité des produits purifiés est

mesurée en dpm par scintillation liquide (*Packard Tricarb*). La bétanine est concentrée à sec et purifiée ultérieurement par électrophorèse sur papier.

Conditions expérimentales - méthode (a) dynamique: HPLC (*Waters*) sur colonne *Lichrosorb RP-18*, 5 μm , 0.45 cm \varnothing x 30 cm; Phases mobiles: A = NaH_2PO_4 0.01M pH 2.5, B = $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, 8:2, v/v. Injection 100 μl , débit 1.5 ml/min, 16 min isocratique 100% A, 60 min gradient convexe no 7 \Rightarrow 20% B, 17 min isocratique 20% B, 1 min \Rightarrow 80% B, 26 min isocratique 80%B. Détection UV 280 nm (*Cecil 2012*), enregistrement du tracé UV sur papier sans intégration. Détection cpm avec cellule solide en continu sur *FloOne HP*. Les mesures sont effectuées en duplicat ou en triplicat. Les fractions contenant le cyclodopa glucoside (t_R 8 min) et la bétanine (t_R 59 min) sont collectées comme décrit ci-après.

- méthode (a) statique: Purification du cyclodopa glucoside (CDG): le CDG est collecté à la sortie du système HPLC décrit sous 'Méthode (a) dynamique', temps de rétention 8 min, et il est quantifié par mesure de l'absorbance à 283 nm et comptage de la radioactivité de deux aliquotes de 100 μl par scintillation liquide; à partir de ces mesures, sont calculés le réservoir et la radioactivité spécifique. Purification de la bétanine: la bétanine est collectée à la sortie du système HPLC, temps de rétention 59 min, et quantifiée par mesure d'absorbance à 536 nm; le réservoir est calculé.

Quantification de l'incorporation relative et de l'activité spécifique de la bétanine pure:

Electrophorèse sur papier: La fraction contenant la bétanine obtenue par HPLC (voir ci-dessus) est concentrée à sec au Rotavapor, solubilisée dans un minimum de tampon pyridine 0.05 M - formiate à pH 4.5 et déposée sous forme d'une ligne sur une bande de papier Whatman no 3 de 300 mm x 60 mm, à 160 mm de l'extrémité. Les extrémités du papier sont humidifiées avec du tampon de telle manière que les deux fronts de liquide touchent la ligne de bétanine au même moment, évitant ainsi l'élargissement de la zone de bétanine. La bande de papier est déposée sur ses supports, avec chacune de ses extrémités baignant dans un bac contenant le tampon pyridine-formiate précédemment décrit. Une tension de 500 Volts est appliquée durant 3 heures. La bande contenant la bétanine est découpée, solubilisée dans de l'eau; la bétanine est quantifiée par spectrophotométrie à 536 nm et la radioactivité déterminée sur deux aliquotes de 100 μl ; la radioactivité spécifique est calculée. Un échantillon de bétanine purifié par électrophorèse est concentré, puis purifié une seconde fois selon le même principe afin de vérifier la constance de la radioactivité spécifique. La collection des fractions, les mesures spectrophotométriques et radioactives sont effectuées en duplicat ou en triplicat.

Purification de la bétanine par chromatographie échangeuse d'ions et HPLC analytique: 1 ml de l'extrait cellulaire concentré est déposé sur une colonne échangeuse d'ions (9 mm Ø x 150 mm, Sephadex SP-C-25 forme protonée); un débit d'environ 1 ml/min d'une phase mobile aqueuse d'acide formique 0.1 N est appliqué; la bétanine (12 ml) sort après le passage de 20 ml de phase mobile. La bétanine est concentrée à sec et solubilisée dans 100 µl de NaH₂PO₄ 0.05 M pH 4.5, puis purifiée par HPLC dans les conditions suivantes: pompe HPLC *Spectra-Physics* à gradient ternaire, colonne *Lichrosorb* RP-18, 5 µm, 0.45 cm Ø x 50 cm; Phases mobiles: A = HCOOH 0.1 N, B = CH₃OH. Injection 100 µl, débit 1.0 ml/min, 8 min isocratique 100% A, gradient linéaire 12 min ⇒ 80% A / 20% B, 20 min gradient linéaire ⇒ 50% A / 50% B; quantification par UV 280 nm (Cecil 2012). La fraction de bétanine élue à 16 min. Le volume de la fraction HPLC est déterminé, la bétanine quantifiée par spectrophotométrie à 536 nm et la radioactivité de deux aliquotes de 50 µl déterminée par comptage en scintillation liquide. La radioactivité spécifique est calculée. Le contrôle de la pureté de la bétanine est effectuée par radiochromatographie. Deux aliquotes de 100 µl de la solution de bétanine purifiée par HPLC analytique sont radiochromatographiés comme suit: pompe HPLC *Spectra-Physics* à gradient ternaire, colonne *Lichrosorb* RP-18, 5 µm, 0.45 cm Ø x 50 cm; Phases mobiles: A = HCOOH 0.1 N, B = CH₃OH. Injection 100 µl, débit 1.0 ml/min, gradient linéaire 10 min 100% A ⇒ 90% A / 10% B, gradient linéaire 20 min ⇒ 80% A / 20% B, 10 min gradient linéaire ⇒ 50% A / 50% B; quantification par UV 280 nm (Cecil 2012); mesure de la radioactivité en continu par FloOne avec cellule liquide de 0.5 ml, débit de liquide scintillant 4.5 ml/min (Floscint II), efficacité de comptage 57 %, La radioactivité spécifique de la bétanine mesurée en flux continu est présentée dans les tableaux récapitulatifs.

Clivage de la bétanine par la réaction d'échange de base: Un volume connu de la solution de bétanine pure obtenue comme décrit dans le paragraphe précédent est évaporé à sec dans un ballon; on ajoute 1 mg de proline dans le ballon contenant la bétanine et de l'autre côté d'un pont pour la distillation adiabatique sous vide, dans un deuxième ballon, on ajoute 5 ml de NH₄OH 1 N. Après dégazage, deux fois, cette solution est distillée adiabatiquement dans le ballon contenant la bétanine. Après 60' de réaction à température ambiante, la solution de NH₄OH est distillée adiabatiquement dans l'autre ballon. Après évaporation complète de la solution, le système est mis sous atmosphère d'Argon et le mélange réactionnel sec est acidifié avec 2.0 ml de HCOOH 0.1 N. Quatre aliquotes de 100 µl sont prélevées pour l'analyse du cyclodopa glucoside, de l'indicaxanthine et de la bétanine résiduelle: les deux premiers sont

utilisés pour la mesure des absorbances à 283, 480 et 536 nm ainsi que pour la mesure de la radioactivité statique. Les deux autres aliquotes sont radiochromatographiées comme décrit ci-dessus. La radioactivité spécifique des produits issus de l'hydrolyse de la bétanine sont calculés à partir des surfaces UV 280 nm et des cpm mesurés par scintillation liquide en continu (rendement du comptage en ^{14}C = 57%). Les résultats sont présentés dans les tableaux récapitulatifs.

Méthode (b) et (c): à pH 4.5, une meilleure séparation est réalisée en combinant le tampon phosphate, l'acétonitrile et le méthanol. La dopamine, métabolite majoritaire, traîne lors des séparations sur un support en phase inverse de telle sorte que sa quantification a osé des problèmes; sa position dans le chromatogramme est fortement influencée par les conditions de chromatographie. L'effet de traînée est diminué par la présence du solvant organique (CH_3CN) qui déplace ce métabolite dans une zone ne contenant pas d'autres métabolites. La bétanine est éluée seulement en présence de solvants organiques. Les séries (b) et (c) auxquelles se réfère ce paragraphe ne se distinguent que de peu. La série de mesure (b) étant incomplète, une deuxième série (c) s'est avérée nécessaire, avec comme amélioration un changement de gradient et un nouveau détecteur à scintillation en continu.

Conditions expérimentales: - méthode (b): HPLC (*Spectra-Physics*) sur Lichrosorb RP-18, 5 μm , 0.45 cm \varnothing x 50 cm; Phases mobiles: A = NaH_2PO_4 0.05M pH 4.5, B = CH_3CN , C = $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, 8:2, v/v. Injection 20 μl , débit 1.0 ml/min, 8 min isocratique 100% A, gradient linéaire 22 min \Rightarrow 90% A / 10% B, 30 min \Rightarrow 40% A / 30% B / 30% C, 10 min \Rightarrow 100% C, 5 min 100% C; quantifications: par UV 280 nm sur *Cecil 2012*, radioactivité en continu (cpm) sur *FloOne ES* avec cellule liquide de 2.5 ml, débit de mélange scintillant FloScint II 5.0 ml/min. L'incorporation relative dans les métabolites est présentée dans les tableaux récapitulatifs. - Méthode c: HPLC (*Spectra-Physics*) sur Lichrosorb RP-18, 5 μm , 0.45 cm \varnothing x 50 cm; Phases mobiles: A = NaH_2PO_4 0.05M pH 4.5, B = CH_3CN , C = $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, 8:2, v/v. Injection 10 μl , débit 1.0 ml/min, 25 min isocratique 100% A, gradient linéaire 20 min \Rightarrow 90% A / 10% B, 15 min isocratique 90% A / 10% B, 20 min \Rightarrow 85% A / 15% B, 20 min \Rightarrow 100% C; quantifications: UV 280 nm sur *Cecil 2012*, radioactivité en continu (cpm) sur *FloOne HP* avec cellule liquide de 0.5 ml, débit de mélange scintillant FloScint II 5.0 ml/min. L'incorporation relative dans les métabolites, leurs radioactivités spécifiques et les réservoirs sont présentés dans les tableaux récapitulatifs.

Méthode (d): L'analyse des mêmes extraits est répétée avec un équipement offrant une séparation optimale de tous les métabolites; le support chromatographique, à particules sphériques possédant une couverture maximale de chaînes C₁₈, s'est avéré beaucoup moins polaire et plus sélectif. La quantification des métabolites en mesure UV-Vis et en scintillation liquide est perfectionnées par intégration au moyen d'un programme (Exp.1.3.), ce qui assure des valeurs précises. Les échantillons ont été conservés congelés à -20°C, dans ces conditions, la seule modification remarquée dans le contenu des extraits est la transformation lente du cyclodopa glucoside (CDG) en N-formylcyclodopa glucoside (FCDG).

Conditions expérimentales - méthode (d): HPLC (*Spectra-Physics*) sur Spherisorb ODS2, 5 µm, 0.45 cm Ø x 30 cm; Phases mobiles: A = NaH₂PO₄ 0.05M pH 4.5, B = CH₃CN, C = CH₃OH:H₂O, 8:2, v/v. Injection 70 µl (50 µl tyrosine-3-¹⁴C 33 min), débit 1.0 ml/min, 12 min isocratique 100% A, gradient linéaire 20 min ⇒ 90% A / 10% B, 28 min ⇒ 40% A / 30% B / 30% C, 10 min isocratique 40% A / 30% B / 30% C; quantification: UV-Vis multilongueur d'onde à 230, 280, 310, 480, 536 nm détecteur *Hewlett-Packard HP-8450-UV-Vis* à barrette de diodes, quantification de la radioactivité en continu (cpm) sur *FloOne HP* avec cellule liquide de 0.5 ml, débit de mélange scintillant FloScint II 5.0 ml/min. Enregistrement et traitement numérique des valeurs spectrophotométriques en mAU x sec et de la radioactivité en dpm sur ordinateur *Hewlett-Packard HP9816* (Exp. chap. 1.3). L'incorporation relative dans les métabolites, leurs radioactivités spécifiques et les réservoirs sont présentés dans les récapitulatifs.

Tableau 8.3. Internalisation de la tyrosine-3-¹⁴C dans les cultures de cellules

Incubation						
Précurseur:	tyrosine-3- ¹⁴ C					
Radioactivité spécifique:	1.044 x 10 ¹⁴ dpm/mol					
Conditions initiales:	solution stock 2.61 mg (0.0144 mmol) tyrosine-3- ¹⁴ C dans 45 ml de milieu conditionné					
Durée de l'incubation:	33 min		66 min		180 min	
Solution stock ajoutée [ml]	15.0		15.0		14.8	
Précurseur ajouté [nmol]	4800		4800		4740	
Poids frais [g PF]	4.61		5.00		5.45	
Poids sec [g P.S.]	0.136		0.144		0.164	
Volume du milieu (filtrat) [ml]	102.5		89.0		84.0	
Internalisation (a)	10 ⁶ dpm	nmol	10 ⁶ dpm	nmol	10 ⁶ dpm	nmol
	par ml	par ml	par ml	par ml	par ml	par ml
2 min	5.091	48.77	5.887	56.39	6.078	58.22
33 min (b)	3.737	35.80				
66 min (b)			3.207	30.72		
180 min (b)					1.784	17.09
Différence d'activité	1.354	12.97	2.680	25.67	4.294	41.13
Total internalisé	10 ⁶ dpm	nmol	10 ⁶ dpm	nmol	10 ⁶ dpm	nmol
	138.8	1329	238.5	2285	360.7	3455
Extraction						
Volume de l'extrait [ml]	93.05	(c)	83.10	(c)	88.35	(c)
Activité soluble [10 ⁶ dpm]	117.16	(84.4%)	188.85	(79.1%)	275.3	(76.3%)
Débris cellulaires [10 ⁶ dpm]	17.5	(12.6%)	39.6	(16.6%)	67.8	(18.8%)
Bétanine totale [nmol]	3319		3656		3608	
Bétanine [nmol/g PF]	720		731		662	
HPLC						
Volume [ml]	2.00		2.00		2.00	
Activité totale [dpm x 10 ⁶]	109.96		174.46		264.79	
Bétanine	3020		3347		3447	
dpm HPLC / dpm extrait [%]	93.9		92.4		96.2	
bétanine HPLC / extrait [%]	91.0		91.5		95.5	

(a) activités et concentrations des précurseurs dans le milieu au cours du temps: moyenne de deux mesures ±1%

(b) les valeurs finales de radioactivité internalisée sont mesurées sur filtrat et eaux de lavage réunis

(c) en % de l'activité totale internalisée pendant le temps d'incubation.

Tableau 8.4. Tyrosine-3-¹⁴C: répartition des activités relatives et spécifiques dans les réservoirs de métabolites

précurseur tyrosine-3- ¹⁴ C	incorporation relative (% de radioactivité totale)						radioactivité spécifique (dpm*10 ¹² /mol)				réservoir (nmol/g)						
	incubation 33 min		a stat		a dyn		b		c		d		moy. ± éc.type				
tyrosine	21.9	± 2.5					24.75	20.72	20.25	33.7	± 2.2			32.16	35.27	142	± 20
tyramine	10.4	± 2.8					---	12.34	8.36	---	± ---			---	---	---	± ---
dopa	9.6	± 0.7					10.44	9.39	9.02	23.0	± 1.4			24.02	22.04	92	± 2
dopamine	44.9	± 6.5					48.95	48.42	37.39	0.88	± 0.02			0.89	0.86	11533	± 2227
cyclodopa glucoside	3.3	± 0.1	3.25	3.38			3.08	1.75	---	1.21	± 0.03	1.21		1.06	---	628	± 9
formylcyclodopa glucoside							1.04	2.54	3.35					2.83	1.98		
bétanine	2.3	± 0.0	2.32				1.23	2.9	2.32	1.47	± 0.02	1.48		---	1.41	368	± 2
bétanine-partie CDG	15	± 1								0.17							
bétanine-partie ac.bétalamique	85	± 3								0.98							
bétanine	100									1.12							
incubation 66 min																	
tyrosine	14.4	± 1.3					15.17	15.12	12.86	57.7	± 23.3			41.21	74.18	97	± 43
tyramine	8.6	± 2.1					---	10.06	7.16	---	± ---			---	---	---	± ---
dopa	5.8	± 0.5					5.26	6.16	5.89	32.9	± 1.6			34.05	31.82	67	± 7
dopamine	55.9	± 10.0					64.29	58.56	44.81	1.68	± 0.09			1.61	1.74	11302	± 1850
cyclodopa glucoside	3.0	± 0.1	2.97	3.12			1.45	1.78	---	2.15	± 0.01	2.15		2.16	---	482	± 11
formylcyclodopa glucoside							0.73	2.02	1.86					4.57	2.64		
bétanine	2.1	± 0.0	2.1				3.44	3.22	2.42	2.20	± 0.03	2.2		---	3.23	333	± 3
bétanine-partie CDG	24	± 4								0.37							
bétanine-partie ac.bétalamique	76	± 2								1.20							
bétanine	100									1.58							
incubation 180 min																	
tyrosine	2.3	± 0.3					2.5		2.13	23.4	± ---			23.44		44	± ---
tyramine	6.3	± ---					---		6.25	---	± ---			---		---	± ---
dopa	3.0	± 0.4					3.27		2.66	23.1	± ---			23.13		55	± ---
dopamine	60.9	± 10.1					68.04		53.71	3.1	± ---			3.08		8347	± ---
cyclodopa glucoside	3.6	± 0.0	3.62	3.74			3.45		---	4.1	± 0.1	4.08		---		432	± 18
formylcyclodopa glucoside							1.28		2.32					5.64			
bétanine	5.1	± 0.3	5.14				6.08		4.35	5.7	± 0.9	5.7		7.7		437	± 28
bétanine-partie CDG	19	± 5								0.87							
bétanine-partie ac.bétalamique	81	± 3								3.72							
bétanine	100									4.50							

Tableau 8.5. Internalisation de la dopa-3-¹⁴C dans les cultures de cellules

Incubation							
Précurseur:	dopa-3- ¹⁴ C						
Radioactivité spécifique:	1.065 x 10 ¹⁴ dpm/mol						
Conditions initiales:	solution stock 2.65 mg (0.01344 mmol) dopa-3- ¹⁴ C dans 45 ml de milieu conditionné						
Durée de l'incubation:	30 min		65 min		180 min		
Solution stock ajoutée [ml]	15.0		15.0		14.8		
Précurseur ajouté [nmol]	4530		4530		4320		
Poids frais [g PF]	5.25		5.35		4.13		
Poids sec [g P.S.]	0.153		0.174		0.127		
Volume du milieu (filtrat) [ml]	99.5		108.0		102.0		
Internalisation (a)	10 ⁶ dpm	nmol	10 ⁶ dpm	nmol	10 ⁶ dpm	nmol	
	par ml	par ml	par ml	par ml	par ml	par ml	
2 min	4.931	46.30	4.794	45.02	4.799	45.07	
30 min (b)	3.892	36.55					
65 min (b)			3.146	29.54			
180 min (b)					1.780	16.71	
Différence d'activité	1.039	9.75	1.648	15.48	3.019	28.36	
	10 ⁶ dpm	nmol	10 ⁶ dpm	nmol	10 ⁶ dpm	nmol	
Total internalisé	103.4	970	178.0	1672	307.9	2893	
Extraction							
Volume de l'extrait [ml]	94.4	(c)	87.8	(c)	150.2	(c)	
Activité soluble [10 ⁶ dpm]	74.46	(72.0%)	152.06	(85.4%)	261.46	(84.9%)	
Débris cellulaires [10 ⁶ dpm]	10.7	(10.3%)	25.5	(14.3%)	23.9	(7.7%)	
Bétanine totale [nmol]	3273		3351		2904		
Bétanine [nmol/g PF]	623		626		703		
HPLC							
Volume [ml]	2.00		2.00		2.00		
Activité totale [dpm x 10 ⁶]	69.62		145.79		259.61		
Bétanine	3030		3207		2850		
dpm HPLC / dpm extrait [%]	93.5		95.9		99.3		
bétanine HPLC / extrait [%]	92.6		95.9		98.1		

(a) activités et concentrations des précurseurs dans le milieu au cours du temps: moyenne de deux mesures $\pm 1\%$

(b) les valeurs finales de radioactivité internalisée sont mesurées sur filtrat et eaux de lavage réunis

(c) en % de l'activité totale internalisée pendant le temps d'incubation.

Tableau 8.6. dopa-3-¹⁴C: répartition des activités relatives et spécifiques dans les réservoirs de métabolites

précurseur dopa-3- ¹⁴ C	incorporation relative (% de radioactivité totale)						radioactivité spécifique (dpm*10 ¹² /mol)				réservoir (nmol/g)		
	incubation 30 min		a stat	a dyn	b	c	d	moy. ± éc.type		a		c	d
tyrosine	0.0 ± 0.0				---	0		0 ± 0			0		152 ± ---
tyramine	0.0 ± 0.0				---	0		0 ± 0			0		--- ± ---
dopa	11.6 ± 1.0				10.93	12.35		21.1 ± 0			21.1		90 ± ---
dopamine	79.6 ± 4.6				82.78	76.33		1.36 ± 0			1.36		8610 ± ---
cyclodopa glucoside	1.9 ± 0.1		1.85	2.12	---	---		0.53 ± 0.01		0.53	---		468 ± 46
formylcyclodopa glucoside					---	2.72					1.76		
bétanine	3.7 ± 0.4		3.7		0.73	4.23		1.24 ± 0.14		1.25	---		394 ± 1
bétanine-partie CDG	10 ± 3							0.09					
bétanine-partie ac.bétalamique	90 ± 5							0.80					
bétanine	100							0.94					
incubation 65 min													
tyrosine	0.0 ± 0.0				---	0	0	0 ±			0	0	116 ± ---
tyramine	0.0 ± 0.0				---	0	0	0 ±			0	0	--- ± ---
dopa	9.1 ± 1.2				9.65	9.94	7.68	33.5 ± 9.9			40.48	26.42	84 ± 19
dopamine	71.9 ± 9.6				80.22	74.01	61.39	1.8 ± 0.2			1.66	1.99	11537 ± 1715
cyclodopa glucoside	1.8 ± 0.1		1.8	1.82	1.07	---	---	1.62 ± 0.20		1.49	---	---	307 ± 35
formylcyclodopa glucoside					0.3	1.65	1.14				3.26	1.88	
bétanine	2.5 ± 0.1		2.46		3	3.62	1.97	1.59 ± 0.08		1.59	---	2.29	423 ± 4
bétanine-partie CDG	16 ± 5							0.20					
bétanine-partie ac.bétalamique	84 ± 1							1.06					
bétanine	100							1.25					
incubation 180 min													
tyrosine	0.0 ± 0.0				---	0		0 ± 0			0		--- ± ---
tyramine	0.0 ± 0.0				---	0		0 ± 0			0		--- ± ---
dopa	4.6 ± 0.4				4.85	4.3		21.6 ± 0			21.64		158 ± ---
dopamine	78.6 ± 13.3				87.99	69.18		4.0 ± 0			4.04		13659 ± ---
cyclodopa glucoside	2.5 ± 0.1		2.52	2.66	1.57	---	---	2.53 ± 0.04		2.53	---		630 ± 8
formylcyclodopa glucoside					0.43	2.6					5.21		
bétanine	4.2 ± 0.2		4.24		2.73	3.17		4.91 ± 0.19		4.9	7		554 ± 14
bétanine-partie CDG	18 ± 4							0.61					
bétanine-partie ac.bétalamique	82 ± 4							2.88					
bétanine	100							3.64					

9. Incorporation simultanée de la tyrosine et de la dopa à marquage différencié.

9.1. Internalisation de la tyrosine-3'-³H,5'-³H et dopa-3-¹⁴C dans les cultures de cellules.

Cultures: Deux suspensions de *Beta vulgaris* âgées de 3 jours sont cultivées dans les conditions décrites sous Exp. chap. 6 et placées sur un agitateur à plateau rotatif tournant à 135 rpm.

Précurseurs radioactifs:

tyrosine-3'-³H,5'-³H à 19.23 nmol/ml dans H₂O, As = 1.1544 x 10¹⁷ dpm/mol

dopa-3-¹⁴C à 191.7 nmol/ml dans du milieu B5, As = 1.142 x 10¹⁴ dpm/mol

Incubation avec les précurseurs radioactifs: Au temps 0 min, 200 µl d'une solution de tyrosine-³H (3.846 nmol, 444 x 10⁶ dpm), ainsi que 7.0 ml d'une solution de dopa-3-¹⁴C (1342 nmol, 153.2 x 10⁶ dpm) sont ajoutés à chaque culture. Des prélèvements de 20 µl en duplicat sont effectués de la première culture après 3 et 33 min et dans la deuxième culture après 3, 33 et 60 min. Après le dernier prélèvement, respectivement après 33 et 60 min d'incubation, les deux suspensions cellulaires sont filtrées avec une légère succion sur un Büchner recouvert d'un tamis de Nylon® (volume de filtrat = volume de milieu) et les cellules retenues sur le filtre sont soigneusement lavées avec 30 ml de milieu B5 non radioactif. Les volumes et la radioactivité subsistant dans les filtrats et solutions de lavage réunis sont déterminés.

Extraction: Les cellules sont pesées (g PF), broyées au Potter Elvjem et extraites à deux reprises avec HCOOH 0.1N. L'extrait est centrifugé, le surnageant collecté, le volume est mesuré et la teneur en bétanine déterminée par spectrophotométrie; deux aliquotes de 100 µl sont prélevées pour comptage de la radioactivité internalisée. Les extraits sont évaporés à sec au Rotavapor, 12 Torr, 35°C et les résidus solubilisés dans un minimum de tampon 0.05M NaH₂PO₄ pH 4.5 et le volume du concentré ajusté à 1.31 g par pesée. Du concentré on prélève des aliquotes de 0.02 ml pour les analyses par HPLC; le reste du concentré est conservé à -20°, servant à des analyses répétées suivant le développement de la technique de mesure.

9.2. Séparation et quantification des métabolites.

Les échantillons d'extraits conservés congelés sont analysés par HPLC méthodes (b) et (c) dans les conditions décrites sous Exp. chap. 3.4 avec une modification du réglage des fenêtres d'énergie décrit sous Exp. chap. 3.1 permettant la détection en continu de la radioactivité simultanément pour le ^3H et le ^{14}C . Dans une première série d'analyse, 20 μl de l'extrait concentré est analysé par HPLC, méthode (b), on quantifie les pics de chaque métabolite séparé simultanément par UV (intégration des surfaces à 280 nm et calibration à l'aide de standards, pour le calcul des réservoirs) et on détermine la radioactivité ^3H et ^{14}C en continu; à partir de ces données, la radioactivité spécifique des métabolites est calculée. La méthode (c) modifiée a servi également pour identifier les métabolites principaux tyramine et dopamine; ces deux métabolites ont été identifiés par cochromatographie et par spectrométrie de masse des pics isolés (Exp. chap. 7). Les incorporations relatives, les radioactivités spécifiques et la taille des réservoirs sont présentés dans les tableaux récapitulatifs (Tab. 9.1) et individuels (Tab. 9.2-9.4).

Tableau 9.1. Incorporation simultanée de la tyrosine et de la dopa à marquage différencié

Précurseurs:										
tyrosine-3-³H,5'-³H	(115.44*10 ¹⁵ dpm/mol)			solution ajoutée: 0.2 ml, 0.01923*10 ⁻³ M, 444.0*10 ⁶ dpm						
dopa-3-¹⁴C	(0.1142*10 ¹⁵ dpm/mol)			solution ajoutée: 7.0 ml, 0.1917 *10 ⁻³ M, 153.2*10 ⁶ dpm						
Essais:										
Durée	30 min						60 min			
masse cellulaire:	1.05 g PF						1.55 g PF			
volume nutritif	123 ml						94 ml			
Radioactivités dans le milieu nutritif (A _t en 10 ⁶ dpm/ml):										
temps d'incubation:	tyrosine- ³ H			dopa-3- ¹⁴ C			tyrosine- ³ H		dopa-3- ¹⁴ C	
	A _t	A _{t0} -A _t		A _t	A _{t0} -A _t		A _t	A _{t0} -A _t	A _t	A _{t0} -A _t
t = 0 min (calculé)	(4.260)	0		(1.287)	0		(5.448)	0	(1.643)	0
t = 3 min	4.167	0.093		1.280	0.007		5.306	0.142	1.600	0.043
t = 33 min	3.241	1.019		1.208	0.079		3.560	1.888	1.449	0.194
t = 60 min	-	-		-	-		2.139	3.309	1.184	0.459
Extraits:										
bétanine tot. extraite	941*10 ⁻⁹ mol						1597*10 ⁻⁹ mol			
aliquote / concentré	0.02 ml / 1.31 ml						0.02 ml / 1.31 ml			
radioactivité / 0.02ml	³ H: 597863 dpm			¹⁴ C: 140870 dpm			³ H: 1671756 dpm		¹⁴ C: 572931 dpm	
Analyse de l'extrait par HPLC:										
répartition des radioactivités dans les métabolites de l'aliquote séparée par HPLC (cpm):										
métabolite	mes1 H	mes2 H	mes3 H	mes1 C	mes2 C	mes3 C	mes1	mes2	mes1	mes2
	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	(H) 60 min	(H) 60 min	(C) 60 min	(C) 60 min
Tyrosine	54113	48197	34861	86	0	0	107397	90225	1635	0
Tyramine	66281	53864	43115	85	0	0	151299	111706	989	0
Dopa	7335	8345	5119	3782	2724	2571	34604	26221	24547	21045
Dopamine	248541	225232	182515	152932	146259	123615	425834	362920	594063	535224
Cyclodopa glucoside	9224	7105	8695	946	501	467	33579	30675	6677	4440
Bétanine	7623	8570	5778	3108	3452	2501	21686	21569	12834	13579
Floone total (=100%)	407576	369828	298013	161942	160033	132259	669926	776770	587932	647261
o)										
répartition centésimale des radioactivités dans les métabolites séparés par HPLC:										
métabolite	mes1 H	mes2 H	mes3 H	mes1 C	mes2 C	mes3 C	mes1	mes2	mes1	mes2
	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	(H) 60 min	(H) 60 min	(C) 60 min	(C) 60 min
Tyrosine	13.28	13.03	11.7	0.05	0	0	13.83	13.46	0.25	0
Tyramine	16.26	14.56	14.47	0.05	0	0	19.48	16.67	0.15	0
Dopa	1.80	2.26	1.72	2.34	1.70	1.94	4.45	3.90	3.79	3.58
Dopamine	60.98	60.9	61.24	94.44	91.39	93.46	54.82	54.17	91.78	91.04
Cyclodopa glucoside	2.26	1.92	2.92	0.58	0.32	0.36	4.32	4.57	1.03	0.75
Bétanine	1.87	2.32	1.94	1.92	2.16	1.89	2.79	3.22	1.98	2.31
Activités spécifiques:										
	nm	³ H-As*10 ⁻¹²	¹⁴ C-As*10 ⁻¹²	³ H-As/ ¹⁴ C-As	nm	³ H-As*10 ⁻¹²	¹⁴ C-As*10 ⁻¹²	³ H-As/ ¹⁴ C-As		
	30 min	dpm/mol 30min	dpm/mol 30min		60min	dpm/mol 60min	dpm/mol 60min			
Tyrosine	3.4	23.35	0.002	-	9	25.67	0.01	-		
Tyramine	-	-	-	-	-	-	-	-		
Dopa	1	10.76	3.3	3.26	3.2	23.25	6.78	3.43		
Dopamine	324.4	1.12	0.41	2.73	516.6	1.77	1.02	1.73		
Cyclodopa glucoside	4.8	2.81	0.17	16.53	9.7	7.44	0.61	12.2		
Bétanine	13.3	0.84	0.20	4.2	23.5	1.98	0.48	4.12		

Tableau 9.2 Incorporations relatives et spécifiques dans les réservoirs des métabolites

	précurseur tyrosine- ³ H		précurseur dopa-3- ¹⁴ C		réservoir
	incorporation relative	radioactivité spécifique	incorporation relative	radioactivité spécifique	
incubation 33 min	% de radioactivité totale	dpm*10¹²/mol	% de radioactivité totale	dpm*10¹²/mol	nmol/g PF
tyrosine	13.28	23.51	0.05	0.02	211
tyramine	16.26	---	0.05	---	---
dopa	1.8	10.66	2.34	3.26	63
dopamine	60.98	1.12	94.44	0.41	20236
cyclodopa glucoside	2.26	2.84	0.58	0.17	297
bétanine	1.87	0.84	1.92	0.2	833
total	96.45		99.38		

incubation 66 min	% de radioactivité totale	dpm*10¹²/mol	% de radioactivité totale	dpm*10¹²/mol	nmol/g PF
tyrosine	13.83	25.73	0.25	0.16	379
tyramine	19.48	---	0.15	---	---
dopa	4.45	23.28	3.79	6.8	135
dopamine	54.82	1.77	91.78	1.02	21830
cyclodopa glucoside	4.32	7.46	1.03	0.61	409
bétanine	2.79	1.99	1.98	0.48	992
total	99.69		98.99		

Tableau 9.3. Méthode b, Incorporations relatives et spécifiques dans les réservoirs des métabolites

Expérience double marquage méthode (b)	précurseur tyrosine-³H, incubation 33 min mesures ³H					précurseur dopa-3-¹⁴C, incubation 33 min mesures ¹⁴C					
volume injecté µl	20					20					
total injecté dpm	597863					140870					
total mesuré FloOne cpm	407576 = 100 %					161942 = 100 %					
rendement FloOne en %	68.2					115.0					
	mesuré	calculé	mesuré	calculé	calculé	mesuré	calculé	mesuré	calculé	calculé	calculé
métabolites	cpm	% FloOne	area int.	nmol	As*10E12 dpm/mol	cpm	% FloOne	area int.	nmol	As*10E12 dpm/mol	réservoir en nmol/g PF
tyrosine	54113	13.28	11814	3.4	23.51	86	0.05	11814	3.4	0.02	211
tyramine	66281	16.26	---	---	---	85	0.05	---	---	---	---
dopa	7335	1.80	9285	1.0	10.66	3782	2.34	9285	1.0	3.26	63
dopamine	248541	60.98	2887080	324.4	1.12	152932	94.44	2887080	324.4	0.41	20236
CDG	9224	2.26	46687	4.8	2.84	946	0.58	46687	4.8	0.17	297
bétanine	7623	1.87	447107	13.3	0.84	3108	1.92	447107	13.3	0.20	833
total des métabolites listés	393117	96.45				160939	99.38				
	précurseur tyrosine-³H, incubation 66 min mesures ³H					précurseur dopa-3-¹⁴C, incubation 66 min mesures ¹⁴C					
volume injecté µl	20					20					
total injecté dpm	1671756					572931					
total mesuré FloOne cpm	776770 = 100 %					647261 = 100 %					
rendement FloOne en %	46.5					113.0					
	mesuré	calculé	mesuré	calculé	calculé	mesuré	calculé	mesuré	calculé	calculé	calculé
métabolites	cpm	% FloOne	area int.	nmol	As*10E12 dpm/mol	cpm	% FloOne	area int.	nmol	As*10E12 dpm/mol	réservoir en nmol/g PF
tyrosine	107397	13.83	31412	9.0	25.73	1635	0.25	31412	9.0	0.16	379
tyramine	151299	19.48	---	---	---	989	0.15	---	---	---	---
dopa	34604	4.45	29408	3.2	23.28	24547	3.79	29408	3.2	6.80	135
dopamine	425834	54.82	4597706	516.6	1.77	594063	91.78	4597706	516.6	1.02	21830
CDG	33579	4.32	94922	9.7	7.46	6677	1.03	94922	9.7	0.61	409
bétanine	21686	2.79	786734	23.5	1.99	12834	1.98	786734	23.5	0.48	992
total des métabolites listés	774399	99.69				640745	98.99				
<i>aires normalisées (area/nmol)</i>	<i>tyrosine</i>	<i>3500</i>	<i>dopa</i>	<i>9200</i>	<i>dopamine</i>	<i>8900</i>	<i>CDG</i>	<i>9800</i>	<i>bétanine</i>	<i>33500</i>	

Tableau 9.4. Méthode c, Incorporations relatives et spécifiques dans les réservoirs des métabolites

Expérience double marquage, méthode (c)		précurseur tyrosine- ³ H + dopa-3- ¹⁴ C			
		1) ajout de tyramine, essai incubation 33 min			
		mesures de ³ H		mesures de ¹⁴ C	
volume injecté µl	20			20	
total injecté dpm	597863			140870	
total mesuré FloOne cpm	369828	= 100 %		160033	= 100 %
rendement FloOne en %	61.9			113.6	
métabolites	mesuré cpm	calculé % FloOne		mesuré cpm	calculé % FloOne
tyrosine	48197	13.03		0	0.00
tyramine	53864	---		0	---
dopa	8345	2.26		2724	1.70
dopamine	225232	60.90		146259	91.39
CDG	3706	1.00		266	0.17
FCDG	3399	0.92		235	0.15
bétanine	8570	2.32		3452	2.16
total des métabolites listés	351313	94.99		152936	95.57
		2) ajout de dopamine, essai incubation 33 min			
		mesures de ³ H		mesures de ¹⁴ C	
volume injecté µl	20			20	
total injecté dpm	597863			140870	
total mesuré FloOne cpm	298013	= 100 %		132259	= 100 %
rendement FloOne en %	49.8			93.9	
métabolites	mesuré cpm	calculé % FloOne		mesuré cpm	calculé % FloOne
tyrosine	34861	9.43		0	0.00
tyramine	43115	---		0	---
dopa	5119	1.38		2571	1.61
dopamine	182515	49.35		123615	77.24
CDG	5069	1.37		192	0.12
FCDG	3626	0.98		275	0.17
bétanine	5778	1.56		2501	1.56
total des métabolites listés	280083	93.98		129154	97.65
		3) ajout de dopamine, essai incubation 66 min			
		mesures de ³ H		mesures de ¹⁴ C	
volume injecté µl	20			20	
total injecté dpm	1671756			572931	
total mesuré FloOne cpm	669926	= 100 %		587932	= 100 %
rendement FloOne en %	40.1			102.6	
métabolites	mesuré cpm	calculé % FloOne		mesuré cpm	calculé % FloOne
tyrosine	90225	24.40		0	0.00
tyramine	111706	---		0	---
dopa	26221	7.09		21045	13.15
dopamine	362920	98.13		535224	334.45
CDG	23065	6.24		3263	2.04
FCDG	7610	2.06		1177	0.74
bétanine	21569	5.83		13579	8.49
total des métabolites listés	643316	96.03		574288	97.68

10. Incorporations compétitives de tyrosine et dopa

10.1. Internalisation de la tyrosine-3-¹⁴C et dopa-3-¹⁴C dans les cultures de cellules.

Cultures: Trois suspensions de approximativement 100 ml de *Beta vulgaris* âgées de 3 jours, cultivées dans les conditions décrites sous Exp. chap. 6 sont mélangées et filtrées sur un Büchner muni d'un tamis de Nylon de 100 µm (Schleicher & Schüll TG 100): par pesée on mesure 22.8 g PF pour 281 ml (g) de milieu. Les cellules sont réparties dans 4 Erlenmeyers de 300 ml (par pesée 4.5 g PF pour 70 ml de milieu B5 conditionné filtré 0.2 µm), puis les suspensions cellulaires sont placées sur un agitateur à plateau rotatif tournant à 135 rpm. A partir du solde des cellules 3.80 g PF, un prélèvement de 1.53 g PF est effectué et extrait pour analyse ultérieure de la teneur en acides aminés libres (Tab. 10.1).

Tableau 10.1: Analyse des acides aminés libres et de la bétanine

Acide Aminé [*]	[nmol/g PF]	Acide Aminé	[nmol/g PF]
Thréonine	156	Serine	154
Glutamine	229	Acide Glutamique	837
Alanine	956	Valine	322
Méthionine	7	Isoleucine	112
Leucine	103	Tyrosine	378
Phénylalanine	56	L-dopa	56
Acide aspartique	traces	Acide gamma-amino-butyrique	316
Ethanolamine	13	Glycine	31
Lysine	25	Histidine	37
Arginine	24	Asparagine	traces
Bétanine	250	Ornithine	5

^{*}) Analyse des acides aminés présents dans l'extrait de 1.53 g PF, résultats en nmol/g PF: M. Lavanchy, Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Sektion analytische Chemie, 3097 Liebefeld-Bern

Incubation avec les précurseurs radioactifs: Deux des cultures recevront un seul des précurseurs radioactifs et les deux autres un des précurseurs radioactifs en présence de l'autre précurseur non-radioactif. Les concentrations des précurseurs sont semblables ($\pm 4\%$) dans les deux groupes d'expériences. Les solutions stock suivantes des précurseurs sont ajoutées selon les volumes indiqués dans les tableaux 10.2.1 et 10.2.2: tyrosine-3-¹⁴C (1737 nmol/ml, As=1.044 x 10¹⁴ dpm/mol), tyrosine froide (2000 nmol/ml H₂O à 3% glucose), dopa-3-¹⁴C (766 nmol/ml, As=1.065 x 10¹⁴ dpm/mol, dopa froid (2000 nmol/ml H₂O à 3% glucose)

Au temps 0 min, les solutions de précurseurs sont ajoutées dans les différentes cultures. Deux prélèvements de 50 µl sont effectués après 1, 5, 10, 15 et 20 min pour comptage de la radioactivité. Les suspensions cellulaires sont filtrées sur un Büchner recouvert d'un tamis en Nylon® et les cellules retenues sur le filtre sont lavées avec 50 ml de milieu B5. Les volumes et la radioactivité subsistant dans les filtrats et solutions de lavage réunis sont déterminés (Tab. 10.2.3 et 10.2.4).

Extraction: Les cellules sont pesées (g PF), broyées au Potter Elvjem et extraites à deux reprises avec HCOOH 0.1N. L'extrait est centrifugé, le surnageant collecté, filtré 0.2 µm, le volume est mesuré et la teneur en bétanine déterminée par spectrophotométrie; deux aliquotes de 100 µl sont prélevées pour comptage de la radioactivité internalisée. Les extraits sont évaporés à sec au Rotavapor, 12 Torr, 35°C puis solubilisés dans un minimum de tampon NaH₂PO₄ 0.05M, pH 4.5 et le volume final est ajusté 2.00 ml dans un jaugé. Le concentré est immédiatement congelé à -20°C (Tab. 10.2.6 et 10.2.7).

10.2. Séparation et quantification des métabolites.

Analyse des extraits par HPLC analytique: les échantillons d'extraits (conservés congelés) sont analysés par HPLC dans les conditions décrites sous Exp. chap. 2.1. La détection en continu de la radioactivité et le réglage des fenêtres d'énergie pour la détection du ¹⁴C est décrite sous Exp.1.4. Dans une première série d'analyse, 100 µl de chacun des extraits concentrés sont analysés par HPLC, méthode (c), on quantifie les pics de chaque métabolite séparé, simultanément par UV (intégration des surfaces à 280 nm et calibration à l'aide de standards pour le calcul des réservoirs) et on détermine la radioactivité ¹⁴C en continu (rendement des comptages compris entre 72 et 76%); à partir de ces données, l'incorporation relative dans les métabolites et leur radioactivité spécifique sont calculés. Dans une deuxième série d'analyses HPLC, méthode (d), la détection multilongueur d'onde couplée à la détection du ¹⁴C en continu (rendement 80%) ont permis de calculer la taille des réservoirs, les incorporations relatives et les radioactivités spécifiques des métabolites. Les valeurs expérimentales sont présentées dans les Tab. 10.4 et 10.5. Les résultats sont regroupés de la façon suivante: incorporations relatives (Tab. 10.2.8), les radioactivités spécifiques (10.2.11) et la taille des réservoirs (Tab. 10.2.13). Le Tab. 10.3. regroupe sous une autre forme de présentation les résultats des analyses des métabolites dans les 4 expériences.

Purification de la bétanine radioactive par chromatographie échangeuse d'ions et HPLC analytique: 1 ml de l'extrait cellulaire concentré est déposé sur une colonne échangeuse d'ions

(10 mm Ø x 180 mm, Sephadex SP-C-25 forme protonée); un débit d'environ 1.5 ml/min d'une phase mobile aqueuse d'acide formique 0.1 N est appliqué. L'éluat est séparé visuellement en trois fractions: la fraction no 2 contenant la bétanine est concentrée à sec, solubilisée dans 100 µl de NaH₂PO₄ 0.05 M pH 4.5 et purifiée par HPLC analytique dans les conditions suivantes: pompe HPLC *Spectra-Physics* à gradient ternaire; colonne Spherisorb ODS-2, 5 µm, 0.45 cm Ø x 50 cm; 1 ml/min; phases mobiles: A = HCOOH 0.1 N, B = méthanol; injection 100 µl, gradient linéaire 10 min ⇒ 20 % B; 10 min isocratique 20 % B; gradient linéaire 10 min ⇒ 50 % B; détection: UV 280 nm sur *Cecil 2012*. La fraction de bétanine élue à 16.5 min.

Radiochromatographie de la bétanine: la fraction de bétanine purifiée comme décrit ci-dessus est diluée avec du tampon NaH₂PO₄ 0.05 M pH 4.5, puis quantifiée par spectrométrie à 536 nm. Deux aliquotes de 100 µl sont injectés sur le système HPLC décrit ci-dessus avec les mêmes phases mobiles et avec un gradient linéaire 10 min ⇒ 10 % B, puis en 20 min ⇒ 20 % B et en 10 min ⇒ 50 % B; détection: UV 280 nm sur *Cecil 2012* et détection de la radioactivité ¹⁴C en continu par *FloOne* HP. La radioactivité spécifique de la bétanine est calculée sur la base de la quantité de bétanine injectée déterminée par spectrométrie et par la mesure de la radioactivité dans le pic de bétanine. Conversion des cpm en dpm: rendement 70 %; les résultats sont présentés dans les tableaux récapitulatifs.

Clivage de la bétanine par la réaction d'échange de base: Un volume connu de la solution de bétanine pure obtenue comme décrit dans le paragraphe précédent est évaporé à sec dans un ballon; on ajoute 1 mg de proline dans le ballon contenant la bétanine et de l'autre côté d'un pont pour la distillation adiabatique sous vide, dans un deuxième ballon, on ajoute 5 ml de NH₄OH 1 N. Après dégazage, deux fois, cette solution est distillée adiabatiquement dans le ballon contenant la bétanine. Après 60 min de réaction à température ambiante, la solution de NH₄OH est distillée adiabatiquement dans l'autre ballon. Après évaporation complète de la solution, le système est mis sous atmosphère d'Argon et le mélange réactionnel sec est acidifié avec 0.5 ml de HCOOH 0.1 N. Quatre aliquotes de 100 µl sont prélevées pour l'analyse du cyclodopa glucoside, de l'indicaxanthine et de la bétanine résiduelle: les deux premiers sont utilisés pour la mesure des absorbances à 283, 480 et 536 nm ainsi que pour la mesure de la radioactivité statique et les deux autres aliquotes sont radiochromatographiées comme décrit ci-dessus. La radioactivité spécifique des produits issus de l'hydrolyse de la bétanine sont calculées sur la base de la radioactivité injectée, mesurée, ainsi que sur les quantités de bétanine, de CDG ou d'indicaxanthine déterminés dans les échantillons. Les mesures sont

effectuées en duplicat. Le rendement du comptage en scintillation dynamique est de 70 %; les valeurs expérimentales sont présentées dans le tableau 10.6 et les valeurs calculées dans les Tab. 10.2.14 et 10.2.15.

Normalisation des résultats et calculs :

Internalisation: Dans le tableau 10.2.4 nous présentons les valeurs expérimentales et le calcul de linéarisation par régression. La valeur $T = 0$ min est une valeur calculée par régression. Après vérification les valeurs calculées des quantités de précurseur à $T = 0$ min et les quantités effectivement ajoutées sont pratiquement identiques. L'internalisation des précurseurs est linéaire avec le temps et les coefficients de régression sont bons.

Absorption des précurseurs par les cellules: le calcul de la quantité de précurseur internalisé par les cellules (Tab. 10.2.5) est effectué comme suit:

$$\text{nmol précurseur absorbé par g PF} = \frac{(\text{Activité à } t_0 - \text{Activité au temps } t) \times \text{volume de milieu}}{(\text{radioactivité spécifique} \times \text{g PF})}$$

Normalisation des rapports des incorporation relatives par la vitesse d'internalisation: Pour comparer de façon adéquate les résultats il nous paraît nécessaire de tenir compte des vitesses d'internalisation différentes pour les 4 expériences afin d'assurer. Grâce à la linéarité de l'internalisation des précurseurs sur l'intervalle de mesure (20 min) nous pouvons normaliser les rapports des répartitions centésimales en fonction des différentes vitesses d'internalisation dans les 4 expériences. Dans une première étape les rapports des incorporations relatives sont calculés (Tab. 10.2.9) et dans une seconde étape ces rapports sont multipliés par les rapports des vitesses d'internalisation selon la formule 1. Les résultats de rapports des répartitions centésimales dans les métabolites normalisés par les vitesses d'internalisation des précurseurs sont consignés dans le Tab. 10.2.10.

$$\text{(formule 1) rapport d'incorporation relative} = \frac{\text{métabolite T}^* \%}{\text{métabolite D}^* \%} \times \frac{\text{extrait T}^*}{\text{extrait D}^*} \times \frac{\text{débit D}^*}{\text{débit T}^*}$$

Normalisation des radioactivités spécifiques: une démarche similaire est appliquée aux valeurs des radioactivités spécifiques qui sont normalisées selon la formule 2, Les valeurs sont présentées dans le Tab. 10.2.12

$$\text{(formule 2) rapport normalisé} = \frac{\text{rad spécifique métabolite [tyr-}^{14}\text{C]}}{\text{rad spécifique métabolite [dopa-}^{14}\text{C]}} \times \frac{\text{vitesse [dopa-}^{14}\text{C]}}{\text{vitesse [tyr-}^{14}\text{C]}}$$

Tableau 10.2 : incorporation de la tyrosine-¹⁴C ± dopa non radioactif et de dopa-¹⁴C ± tyrosine non radioactif dans des suspensions de *Beta vulgaris*

1. Précurseur / isotope	Radioactivité spécifique	Concentration solution mère
tyrosine-3- ¹⁴ C	1.044*10 ¹⁴ dpm/mol	1.737*10 ⁻³ M
dopa-3- ¹⁴ C	1.065*10 ¹⁴ dpm/mol	0.766*10 ⁻³ M
tyrosine non radioactive	---	2.00*10 ⁻³ M
dopa non radioactif	---	2.00*10 ⁻³ M

2. Ajout des précurseurs	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + dopa	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + tyrosine
solutions stock	ml / nmol	ml / nmol	ml / nmol	ml / nmol
tyrosine- ¹⁴ C	0.90 / 1563	0.90 / 1563		
tyrosine non-radioactive	0.98 / 1960	0.98 / 1960		1.75 / 3500
total tyrosine	1.88 / 3523	3.63 / 7023		1.75 / 3500
dopa- ¹⁴ C			2.00 / 1532	2.00 / 1532
dopa non-radioactif		1.75 / 3500	1.13 / 2260	1.13 / 2260
total dopa		1.75 / 3500	3.13 / 3792	3.13 / 3792
radioactivités spécifiques [dpm/mol]	4.632*10 ¹³	4.632*10 ¹³	4.303*10 ¹³	4.303*10 ¹³

3. Incubation	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + dopa	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + tyrosine
Durée de l'incubation	20 min	20 min	20 min	20 min
Poids frais [g PF]	4.5	4.5	4.5	4.5
Volume du milieu [ml]	71.98	73.73	73.13	74.88

4. Radioactivité dans le milieu nutritif (A_t en 10⁶dpm/ml):

temps (min)	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + dopa	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + tyrosine
t = 0 min (calculé *)	2.280	2.232	2.246	2.210
t = 1 min	2.283	2.230	2.244	2.200
t = 5 min	2.212	2.175	2.213	2.162
t = 10 min	2.137	2.110	2.165	2.123
t = 15 min	2.119	2.070	2.154	2.071
t = 20 min	2.045	2.023	2.114	2.026
équation régression linéaire *	y = -0.0118x + 2.2795	y = -0.0108x + 2.2315	y = -0.0066x + 2.2456	y = -0.0091x + 2.2097
coefficient de régression linéaire R	0.982	0.994	0.986	0.999

5. Absorbé par les cellules {(A_{t0}-A_t)*volume de milieu} / radioactivité spécifique

en nmol par g P F	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + dopa	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + tyrosine
t = 0 min	0.0	0.0	0.0	0.0
t = 1 min	-1.2	0.6	0.6	3.8
t = 5 min	23.3	20.0	12.4	18.5
t = 10 min	49.2	43.0	30.5	33.6
t = 15 min	55.4	57.2	34.6	53.7
t = 20 min	81.0	73.8	49.7	71.1
équation de la droite de régression	y = 4.0717x + 0.0005	y = 3.812x + 0.0184	y = 2.5036x + 0.0333	y = 3.5387x + 0.0167
coefficient de régression linéaire R	0.987	0.996	0.990	0.999
vitesse d'incorporation en nmol*g ⁻¹ *min ⁻¹	4.072	3.812	2.504	3.539

Tableau 10.2 suite Extraction des métabolites et leur analyse

6. Extraction	tyrosine-¹⁴C	tyrosine-¹⁴C + dopa	dopa-¹⁴C	dopa-¹⁴C + tyrosine
Volume de l'extrait [ml]	53.2	67.9	52.4	56.5
Activité soluble [dpm x 10 ⁶]	12.568 (74.0 %)	13.877 (87.1 %)	9.900 (102.6 %)	11.435 (83.9 %)
Bétanine totale [nmol]	1100	1177	1083	1187
Bétanine [nmol/g PF]	244	262	241	264

7. Concentré pour analyses HPLC	tyrosine-¹⁴C	tyrosine-¹⁴C + dopa	dopa-¹⁴C	dopa-¹⁴C + tyrosine
Volume du concentré [ml]	2.00	2.00	2.00	2.00
Activité totale [dpm x 10 ⁶]	12.57	13.88	9.9	11.44

Analyse des extraits concentrés par HPLC

8. incorporation relative en % de la radioactivité extraite	tyrosine-¹⁴C	tyrosine-¹⁴C + dopa	dopa-¹⁴C	dopa-¹⁴C + tyrosine
tyrosine	53.75	55.30	0.00	0.00
tyramine	3.69	3.30	0.00	0.00
dopa	6.79	9.48	18.91	20.34
dopamine	27.90	25.27	76.86	75.80
cyclodopa glucoside	2.00	1.30	0.78	0.73
bétanine	1.26	0.91	1.55	1.93
total	95.39	95.57	98.10	98.80
somme D,CDG,B	10.06	11.69	21.24	23.00
somme T,TA,DA	85.34	83.88	76.86	75.80

9. rapport des incorporations relatives	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C}}{\text{dopa-}^{14}\text{C}}$	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C} + \text{dopa}}{\text{dopa-}^{14}\text{C}}$	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C}}{\text{dopa-}^{14}\text{C} + \text{tyr}}$	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C} + \text{dopa}}{\text{dopa-}^{14}\text{C} + \text{tyr}}$
dopa	0.36	0.50	0.33	0.47
dopamine	0.36	0.33	0.37	0.33
cyclodopa glucoside	2.56	1.66	2.76	1.79
bétanine	0.81	0.59	0.65	0.47

10. rapport des incorporations relatives normalisé	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C}}{\text{dopa-}^{14}\text{C}}$	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C} + \text{dopa}}{\text{dopa-}^{14}\text{C}}$	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C}}{\text{dopa-}^{14}\text{C} + \text{tyr}}$	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C} + \text{dopa}}{\text{dopa-}^{14}\text{C} + \text{tyr}}$
dopa	0.26	0.43	0.30	0.49
dopamine	0.26	0.28	0.33	0.35
cyclodopa glucoside	1.85	1.42	2.44	1.87
bétanine	0.59	0.50	0.58	0.49

vitesse internalisation Tyr- ¹⁴ C [dpm*g ⁻¹ *min ⁻¹]	188592	176523	188592	176523
vitesse internalisation dopa- ¹⁴ C [dpm*g ⁻¹ *min ⁻¹]	107660	107660	152226	152226
rapport des vitesses	1.75	1.64	1.24	1.16

Tableau 10.2 suite: Analyse des extraits concentrés par HPLC

11. radioactivité spécifique des métabolites [dpm*10 ¹² /mol]	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + dopa	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + tyrosine
tyrosine	1.781	1.954	0.000	0.000
tyramine	---	---	---	---
dopa	1.841	2.279	3.639	4.033
dopamine	0.096	0.090	0.196	0.218
cyclodopa glucoside	0.142	0.109	0.052	0.050
bétanine	0.178	0.136	0.165	0.224

12. radioactivités spécifiques normalisées	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + dopa	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + tyrosine
dopa	0.289	0.382	0.368	0.487
dopamine	0.279	0.280	0.353	0.355
cyclodopa glucoside	1.549	1.270	2.274	1.864
bétanine	0.614	0.503	0.641	0.526

vitesse internalisation Tyr- ¹⁴ C [dpm*g ⁻¹ *min ⁻¹]	188592	176523	188592	176523
vitesse internalisation dopa ¹⁴ C [dpm*g ⁻¹ *min ⁻¹]	107660	107660	152226	152226
rapport des vitesses	1.752	1.640	1.239	1.160

13. RÉSERVOIRS [nmol/g PF]	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + dopa	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + tyrosine
tyrosine	938	868	827	862
tyramine	---	---	---	---
dopa	115	128	114	129
dopamine	9067	8622	8597	8863
cyclodopa glucoside	355	366	327	368
bétanine	220	204	205	220

14. Répartition dans la bétanine [%]	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + dopa	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + tyrosine
bétanine-partie CDG	33	54	6	7
bétanine-partie ac.bétalamique	67	46	94	93
bétanine	100	100	100	100

15. radioactivité spécifique CDG / AB [10 ¹² dpm/mol]	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + dopa	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + tyrosine
bétanine-partie CDG	0.057	0.060	0.009	0.015
bétanine-partie ac.bétalamique	0.114	0.052	0.156	0.202
bétanine	0.170	0.112	0.165	0.217

Tableau 10.3. Expérience de compétition: incorporations relatives et spécifiques dans les réservoirs des métabolites .

	précurseur tyrosine-3- ¹⁴ C			précurseur dopa-3- ¹⁴ C-		
	incorporation relative	radioactivité spécifique	réservoir	incorporation relative	radioactivité spécifique	réservoir
incubation 20 min	% de radioactivité totale	dpm*10¹²/mol	nmol/g PF	% de radioactivité totale	dpm*10¹²/mol	nmol/g PF
tyrosine	53.75	1.781	938	0.00	0.000	827
tyramine	3.69	---	---	0.00	---	---
dopa	6.79	1.841	115	18.91	3.639	114
dopamine	27.90	0.096	9067	76.86	0.196	8597
cyclodopa glucoside	2.00	0.142	355	0.78	0.052	327
bétanine	1.26	0.178	220	1.55	0.165	205
total	95.39			98.10		
bétanine-partie CDG	33	0.057		6	0.009	
bétanine-partie ac.bétalamique	67	0.114		94	0.156	
bétanine	100	0.170		100	0.165	
	précurseur tyrosine-3- ¹⁴ C + dopa non-radioactif			précurseur dopa-3- ¹⁴ C + tyrosine non-radioactive		
incubation 20 min	% de radioactivité totale	dpm*10¹²/mol	nmol/g PF	% de radioactivité totale	dpm*10¹²/mol	nmol/g PF
tyrosine	55.30	1.954	868	0.00	0.000	862
tyramine	3.30	---	---	0.00	---	---
dopa	9.48	2.279	128	20.34	4.033	129
dopamine	25.27	0.090	8622	75.80	0.218	8863
cyclodopa glucoside	1.30	0.109	366	0.73	0.050	368
bétanine	0.91	0.136	204	1.93	0.224	220
total	95.57			98.80		
bétanine-partie CDG	54	0.060		7	0.015	
bétanine-partie ac.bétalamique	46	0.052		93	0.202	
bétanine	100	0.112		100	0.217	

Tableau 10.4 : Expérience de compétition méthode (b)					
précurseur tyrosine-3-¹⁴C, incubation 20 min			précurseur dopa-3-¹⁴C, incubation 20 min		
volume injecté µl	100		volume injecté µl	100	
total injecté dpm	628400	= 100 %	total injecté dpm	495000	= 100 %
total mesuré FloOne cpm	453024		total mesuré FloOne cpm	373548	
rendement FloOne en %	72.1		rendement FloOne en %	75.5	
métabolites	mesuré dpm ⁽¹⁾	calculé % FloOne	métabolites	mesuré dpm ⁽¹⁾	calculé % FloOne
tyrosine	347500	55.30	tyrosine	0	0.00
tyramine	18220	2.90	tyramine	0	0.00
dopa	47130	7.50	dopa	91575	18.50
dopamine	204230	32.50	dopamine	397980	80.40
CDG	4270	0.68	CDG	1213	0.25
FCDG	---	---	FCDG	---	---
bétanine	---	---	bétanine	---	---
total des métabolites listés	621350	98.88	total des métabolites listés	490768	99.15
précurseur tyrosine-3-¹⁴C + dopa non-radioactif, incub. 20 min			précurseur dopa-3-¹⁴C + tyrosine non-radioactive, incub. 20 min		
volume injecté µl	100		volume injecté µl	100	
total injecté dpm	693800	= 100 %	total injecté dpm	571800	= 100 %
total mesuré FloOne cpm	518935		total mesuré FloOne cpm	433148	
rendement FloOne en %	74.8		rendement FloOne en %	75.8	
métabolites	mesuré dpm ⁽¹⁾	calculé % FloOne	métabolites	mesuré dpm ⁽¹⁾	calculé % FloOne
tyrosine	391300	56.40	tyrosine	---	---
tyramine	13180	---	tyramine	---	---
dopa	70770	10.20	dopa	115500	20.20
dopamine	194260	28.00	dopamine	446580	78.10
CDG	17360	2.50	CDG	630	0.11
FCDG	---	---	FCDG	---	---
bétanine	---	---	bétanine	---	---
total des métabolites listés	686870	99.00	total des métabolites listés	562710	98.41

dpm⁽¹⁾: cpm converties en dpm par calcul à partir du pourcentage fourni par le radiochromatographe FloOne

Tableau 10.5 : Expérience de compétition méthode (c)											
précurseur tyrosine-3-¹⁴C, incubation 20 min						précurseur dop-3-¹⁴C a, incubation 20 min					
volume injecté µl	55					volume injecté µl	70				
total injecté dpm	345675					total injecté dpm	346500				
total mesuré FloOne cpm	279702 = 100 %					total mesuré FloOne cpm	275637 = 100 %				
rendement FloOne en %	80.9					rendement FloOne en %	79.5				
métabolites	mesuré cpm	calculé % FloOne	mesuré area int.	calculé nmol	calculé As*10 ¹² dpm/mol	métabolites	mesuré cpm	calculé % FloOne	mesuré area int.	calculé nmol	calculé As*10 ¹² dpm/mol
tyrosine	150345	53.75	62252	105.5	1.781	tyrosine	0	0.00	76800	130.2	0.000
tyramine	10321	3.69	---	---	---	tyramine	0	0.00	---	---	---
dopa	18997	6.79	17600	12.9	1.841	dopa	52115	18.91	24400	17.9	3.639
dopamine	78023	27.90	1346927	1020.0	0.096	dopamine	211862	76.86	1786723	1354.0	0.196
CDG	1067	0.38	---	---	---	CDG	0	0.00	---	---	---
FCDG	4537	1.62	199691	39.9	0.142	FCDG	2158	0.78	257390	51.5	0.052
bétanine	3526	1.26	102091	24.8	0.178	bétanine	4268	1.55	132585	32.3	0.165
total des métabolites listés	266816	95.39				total des métabolites listés	270403	98.10			
précurseur tyrosine-3-¹⁴C + dopa non-radioactif, incubation 20 min						précurseur dopa-3-¹⁴C + tyrosine non-radioactif, incubation 20 min					
volume injecté µl	70					volume injecté µl	70				
total injecté dpm	485800					total injecté dpm	400400				
total mesuré FloOne cpm	386388 = 100 %					total mesuré FloOne cpm	321915 = 100 %				
rendement FloOne en %	79.5					rendement FloOne en %	80.4				
métabolites	mesuré cpm	calculé % FloOne	mesuré area int.	calculé nmol	calculé As*10 ¹² dpm/mol	métabolites	mesuré cpm	calculé % FloOne	mesuré area int.	calculé nmol	calculé As*10 ¹² dpm/mol
tyrosine	213680	55.30	80632	136.7	1.95	tyrosine	0	0.00	80100	135.8	0.00
tyramine	12744	3.30	---	---	---	tyramine	0	0.00	---	---	---
dopa	36646	9.48	27478	20.1	2.28	dopa	65492	20.34	27685	20.3	4.03
dopamine	97659	25.27	1792502	1358.0	0.09	dopamine	244016	75.80	1842538	1396.0	0.22
CDG	0	0.00	---	---	---	CDG	0	0.00	---	---	---
FCDG	5025	1.30	288101	57.6	0.11	FCDG	2341	0.73	289841	58.0	0.05
bétanine	3512	0.91	132489	32.2	0.14	bétanine	6208	1.93	142486	34.7	0.22
total des métabolites listés	369266	95.57				total des métabolites listés	318057	98.80			

Tableau 10.6 : Incorporation dans les parties CDG et acide béta-lamique de la bétanine

		<i>précurseur tyrosine-3-¹⁴C, incubation 20 min</i>			<i>précurseur dopa-3-¹⁴C, incubation 20 min</i>		
		cpm	nmol	As: 10 ¹² dpm/mol ⁽¹⁾	cpm	nmol	As: 10 ¹² dpm/mol ⁽¹⁾
bétanine	injection 1	3114	23.1	0.193	3128	22.9	0.195
	injection 2	2390	23.1	0.148	2159	22.9	0.135
	moyenne			0.170			0.165
		cpm	%	As: 10 ¹² dpm/mol ⁽²⁾	cpm	%	As: 10 ¹² dpm/mol ⁽²⁾
bétanine: partie CDG	injection 1	385	33.9	0.058	177	5.7	0.009
	injection 2	205	32.7	0.056	145	5.6	0.009
	moyenne		33.3	0.057		5.7	0.009
bétanine: partie ac. béta-lamique	injection 1	752	66.1	0.113	2928	94.3	0.156
	injection 2	422	67.3	0.115	2442	94.4	0.156
	moyenne		66.7	0.114		94.3	0.156
		<i>précurseur tyrosine-3-¹⁴C + dopa non-radioactif, incubation 20 min</i>			<i>précurseur dopa-3-¹⁴C + tyrosine non-radioactive, incubation 20 min</i>		
		cpm	nmol	As: 10 ¹² dpm/mol ⁽¹⁾	cpm	nmol	As: 10 ¹² dpm/mol ⁽¹⁾
bétanine	injection 1	2487	33.6	0.106	4143	28.9	0.205
	injection 2	2791	33.6	0.119	4629	28.9	0.229
	moyenne			0.112			0.217
		cpm	%	As: 10 ¹² dpm/mol ⁽²⁾	cpm	%	As: 10 ¹² dpm/mol ⁽²⁾
bétanine: partie CDG	injection 1	1287	54.0	0.061	389	7.1	0.015
	injection 2	1060	53.1	0.060	300	6.5	0.014
	moyenne		53.6	0.060		6.8	0.015
bétanine: partie ac. béta-lamique	injection 1	1096	46.0	0.052	5082	92.9	0.201
	injection 2	936	46.9	0.053	4323	93.5	0.203
	moyenne		46.4	0.052		93.2	0.202

(1) = le rendement du comptage est de 70%, le calcul de la radioactivité spécifique en dpm/mol est effectué en divisant les cpm par 0.70

(2) = la radioactivité spécifique est calculée en multipliant l'incorporation relative dans la partie CDG ou dans la partie acide béta-lamique de la bétanine par la radioactivité spécifique de la bétanine

11. Incorporation en présence d'un inhibiteur: Monofluoro méthyl dopa (MFMD).

11.1. Internalisation de la tyrosine-3-¹⁴C et de la dopa-3-¹⁴C dans les cultures de cellules en présence et en absence d'inhibiteur de la dopa-décarboxylase: le 2-(fluorométhyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-alanine.

Introduction: Pour élucider le mécanisme par lequel l'incorporation de la tyrosine radioactive dans la partie CDG de la bétanine apparaît comme meilleure que celle de la dopa, des essais avec un inhibiteur de la dopa-décarboxylase animale ont été planifiés. Des cultures ont été préincubées avec l'inhibiteur 2-(fluorométhyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-alanine (MFMD) et d'acide ascorbique comme antioxydant, puis après ajout des précurseurs radioactifs, l'internalisation de la radioactivité dans les métabolites a été déterminée. Une comparaison avec des cultures incubées avec les précurseurs radioactifs seuls est effectuée.

Cultures: Des suspensions de *Beta vulgaris* âgées de 3 jours sont cultivées dans les conditions décrites sous Exp. chap. 6.2. et placées sur un agitateur à plateau standard dans trois Erlenmeyers. Afin d'assurer une meilleure homogénéité de l'internalisation des précurseurs, les suspensions cellulaires sont réunies, 250 ml environ, et filtrées sur un Büchner muni d'un tamis de Nylon de 100 µm (Schleicher & Schüll TG 100). Les cellules sont pesées, 16 g PF, et réparties dans 5 Erlenmeyers de 100 ml: 3 g PF pour 40 ml de milieu B5 conditionné, préalablement filtré 0.22 µm, dans chaque Erlenmeyer. Les 5 fioles sont placés sur un agitateur à plateau rotatif tournant à 135 rpm.

Calcul de la concentration de MFMD: le MFMD est chez l'animal, un inhibiteur de la dopa-décarboxylase en bloquant irréversiblement la décarboxylation de dopa en dopamine. Il est efficace 30 à 60 min après l'administration d'une dose de 100 mg/kg (oral ou injection, données non-communiquées). Selon A. L. Maycock, Merck Sharp & Dohme, New Jersey, USA, des injections intrapéritonéales de 4 et 17 mg/kg chez le rat produisent une inhibition presque totale de l'activité de la dopa-décarboxylase du foie et environ 50 % au niveau du cerveau des rats. A partir des données fournies par D.J. Wilkins, Merrell-Dow*, le dosage correspondrait à 0.1 mg MFMD par g PF. Pour une biomasse de 3 g PF par Erlenmeyer, la concentration calculée un dosage de 0.3 mg (0.031 mM/L) par Erlenmeyer (300 µl d'une solution aqueuse à 1 mg/ml). Le MFMD est sensible à l'oxydation et il doit être incubé en présence d'acide ascorbique. Sa solubilité est de 25 mg/ml H₂O.

* Centre de Recherche Merrell International, Dow Chemical Company, Strasbourg, France

Ajout de l'acide ascorbique et préincubation avec le MFMD: Une des cultures servira de contrôle, deux des cultures recevront les précurseurs radioactifs en présence d'acide ascorbique 0.23 ml (1.3 μmol) d'acide ascorbique (1 mg/ml, 5.68 μM) et les deux autres cultures recevront les précurseurs radioactifs respectifs en présence de MFMD et d'acide ascorbique. Dans ce dernier cas, l'antioxydant est ajouté avant l'inhibiteur: 0.3 ml (1.7 μmol) d'acide ascorbique (1 mg/ml, 5.68 μM), suivi par 0.3 ml (1.3 μmol) de solution de MFMD {2-(fluorométhyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-alanine offert par Merrell-Dow, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FNO}_4$ P.M.=229.21, 1 mg/ml, 4.36 μM }. Les cultures avec le MFMD sont préincubées 60 min avant l'ajout des précurseurs radioactifs (Tab. 11.2.1).

Incubation avec les précurseurs radioactifs et suivi de leur internalisation : Au temps 0 min, les solutions de précurseurs radioactifs approximativement 1000 nmol de tyrosine radioactive (tyrosine-3- ^{14}C , As 1.044×10^{14} dpm/mol, 1737 nmol/ml) et 1800 nmol de dopa radioactif (dopa-3- ^{14}C , As 1.065×10^{14} dpm/mol, 766 nmol/ml) sont ajoutés dans les différentes cultures. Des prélèvements de 50 μl en duplicat sont effectués après 1 min et 30 min pour comptage de la radioactivité. Les cultures sont agitées à 135 rpm entre les prélèvements. Après 30 min d'incubation, les suspensions cellulaires sont filtrées sur un Büchner recouvert d'un tamis de Nylon® et les cellules retenues sur le filtre sont lavées avec 50 ml de milieu B5. Les volumes et la radioactivité subsistant dans les filtrats et solutions de lavage réunis sont déterminés (Tab. 11.2.1 à 11.2.4).

Extraction: Les cellules sont pesées (g PF), broyées au Potter Elvjem et extraites à deux reprises avec HCOOH 0.1 N. L'extrait est centrifugé, le surnageant collecté, filtré 0.2 μm , le volume est mesuré et la teneur en bétanine déterminée par spectrométrie; deux aliquotes de 100 μl sont prélevés pour comptage de la radioactivité internalisée. Les extraits sont congelés dans l'azote liquide, puis lyophilisés. Le lyophilisat est solubilisé et ajusté à 2.0 ml dans un jaugé avec NaH_2PO_4 0.05 M pH 4.5. Les solutions sont conservées à -20°C (Tab. 11.2.5, 11.2.6).

11.2. Séparation et quantification des métabolites.

Analyse des extraits par HPLC analytique: les échantillons d'extraits (conservés congelés) sont analysés par HPLC dans les conditions décrites sous Exp. chap. 3.4. La détection en continu de la radioactivité et le réglage des fenêtres d'énergie pour la détection du ^{14}C est

décrite sous Exp. chap. 3.1. Dans cette série d'analyses, 50 µl de chacun des extraits concentrés sont analysés par HPLC, méthode (d); la détection multilongueur d'onde (230, 280, 310, 480 et 536 nm) couplée à la détection du ^{14}C en continu (rendement 80%, conversion des cpm en dpm Exp. chap. 3.1) ont permis de calculer la taille des réservoirs, les incorporations relatives et les radioactivités spécifiques des métabolites. Les incorporations relatives, les radioactivités spécifiques et la taille des réservoirs sont présentés dans les tableaux récapitulatifs (Tab. 11.2.7 à 11.2.12, 11.3, 11.4). Les formules de calcul conduisant aux résultats normalisés (Tab. 11.2.9 et 11.2.11) sont décrites dans Exp. chap 10.2.

Purification de la bétanine par chromatographie échangeuse d'ions et HPLC analytique: 0.4 ml de l'extrait cellulaire est déposé sur une colonne échangeuse d'ions (13 mm Ø x 150 mm; Sephadex SP-C-25 forme protonée; un débit de 1.5 ml/min d'une phase mobile constituée d'acide formique 0.1 N est appliqué (pH éluat = 2.7). L'éluat est séparé visuellement en 3 fractions: fraction no 1 = 12 ml, incolore; fraction no 2 = 15.1 ml, contient la bétanine; fraction no 3 = 50 ml, incolore. Toutes les fractions sont évaporées à sec au Rotavapor, 12 Torr, 35°C. La fraction 2 est solubilisée dans 100 µl de NaH_2PO_4 0.05 M pH 4.5 et purifiée par HPLC analytique dans les conditions suivantes: pompe HPLC *Spectra-Physics* à gradient ternaire; colonne Spherisorb ODS-2, 5 µm, 0.45 cm Ø x 50 cm; 1 ml/min; phases mobiles: A = H_2O , B = CH_3CN , C = méthanol; injection 95 µl, gradient linéaire 30 min \Rightarrow 10 % B; gradient linéaire 15 min \Rightarrow 40% A - 30% B - 30% C; détection multilongueur d'onde UV-Vis à 230, 280, 310, 480, 536 nm. La fraction de bétanine élue vers 23.5 min et l'isobétanine vers 25.9 min. La radioactivité spécifique est obtenue par la combinaison des mesures spectroscopiques UV-Vis (mesure de la D.O. à 536 nm de deux aliquots de 50 µl dilués à 1 ml) et par comptage de la radioactivité en scintillation statique de deux aliquots de 50 µl de la fraction HPLC (Tab. 11.5).

Clivage de la bétanine par la réaction d'échange de base: Un volume connu de la fraction de bétanine purifiée par HPLC analytique est évaporé à sec dans un ballon; on ajoute 0.2 ml de solution aqueuse de proline (1.3 mg) dans le ballon contenant la bétanine, puis sous atmosphère d'Argon, 1 ml de NH_4OH 1.0 N (pH 11.1 à 11.3). Après 60 min de réaction à température ambiante sous Argon, la solution jaune est acidifiée avec HCl 1 N jusqu'à pH 4 à 5. La solution est évaporée à sec au Rotavapor. Le mélange réactionnel est repris dans 0.1 ml de NaH_2PO_4 0.05 M, pH 4.5 et injecté sur l'HPLC analytique dans les conditions suivantes: pompe HPLC *Spectra-Physics* à gradient ternaire; colonne Spherisorb ODS-2, 5 µm,

0.45 cm Ø x 50 cm; 1 ml/min; phases mobiles: A = NaH₂PO₄ 0.05M pH 4.5, B = CH₃CN, C = méthanol; injection 100 µl, 12 min isocratique 100 % A; gradient linéaire 20 min ⇒ 10 % B; gradient linéaire 28 min ⇒ 40% A - 30% B - 30% C; détection multilongueur d'onde UV-Vis à 230, 280, 310, 480, 536 nm. Les fractions de CDG et de d'indicaxanthine sont collectées à la sortie de la colonne. Détermination de la concentration des deux substances par spectroscopie: CDG ($\epsilon_{283 \text{ nm}} = 3400$) acidifié à pH 2.5 avec 0.020 ml d'HCl 0.1 N; indicaxanthine ($\epsilon_{484 \text{ nm}} = 42500$). Prélèvement de deux aliquotes de 0.1 ml à partir de la solution spectroscopique pour comptage de la radioactivité. Calcul des radioactivités spécifiques sur la base des mesures effectuées. Résultats dans tableaux récapitulatifs (Tab. 11.2.13, 11.2.14 et 11.5).

Purification du Formyl-CDG: la fraction 1 Sephadex des extraits dopa sans MFMD et dopa avec MFMD est évaporée à sec au Rotavapor, 12 Torr, 35°C, puis solubilisée avec 100 µl de NaH₂PO₄ 0.05M pH 4.5. Injection sur HPLC analytique dans les conditions ci-dessus. Le pic de Formyl-CDG est collecté vers 28.8 min; la concentration est déterminée par spectroscopie ($\epsilon_{307 \text{ nm}} = 10000$); deux prélèvements de 100 µl sont effectués pour la mesure de la radioactivité et la radioactivité spécifique est calculée. Résultats dans tableaux récapitulatifs (Tab. 11.4).

Tableau 11.2 : incorporation de la tyrosine-¹⁴C ± MFMD et de dopa-¹⁴C ± MFMD dans des suspensions de *Beta vulgaris*.

1. Précurseurs / inhibiteur	Radioactivité spécifique	Concentration solution mère
tyrosine-3- ¹⁴ C	1.044*10 ¹⁴ dpm/mol	1.737*10 ⁻³ M
dopa-3- ¹⁴ C	1.065*10 ¹⁴ dpm/mol	0.766*10 ⁻³ M
acide ascorbique (1 mg/ml)	---	5.68*10 ⁻³ M
MFMD (1 mg/ml)	---	4.36*10 ⁻³ M

2. Ajout des précurseurs et de l'inhibiteur au milieu	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + MFMD	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + MFMD
Volume de milieu [ml]	40	40	40	40
solutions stock	nmol	nmol	nmol	nmol
acide ascorbique [nmol]	1300	1700	1300	1700
MFMD [nmol]	---	1300	---	1300
tyrosine- ¹⁴ C ⁽¹⁾ [nmol]	951	1087	---	---
dopa- ¹⁴ C ⁽¹⁾ [nmol]	---	---	1653	1809

1) quantité de précurseur calculée à t 0' à partir des activités mesurées à t 1 min et à t 30 min dans le milieu

3. Incubation	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + MFMD	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + MFMD
Durée de l'incubation	30 min	30 min	30 min	30 min
Poids frais [g PF]	3.00	3.00	3.00	3.00
Volume du milieu [ml]	41.03	41.40	42.63	43.00

4. Radioactivité dans le milieu nutritif (A _i en 10 ⁶ dpm/ml) et absorption par les cellules	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + MFMD	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + MFMD
t = 0 min ⁽¹⁾	2.421	2.741	4.130	4.482
t = 1 min	2.399	2.718	4.102	4.453
t = 30 min	1.765	2.055	3.304	3.614
absorbé par les cellules [dpm*10 ⁶]	26.910	28.395	35.192	37.321
vitesse d'internalisation [dpm*10 ⁶ *g ⁻¹ *min ⁻¹]	0.299	0.315	0.391	0.415
vitesse d'internalisation [nmol*g ⁻¹ *min ⁻¹]	2.864	3.022	3.672	3.894

(1) quantité de précurseur calculée à t 0 min à partir des activités mesurées à t 1 min et à t 30 min dans le milieu

5. Extrait	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + MFMD	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + MFMD
Volume de l'extrait [ml]	13.90 ⁽²⁾	42.02	44.54	48.93
Activité soluble [dpm x 10 ⁶]	27.914 (28.1%)	31.121 (27.4%)	31.322 (17.8%)	33.952 (17.6%)
Bétanine totale [nmol]	1945	1912	1960	1935
Bétanine [nmol/g PF]	648	637	653	645

2) perte de 55.9% de l'extrait clarifié juste avant évaporation au Rotavapor.

6. Concentré pour analyses HPLC	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + MFMD	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + MFMD
Volume du concentré [ml]	0.95 ⁽²⁾	2.00	2.00	2.00
Activité totale [dpm x 10 ⁶]	12.31	31.12	31.32	33.95

Analyse des métabolites par HPLC (Tableau 11.2 suite)

7. Incorporation relative en % de la radioactivité extraite	tyrosine-¹⁴C	tyrosine-¹⁴C + MFMD	dopa-¹⁴C	dopa-¹⁴C + MFMD
tyrosine	40.24	48.42	0.00	0.00
tyramine	5.90	5.56	0.00	0.00
dopa	3.24	6.55	10.58	33.09
dopamine	35.50	27.32	75.90	53.37
cyclodopa glucoside	3.29	2.34	1.61	2.06
bétanine	5.09	4.93	6.90	6.24
total	93.26	95.11	95.00	94.77
somme D,CDG,B	11.62	13.81	19.10	41.40
somme T,TA,DA	81.64	81.29	75.90	53.37

8. Rapport des incorporations relatives	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C}}{\text{dopa-}^{14}\text{C}}$	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C}}{\text{tyr-}^{14}\text{C} + \text{MFMD}}$	$\frac{\text{dopa-}^{14}\text{C}}{\text{dopa-}^{14}\text{C} + \text{MFMD}}$	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C} + \text{MFMD}}{\text{dopa-}^{14}\text{C} + \text{MFMD}}$
dopa	0.31	0.49	0.32	0.20
dopamine	0.47	1.30	1.42	0.51
cyclodopa glucoside	2.04	1.41	0.78	1.13
bétanine	0.74	1.03	1.11	0.79

9. Rapport des incorporations relatives normalisé	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C}}{\text{dopa-}^{14}\text{C}}$	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C}}{\text{tyr-}^{14}\text{C} + \text{MFMD}}$	$\frac{\text{dopa-}^{14}\text{C}}{\text{dopa-}^{14}\text{C} + \text{MFMD}}$	$\frac{\text{tyr-}^{14}\text{C} + \text{MFMD}}{\text{dopa-}^{14}\text{C} + \text{MFMD}}$
dopa	0.36	0.47	0.31	0.24
dopamine	0.55	1.23	1.39	0.62
cyclodopa glucoside	2.38	1.33	0.76	1.36
bétanine	0.86	0.98	1.08	0.95

vitesse internalisation Tyr- ¹⁴ C [dpm*g ⁻¹ *min ⁻¹]	299000	299000	391020	315497
vitesse internalisation dopa- ¹⁴ C [dpm*g ⁻¹ *min ⁻¹]	391020	315497	414678	414678
rapport des vitesses	0.76	0.95	0.94	0.76

10. Radioactivités spécifiques des métabolites [dpm*10¹²/mol]	tyrosine-¹⁴C	tyrosine-¹⁴C + MFMD	dopa-¹⁴C	dopa-¹⁴C + MFMD
tyrosine	28.23	44.60	---	---
tyramine	---	---	---	---
dopa	14.64	34.59	37.48	61.51
dopamine	0.50	0.43	1.12	0.94
cyclodopa glucoside	0.81	0.62	0.44	0.60
bétanine	0.99	1.14	1.48	1.56

Analyse des métabolites par HPLC (Tableau 11.2 suite)

11. Radioactivités spécifiques normalisées	tyr- ¹⁴ C	tyr- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C	tyr- ¹⁴ C + MFMD
	dopa- ¹⁴ C	tyr- ¹⁴ C + MFMD	dopa- ¹⁴ C + MFMD	dopa- ¹⁴ C + MFMD
dopa	0.511	0.447	0.646	0.739
dopamine	0.581	1.212	1.266	0.607
cyclodopa glucoside	2.430	1.382	0.775	1.362
bétanine	0.876	0.918	1.006	0.960

vitesse internalisation Tyr- ¹⁴ C [dpm*g ⁻¹ *min ⁻¹]	299000	299000	391020	315497
vitesse internalisation dopa- ¹⁴ C [dpm*g ⁻¹ *min ⁻¹]	391020	315497	414678	414678
rapport des vitesses	0.76	0.95	0.94	0.76

12. RÉSERVOIRS [nmol/g PF]	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + MFMD	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + MFMD
tyrosine	132	115	98	110
tyramine	---	---	---	---
dopa	20	20	29	62
dopamine	6600	6674	6855	6520
cyclodopa glucoside	326	362	344	371
bétanine	476	458	473	460

13. Répartition dans la bétanine [%]	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + MFMD	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + MFMD
bétanine-partie CDG	32	20	7	9
bétanine-partie ac.bétalamique	68	80	93	91
bétanine	100	100	100	100

14. radioactivité spécifique [10 ¹² dpm/mol]	tyrosine- ¹⁴ C	tyrosine- ¹⁴ C + MFMD	dopa- ¹⁴ C	dopa- ¹⁴ C + MFMD
bétanine-partie CDG	0.255	0.131	0.075	0.108
bétanine-partie ac.bétalamique	0.542	0.536	0.949	1.095
bétanine	0.755	0.735	1.178	1.388

Tableau 11.3

Expérience d'inhibition ± MFMD: incorporations relatives et spécifiques dans les réservoirs des métabolites						
précurseur tyrosine-3- ¹⁴ C, incubation 30 min				précurseur dopa-3- ¹⁴ C, incubation 30 min		
	incorporation relative	radioactivité spécifique	réservoir	incorporation relative	radioactivité spécifique	réservoir
métabolite	% de radioactivité totale	dpm*10 ¹² /mol	nmol/g PF	% de radioactivité totale	dpm*10 ¹² /mol	nmol/g PF
tyrosine	40.24	28.23	132	0.00	---	98
tyramine	5.90	---	---	---	---	---
dopa	3.24	14.64	20	10.58	37.48	29
dopamine	35.50	0.50	6600	75.90	1.12	6855
cyclodopa glucoside	3.29	0.81	326	1.61	0.44	344
bétanine	5.09	0.99	476	6.90	1.48	473
total des métabolites	93.26			95.00		
bétanine-partie CDG	32.0	0.255		7.3	0.075	
bétanine-partie ac.bétalamique	68.0	0.542		92.7	0.949	
bétanine	100.0	0.755		100.0	1.178	

précurseur tyrosine-3- ¹⁴ C + MFMD, incubation 30 min				précurseur dopa-3- ¹⁴ C + MFMD, incubation 30 min		
	incorporation relative	radioactivité spécifique	réservoir	incorporation relative	radioactivité spécifique	réservoir
métabolite	% de radioactivité totale	dpm*10 ¹² /mol	nmol/g PF	% de radioactivité totale	dpm*10 ¹² /mol	nmol/g PF
tyrosine	48.42	44.60	115	0.00	---	110
tyramine	5.56	---	---	0.00	---	---
dopa	6.55	34.59	20	33.09	61.51	62
dopamine	27.32	0.43	6674	53.37	0.94	6520
cyclodopa glucoside	2.34	0.62	362	2.06	0.60	371
bétanine	4.93	1.14	458	6.24	1.56	460
total des métabolites	95.11			94.77		
bétanine-partie CDG	19.7	0.131		8.9	0.108	
bétanine-partie ac.bétalamique	80.3	0.536		91.1	1.095	
bétanine	100.0	0.735		100.0	1.388	

Tableau 11.4 Expérience d'inhibition ± MFMD, méthode (c)											
précurseur tyrosine-3-¹⁴C, incubation 20 min						précurseur dopa-3-¹⁴C, incubation 30 min					
volume injecté µl	50					volume injecté µl	50				
total injecté dpm	647895					total injecté dpm	783050				
total mesuré FloOne cpm	599207 = 100 %					total mesuré FloOne cpm	706141 = 100 %				
rendement FloOne en %	92.5					rendement FloOne en %	90.2				
métabolites	mesuré cpm	calculé % FloOne	mesuré area int.	calculé nmol	calculé As*10 ¹² dpm/mol	métabolites	mesuré cpm	calculé % FloOne	mesuré area int.	calculé nmol	calculé As*10 ¹² dpm/mol
tyrosine	241113	40.24	6502	9.18	28.231	tyrosine	0	0.00	5218	7.37	---
tyramine	35348	5.90	---	---	---	tyramine	0	0.00	---	---	---
dopa	19390	3.24	2332	1.42	14.645	dopa	74739	10.58	3512	2.14	37.482
dopamine	212724	35.50	727987	459.6	0.498	dopamine	535972	75.90	814418	514.2	1.121
CDG	2524	0.42	---	---	---	CDG	873	0.12	---	---	---
FCDG	17185	2.87	32676	22.7	0.814	FCDG	10517	1.49	37162	25.8	0.438
bétanine	30507	5.09	162979	33.1	0.990	bétanine	48759	6.90	174564	35.5	1.478
total des métabolites listés	558791	93.26				total des métabolites listés	670860	95.00			
précurseur tyrosine-3-¹⁴C + MFMD, incubation 30 min						précurseur dopa-3-¹⁴C + MFMD, incubation 30 min					
volume injecté µl	50					volume injecté µl	50				
total injecté dpm	778025					total injecté dpm	848800				
total mesuré FloOne cpm	738564 = 100 %					total mesuré FloOne cpm	800348 = 100 %				
rendement FloOne en %	94.9					rendement FloOne en %	94.3				
métabolites	mesuré cpm	calculé % FloOne	mesuré area int.	calculé nmol	calculé As*10 ¹² dpm/mol	métabolites	mesuré cpm	calculé % FloOne	mesuré area int.	calculé nmol	calculé As*10 ¹² dpm/mol
tyrosine	357578	48.42	6104	8.62	44.597	tyrosine	0	0.00	5830	8.23	---
tyramine	41048	5.56	---	---	---	tyramine	0	0.00	---	---	---
dopa	48358	6.55	2462	1.50	34.595	dopa	264863	33.09	7584	4.63	61.511
dopamine	201788	27.32	792907	500.6	0.433	dopamine	427127	53.37	774540	489.0	0.939
CDG	1544	0.21	---	---	---	CDG	977	0.12	---	---	---
FCDG	15718	2.13	39139	27.2	0.622	FCDG	15538	1.94	40099	27.8	0.600
bétanine	36389	4.93	169166	34.4	1.138	bétanine	49977	6.24	169733	34.5	1.558
total des métabolites listés	702423	95.11				total des métabolites listés	758482	94.77			

le rendement du compteur FloOne a été estimé à 93 % de moyenne sur les 4 expériences et les radioactivités spécifiques exprimées en dpm/mol sont obtenues par le calcul suivant: **activité spécifique** = cpm FloOne / (nmol * 0.93); **nmol** = (area*débit)/(ε*0.6); ε: tyrosine 1180 à 280 nm; dopamine 2640 à 280 nm; cyclodopaglusoside (CDG) 2900 à 280 nm; dopa 2730 à 280 nm; formylcyclodopaglusoside (FCDG) 2400 à 310 nm; bétanine 8200 à 536 nm

Tableau 11.5: Expérience d'inhibition ± MFMD: incorporation dans les parties CDG et acide bétalamique de la bétanine

	<i>précurseur tyrosine-3-¹⁴C, incubation 30 min</i>				<i>précurseur dopa-3-¹⁴C, incubation 30 min</i>			
	dpm	nmol	As: 10 ¹² dpm/mol ⁽¹⁾	%	dpm	nmol	As: 10 ¹² dpm/mol ⁽¹⁾	%
bétanine	1293	1.71	0.755	100.0	2574	2.19	1.178	100.0
bétanine: partie CDG	283	1.11	0.255	32.0	400	5.35	0.075	7.3
bétanine: partie ac. bétalamique	1840	3.39	0.542	68.0	5157	5.44	0.949	92.7
CDG libre⁽¹⁾	32423	68.81	0.471					

	<i>précurseur tyrosine-3-¹⁴C + MFMD, incubation 30 min</i>				<i>précurseur dopa-3-¹⁴C + MFMD, incubation 30 min</i>			
	dpm	nmol	As: 10 ¹² dpm/mol ⁽¹⁾	%	dpm	nmol	As: 10 ¹² dpm/mol ⁽¹⁾	%
bétanine	5361	7.29	0.735	100.0	3867	2.79	1.388	100.0
bétanine: partie CDG	4177	31.77	0.131	19.7	873	8.12	0.108	8.9
bétanine: partie ac. bétalamique	11823	22.04	0.536	80.3	6977	6.37	1.095	91.1
CDG libre⁽¹⁾	72414	123.1	0.588					

(1) le CDG libre a été déterminé comme formylcyclodopa glucoside

Liste des abréviations et des unités utilisées.

HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
UV-Vis	Ultraviolet-visible
RMN	Résonance magnétique nucléaire
dopa	3,4-dihydroxyphenylalanine
CDG	cyclodopa glucoside
FCDG	formyl-cyclodopa glucoside
BVR	souche de cellules de <i>Beta vulgaris</i> produisant des bétacyanes
BVW	souche de cellules de <i>Beta vulgaris</i> incolore
nmol	10^{-9} mol
g PF	expression de la biomasse cellulaire en gramme de poids frais
nmol/g PF	unité utilisée pour les quantités de métabolites mesurées par g PF
dpm	désintégrations par minute (60 dpm = 1 Becquerel (Bq))
cpm	coups par minute obtenu par comptage sans correction pour le rendement
quenching	extinction de fluorescence en comptage par scintillation liquide
dpm/mol	unité de radioactivité spécifique (diviser par 60 pour obtenir des Bq/mol)
NM	non-mesuré
ϵ	epsilon, coefficient d'absorption molaire
λ_{536nm}	mesure à la longueur d'onde 536 nm

Bibliographie.

- [1] Wyler H., Dreiding A.S., *Experientia*, **1961**, 17, 23
- [2] Mabry T.J., Dreiding A.S., 'The Betalains, a Class of Red pigments in the Centrospermae', , 'Recent Advances in Phytochemistry', Eds. Mabry T.J., Alston R.E., and Runeckles V.C., Appleton-Century-Crofts, New York, **1968**, 1, 145-160
- [3] Piattelli M., "The Betalains", in "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" Ed. Goodwin T.W., Academic Press, New York, **1976**, 1, 560-596
- [4] Steglich W., Strack D., "Betalains", in 'The Alkaloids', Ed. Brossi A., Academic Press, New York, **1990**, 39, 1-62
- [5] Musso H., *Tetrahedron Report No 70*, *Tetrahedron*, **1979**, 35, 2843-2853
- [6] Wilcox M.E., Wyler H., Mabry T.J., Dreiding A.S., *Helv. Chimica Acta*, **1965**, 48, 252-258
- [7] Piattelli M., Minale L., Prota G., *Tetrahedron*, **1964**, 20, 2325-2329
- [8] Kimler L., Larson R.A., Messenger L., Moore J.B., Mabry T.J., *Chem. Commun.*, **1971**, 1329-1330
- [9] Wyler H., Mabry T.J., Dreiding A.S., *Helv. Chimica Acta*, **1963**, 46, 1745-1748
- [10] Raper H.S., *Phys.Revs.*, **1928**, 8, 245
- [11] Mason H.S., *J.Biol.Chem.*, **1948**, 172, 83-99
- [12] Dagley S., Evans W.C., Ribbons D.W., *Nature*, **1960**, 188, 560-566
- [13] Kojima Y., Itada N., Hayaishi O., *J. Biol.Chem.* , **1961**, 236, 2223-2228
- [14] Miller H.E., Rösler H., Wohlpart A., Wyler H., Wilcox M.E., H.Frohofer, T.J.Mabry, Dreiding A.S., *Helv. Chimica Acta*, **1968**, 51, 1470-1474
- [15] Liebisch H.W., Matschiner B., Schütte R.H., *Z. Pflanzenphysiol.*, **1969**, 61, 269-278
- [16] Garay A.S., Towers H.N., *Canad. J. Botany*, **1966**, 44, 231-236
- [17] Minale L., Piattelli M., Nicolaus R.A., *Phytochemistry*, **1965**, 4, 593
- [18] Strack D., Reznik H., *Z.Pflanzenphysiol.*, **1979**, 94, 163-167
- [19] Wyler H., Meuer U., *Helv. Chimica Acta*, **1979**, 62, 1330-1339
- [20] Heacock R.A., "The Chemistry of Adrenochrome and Related Compounds, *Chem.Revs*, **1959**, 59, 181-237
- [21] Wyler H., Chiovini J., *Helv. Chimica Acta*, **1968**, 51, 1476-1494
- [22] Strack D., Engel U., Reznik H., *Z.Pflanzenphysiol*, **1981**, 101, 215-222
- [23] Adachi T., Nakatukasa M., *Z.Pflanzenphysiol*, **1982**, 109, 155-162
- [24] Zenk M.H., El-Shagi H., Arens H., Stöckigt J., Weiler E.W., Deus B., "Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*", **1977**, *Plant Tissue Culture and its Biotechnological applications*, Ed Barz, Reinhard
- [25] Meins F.Jr., Lutz J., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1983**, 34, 327
- [26] Larkin P.J., Scowcroft W.R., *Theor. Appl. Genet.*, **1981**, 60, 197
- [27] Street H.E., *Plant Tissue and Cell Culture*, **1977**, Vol 11, 2nd ed Blackwell, 207-222
- [28] Kodja H., Liu D., Mérillon J.-M., Andreu F., Rideau M., Chénieux J.-C., *C.R. Acad. Sci. Paris*, **1989**, 309, III, 453-458
- [29] Constabel F., Nassif-Makki H., *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **1971**, 84, 629-636
- [30] Weller T.A., Lasure L.L., *Journal of Food Science*, **1981**, 47, 162-163
- [31] Endress R., *Phytochemistry*, **1977**, 16, 1549-1554
- [32] Schröder W., Böhm H., *Plant Cell Reports*, **1984**, 3, 14-17
- [33] Endress R., *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **1976**, 169, 87-98
- [34] Endress R., *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **1979**, 174, 17-25
- [35] Endress R., *Plant Physiol.*, **1981**, 68, 272-274
- [36] Colomas J., Bulard C., *Bul. Soc. Bot. Fr.*, **1977**, 124, 385-393
- [37] Colomas J., Barthe P., Bulard C., *Z. Pflanzenphysiol.*, **1978**, 87, 341-346
- [38] Strack D. et al, *Plant Physiology*, **1999**, 119, 1217-1232

- [39] Zenk M.H., Pharmazeutische Biologie, Karlstrasse 29, München, FRG
- [40] Zrýd J.P., Bauer J., Wyler H. and Lavanchy P., **1982**, Plant Tissue Culture, Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture, 387-388
- [41] Gamborg O.L., Plant Physiol., **1970**, 45, 372-375
- [42] Girod P.A., Zrýd J.P., Plant Cell Rep, **1987**, 6, 27-30
- [43] Girod P.A., Zrýd J.P., Plant Cell, Tissue and Organ Cult., **1991**, 25, 1-12
- [44] Girod P.-A., Travail de diplôme de biologiste, Université de Lausanne, direction J.-P. Zrýd, **1985**
- [45] Blackman, M.S., Mc Daniel C.N., Plant physiology, **1980**, 66, 261-266
- [46] Blackman, M.S., Mc Daniel C.N., Plant Sci. Lett., **1978**, 13, 27-34
- [47] Snape J.B., Thomas N.H., Callow J.A., Biotechnology and Bioengineering, **1989**, 34, 1058-1062
- [48] Bailey C.M., Nicholson H., Biotechnology and Bioengineering, **1989**, 34, 1331-1336
- [49] Monod J., The growth of bacterial cultures, Ann.Rev.Microbiol., **1949**, 3, 271
- [50] King P.J., Street H.E., "Growth Patterns in Batch Cultures", Chap. in Plant Tissue and Cell Culture, Botanical Monographs, **1977**, Vol. 11, 87 and 307-387, Street H.E. Ed.; Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edimburgh, Melbourne, 2nd Ed.
- [51] Dawes E.A., Quantitative problems in Biochemistry, E&S Livingstone LTD, Edimburgh & London, **1967**, 230-239
- [52] Manius G.J., Tscherne R.J., International Laboratory, March **1981**, 38-48
- [53] Papp E., Vigh Gy., Journal of Chromatography, **1983**, 259, 49-58
- [54] Brandl W., Herrmann K., J. of Chromatography, **1983**, 260, 447-455
- [55] Woolf T.F., Change T., "Recent Advances in Drug Metabolism Methodology", in Pharmacokinetics: Regulatory, Industrial, Academic Perspectives, P.G. Welling and F.L.S. Tse, eds (Dekkar, New York), **1988**, 451-471
- [56] Sciuto S., Oriente G., Piattelli M., Phytochemistry, **1972**, 11, 2259-2262
- [57] Wyler H., Meuer U., Bauer J., Stravs L., Helv. Chimica Acta, **1984**, 67, 1348-1355
- [58] Bell A.A., Ann. Rev. Plant Physiol., **1981**, 32, 21-81
- [59] Meyer E., Barz W., Planta Med., **1978**, 33, 336-344
- [60] Camirand A., Phipps J., Wightman F., Can. J. Bot., **1983**, 61, 2302-2308
- [61] Atkins G.L., Modèles à compartiments multiples pour les systèmes biologiques, Ed. Gauthier-Villars, traduction française 1973, édition originale **1969**
- [62] Brown S.A., Wetter L.R., Progress in Phytochemistry, **1972**, 3, 1-45, Interscience Publishers, John Wiley
- [63] Dawes E.A., Quantitative problems in Biochemistry, E&S Livingstone LTD, Edimburgh & London, **1967**, 230-239
- [64] Zilversmit D.B., Entenman C., Fishler M.C., J. Gen. Physiol., **1943**, 26, 325
- [65] Schumacher Ernst, University of Bern, Department of Chemistry and Biochemistry, Freiestrasse 3, CH-3012 Bern
- [66] Czichi U., Kindl H., Planta, **1975**, 125, 115-125
- [67] Czichi U., Kindl H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **1975**, 356, 475-486
- [68] Czichi U., Kindl H., Planta, **1978**, 134, 133-143
- [69] Kollonitsch J., Isr. J. Chem., **1978**, 17, 53
- [70] Wang E. & Walsh C., Biochemistry, **1978**, 17, 1313
- [71] Maycock A.L., Aster S.D., Patchett A.A., Biochemistry, **1980**, 19, 709-718
- [72] Schliemann W., Steiner U., Strack D., Phytochemistry, **1998**, 49, 1593-1598
- [73] Strack D. *et al*, The Plant Journal, **1999**, 19(5), 509-519
- [74] Stafford H.A., The Biochemistry of Plants, **1981**, 7, 117-137
- [75] Pandey A, Mann M., Nature, **2000**, 405, 837-846
- [76] Fiehn O. *et al*, Nature Biotechnology, **2000**, 18, 1157-1161

Publications et présentations liées au travail de thèse

- [I] Pigment biosynthesis and precursor metabolism in red beet semi-continuous cell suspension cultures. Jean-Pierre Zrýd, Jacques Bauer, Hugo Wyler and Pierre Lavanchy, Plant Tissue Culture, Proc. 5th Intl. Congr. Plant Tissue & Cell Culture, **1982**, 387-388.
- [II] Cyclodopa glucoside (=2S)-5-(β-D-Glucopyranosyloxy)-6-hydroxy-indoline-2-carboxylic acid) and its occurrence in Red Beet (*Beta vulgaris* var. rubra L.). Hugo Wyler, Ursula Meuer, Jacques Bauer, Luisa Stravs-Mombelli, Helvetica Chimica Acta, **1984**, 67, 1348-1355.
- [III] Présentation orale à la Société Suisse de Chimie, le 19 octobre **1984** à l'Université de Berne: Biosynthèse des bétacyanes: sur l'incorporation de la tyrosine et de la dopa dans le cyclodopa glucoside dans des cultures de *Beta vulgaris*. Jacques Bauer & Hugo Wyler.

Stages

Des travaux sur les produits naturels, sesquiterpénoïdes lactones, isolés à partir de feuilles de tournesol sauvage et sur les bétalaïnes de fleurs et fruits de Cactus ont été effectués au cours d'un stage de 3 mois (1981) dans les laboratoires du Professeur T. J. Mabry, Dept of Biological Chemistry, Texas University, Austin, TX, U.S.A.

Cours pratique sur les cultures de cellules végétales chez le Professeur Jean-Pierre Zrýd, Institut de Phytogénétique Cellulaire, Université de Lausanne (1982 et 1983).

Résumé.

L'objectif de ce travail est l'étude des voies métaboliques conduisant à la bétanine dans des cultures de *Beta vulgaris* L. par incorporation de tyrosine et de dihydroxyphenylalanine (dopa).

Expériences avec les racines. Des essais d'incorporation de tyrosine-¹⁴C et de dopa-¹⁴C dans des racines de *Beta vulgaris* L. ont conduit à identifier un nouvel intermédiaire biosynthétique le cyclodopa glucoside (CDG) présent plus particulièrement dans les jeunes racines. Ce composé que nous avons caractérisé est présent en quantité importante dans les racines, au même titre que la bétanine qui est le colorant rouge-violet de la betterave rouge. L'analyse de la répartition de la radioactivité entre les deux parties de la bétanine après hydrolyse montre une incorporation inégale entre les parties cyclodopa glucoside et acide bétalamique de la molécule. La dopamine est identifiée comme métabolite important dans cette plante.

Expériences avec les cultures de cellules. La mise au point de cultures de *Beta vulgaris* L. en suspension riches en bétanine nous a permis de procéder à des études de la biosynthèse et de comprendre le rôle joué par les précurseurs tyrosine et dopa dans la compartimentation du métabolisme conduisant au CDG et à la bétanine.

Les études de biosynthèse ont été rendues possibles par la standardisation des conditions de culture et d'incubation avec les précurseurs radioactifs. Une méthode analytique intégrant la séparation HPLC en une seule étape de tous les métabolites, suivie par la détection simultanée à plusieurs longueurs d'onde et la mesure en continu de la radioactivité a été développée. Les métabolites radioactifs qui ont été identifiés dans les extraits des cultures de cellules sont: tyrosine, dopa, dopamine (majoritaire), tyramine, CDG et bétanine.

Une expérience de cinétique d'incorporation effectuée sur 3 h a confirmé le CDG comme intermédiaire biosynthétique à part entière avec une incorporation plus rapide à partir de la tyrosine-¹⁴C que à partir de dopa-¹⁴C. Un modèle mathématique simulant à partir des données expérimentales les flux des métabolites entre les compartiments nous a conduit à proposer deux réservoirs de dopa métaboliquement distincts pour expliquer l'incorporation inégale dans le CDG et la bétanine.

Pour les études suivantes de la compartimentation, des incorporations de plus courte durée 20, 30 et 60 min ont été effectuées en conditions expérimentales stationnaires afin d'assurer une internalisation linéaire des précurseurs au cours du temps.

L'incubation des cultures simultanément avec la tyrosine- ^3H et dopa- ^{14}C effectuée avec peu de cellules a mis en évidence une incorporation préférentielle de la tyrosine dans le CDG basée sur le rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ du CDG supérieur au rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ de dopa.

Des expériences de compétition effectuées en présence simultanément des deux précurseurs en quantité équimolaires, alternativement marqué au ^{14}C et non radioactifs, ont démontré une incorporation préférentielle de la tyrosine- ^{14}C dans le CDG et dans la partie dihydroindole de la bétanine. L'apport de tyrosine non radioactive interfère avec dopa- ^{14}C internalisé, renforçant notre hypothèse des compartiments de dopa métaboliquement distincts: dopa(1) donnant un accès préférentiel à CDG et dopa(2) alimentant en majorité les réservoirs de dopamine et d'acide bétalamique.

Les expériences réalisées avec un inhibiteur de la dopa décarboxylase la 2-(fluorométhyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-alanine (MFMD) confirment que l'accumulation temporaire de dopa radioactif observée n'a pas la même biodisponibilité pour la synthèse du CDG et de l'acide bétalamique si elle provient de dopa issu de la tyrosine- ^{14}C ou de dopa- ^{14}C administrés aux cellules.

Un modèle métabolique cellulaire simplifié étayé par les résultats expérimentaux propose deux compartiments de dopa métaboliquement distincts: le compartiment dopa(1) est alimenté par la tyrosine et conduit directement au CDG et le compartiment dopa(2) lié à dopa(1) est la source de l'acide bétalamique et de la dopamine. Le CDG et l'acide bétalamique résultant de ces deux voies métaboliques différentes sont assemblés par condensation pour constituer la bétanine qui est trouvée dans le compartiment vacuolaire.

Summary.

The aim of our work is the study of the metabolic pathways leading to betanin in cell cultures of *Beta vulgaris* L. by incorporation of tyrosine and dihydroxyphenylalanine (dopa).

Experiments with the entire plant. Incorporation trials with ^{14}C -tyrosine and ^{14}C -dopa in roots of *Beta vulgaris* L. led to the identification of a novel biosynthetic intermediate cyclodopa glucoside (CDG) present especially in young roots. We have fully characterized this compound which was found in large amounts in the roots, in conjunction with betanin that is the red-violet dye of red beets. The analysis of the distribution ratio of radioactivity between the two moieties of betanin after hydrolysis show a disproportionate incorporation between the cyclodopa glucoside and the betalamic acid components. Dopamine is identified as an important metabolite in this root.

Experiments with cell cultures. By the initiation of *Beta vulgaris* L. cell cultures in suspension, with a high betanin content, we were able to proceed with biosynthetic studies. This permitted us to further understand the individual role played by the precursors tyrosine and dopa during the compartmentation of the metabolism when synthesizing CDG and betanin.

In order to perform the biosynthetic studies, standardized cell culture conditions were developed along with optimal incubation conditions using radioactive precursors. An analytical method able to separate all of the metabolites in a single HPLC run, using multiple wavelength detection and continuous measurements of radioactivity was developed as well. The radioactive metabolites that were identified in the cell culture extracts are: tyrosine, dopa, dopamine (the major metabolite), tyramine, CDG and betanin.

The results of a 3 hr incorporation kinetic experiment have confirmed that CDG is a true biosynthetic intermediate with a more rapid incorporation coming from ^{14}C -tyrosine than from ^{14}C -dopa. By using a mathematical model to simulate the metabolite's flows between the compartments, our experimental data leads us to propose two metabolically distinct reservoirs for dopa as an explanation of this unbalanced incorporation into CDG and betanin.

For the compartmentation studies, shorter incorporation times (20, 30 and 60 min) have been used, with stationary experimental conditions, in order to guarantee a linear internalisation of precursors over time.

Simultaneous incubation of cultures with ^3H -tyrosine and ^{14}C -dopa using fewer cells shows up a preferential incorporation of tyrosine in CDG with a CDG- $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio larger than the dopa- $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio.

Competition experiments performed in the presence of the two precursors, given simultaneously with equi molar amounts, alternatively labelled with ^{14}C and non-radioactive, have demonstrated a preferential ^{14}C -tyrosine incorporation into CDG and in the dihydroindole-part of betanin. Non-radioactive tyrosine interferes with the internalisation of ^{14}C -dopa, hence reinforcing our hypothesis of two metabolically distinct dopa compartments: dopa(1) providing a preferential access to CDG and dopa(2) in majority feeding the dopamine and betalamic acid reservoirs.

Experiments made with a dopa-decarboxylase inhibitor, 2-(fluoromethyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-alanine (MFMD) confirm that the temporary accumulation of radioactive dopa does not have the same bioavailability for the synthesis of CDG and betalamic acid when generated from ^{14}C -tyrosine or ^{14}C -dopa administered to the cells.

A metabolically simplified cellular model is proposed, strengthened by the experimental results showing two metabolically distinct dopa compartments: the dopa(1) compartment is fed by tyrosine and flows directly into CDG and the dopa(2) compartment fed from dopa(1) is the source of betalamic acid and dopamine. CDG and betalamic acid coming from these two different metabolic processes are assembled by condensation to give the betanin that is found in the vacuolar compartment.

Curriculum vitae

Né à Englewood, New-Jersey, U.S.A., j'ai fréquenté toutes mes écoles en Suisse avec l'école primaire de Crissier, puis le collège secondaire de Lausanne. Ma formation préuniversitaire s'est achevée en 1976 par la maturité fédérale scientifique.

Intéressé par la biologie et la chimie, j'ai fait les certificats de chimie organique, de biochimie et de physiologie humaine, puis obtenu ma Licence en Sciences Naturelles à l'Université de Lausanne en 1980.

J'ai entrepris un travail de doctorat à l'Institut de Chimie Organique sous la direction du Professeur Hugo Wyler, puis du Professeur Manfred Mutter. La charge de responsable du service de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie Organique m'a été confiée de 1980 à 1985.

En 1986, j'ai obtenu un poste de scientifique en Recherche et Développement auprès d'une Société pharmaceutique genevoise OM PHARMA en pleine expansion.

Je suis marié et père de trois filles.

Saint-Prex, août 2001

Jacques Alain Bauer