

Marquage de protéines à l'aide de l'iode radioactif par une méthode électrochimique : effet de l'iodation progressive sur le comportement métabolique de la sérumalbumine humaine

Autor(en): Rosa, U. / Federighi, C. / Bianchi, R.

Objektyp: Article

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **21 (1965)**

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-307605>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

**Marquage de protéines à l'aide de l'iode radioactif par une
méthode électrochimique**
**Effet de l'iodation progressive sur le comportement métabolique
de la sérumalbumine humaine**

Par U. Rosa¹, R. Bianchi², C. Federighi², G. A. Scassellati¹ et L. Donato²,

Par ses propriétés radioactives favorables à la détection et à la mesure *in vivo*, l'iode 131 est le radio-élément de choix pour la préparation des protéines marquées. L'emploi des protéines marquées comme traceurs dans les études de métabolisme s'appuie sur l'hypothèse que les protéines marquées sont traitées par l'organisme d'une façon tout à fait identique aux protéines natives. C'est donc admettre que les effets chimiques provoqués par l'iodation n'ont aucune conséquence sur le destin métabolique de la molécule protéique. Bien que l'iode soit l'un des substituants les plus diffusés dans la chimie des protéines, et que les protéines iodées soient d'ores et déjà largement employées dans la recherche biologique, la question de savoir si l'iodation est réellement sans effet sur le comportement métabolique des protéines demeure toujours incertaine.

Pour essayer de résoudre ce problème, on peut adopter deux méthodes. L'une, qui est de comparer le métabolisme de la protéine iodée avec le métabolisme de la même protéine non iodée, mais marquée selon une méthode dont on connaît l'absence d'effets de dénaturation (p. ex. la biosynthèse avec S³⁵ ou C¹⁴). Ce procédé, fort séduisant à première vue, se heurte à des difficultés techniques considérables et à des risques de «réutilisation» du traceur, qui peuvent fausser totalement les résultats.

L'autre méthode consiste à détecter les phénomènes chimiques associés à l'iodation. L'effet de dénaturation provoqué par de tels phénomènes croît en fonction du taux d'iodation de la protéine, c'est-à-dire avec la quantité d'iode réagissant avec la protéine. Si le taux d'iodation et les phénomènes chimiques associés sont évalués en fonction du comportement métabolique de la protéine, on peut établir à la suite de quels

¹ Centro di Ricerche Nucleari (SORIN), Saluggia (VC), Italia.

² Centro di Medicina Nucleare dell'Università, Pisa, Italia.

phénomènes le métabolisme de la protéine est notablement modifié. On ne pourra donc préparer un traceur protéique efficace, que si les facteurs qui provoquent ces modifications sont minimisés, au cours du marquage.

En suivant cette voie, nous avons étudié l'effet de l'iodation progressive sur le comportement métabolique de la sérumalbumine humaine. Cette communication relate les premiers résultats de nos études.

L'iode élémentaire peut agir sur les résidus d'acides aminés qui constituent la sérumalbumine de deux façons principales: oxydation des résidus de cystéine et parfois de tryptophane d'une part; substitution d'atomes d'hydrogène d'autre part. Ce dernier phénomène ne concerne, dans les conditions habituelles de marquage, que les noyaux aromatiques des groupes de tyrosine.

Les conséquences prévisibles de substitution sont: changement des propriétés chimiques du groupe, qui porte maintenant les atomes d'iode et effets sur les groupes environnants.

Puisqu'il semble prouvé que la réactivité vis-à-vis de l'iode, dans la molécule de la sérumalbumine, est la même pour un certain nombre de groupes de tyrosine (6 sur 18 [1]), on peut supposer que, pour un taux d'iodation réduit, les atomes d'iode sont probablement distribués au hasard parmi ces six groupes de tyrosine. On ne peut pas exclure, d'ailleurs, que certains groupes de tyrosine soient localisés de façon à influencer plus que les autres sur les propriétés biologiques de la protéine à la suite de l'iodation. On peut prévoir par là que la protéine iodée pourrait ne pas montrer une réactivité métabolique égale dans les différentes molécules. Même, si l'on suppose que, pour un taux d'iodation moyen égal à l'unité, toutes les molécules protéiques soient mono-iodées, il ne s'ensuit pas nécessairement que le comportement métabolique soit uniforme, puisque la substitution pourrait avoir été réalisée dans des groupes de tyrosine non «équivalents».

L'effet de la substitution est, en outre, encore plus compliqué, si l'on considère que, du fait d'une plus grande réactivité des groupes de tyrosine mono-iodés vis-à-vis de l'iode, la formation de noyaux di-iodés est possible, même pour des taux d'iodation inférieurs à l'unité. Les noyaux di-iodés donnent lieu, probablement, à une interférence accrue vis-à-vis des groupements contigus.

La cinétique de l'oxydation des groupes de cystéine est compliquée, du fait que ces groupes ont, dans la molécule de l'albumine, une situation très particulière. On sait [2, 3] que l'albumine ne montre pas une distribution homogène des groupes SH: une partie de ces groupes, 68% environ, est douée de réactivité immédiate vis-à-vis de certains réactifs spécifiques; le reste ne pouvant réagir qu'après un traitement de la protéine par certains réactifs de dénaturation.

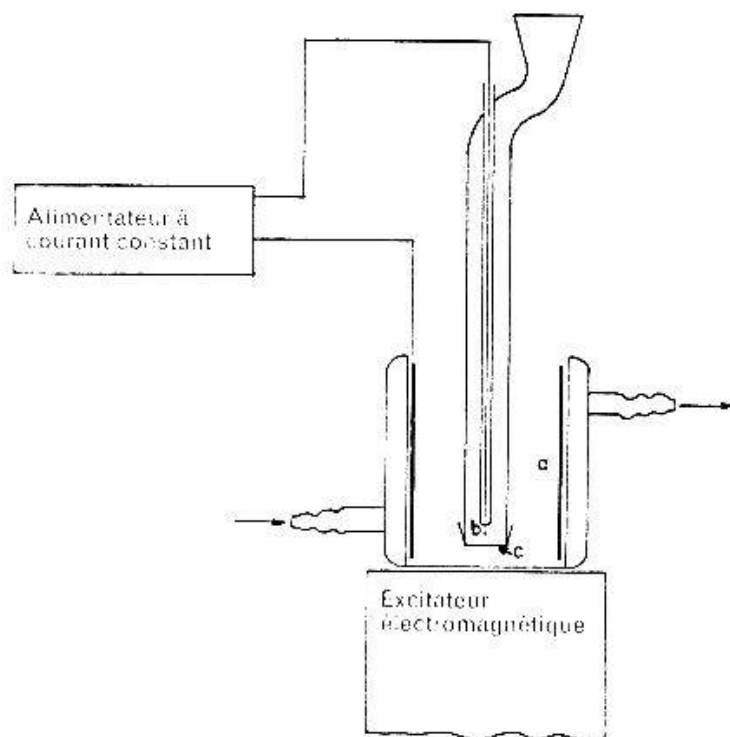


Fig. 1. Représentation schématique de la cellule d'électrolyse pour l'iodation de la sérumalbumine humaine. — a) anode, b) cathode, c) membrane de dialyse.

Une autre complication est provoquée par la méthode chimique adoptée pour l'iodation; celle-ci est, en effet, réalisée en transformant l'iodure marqué en iode libre à l'aide d'un agent d'oxydation convenable, et cela, le plus souvent, dans une solution qui contient déjà la sérumalbumine [4-6]. Ce mode d'opération risque de provoquer deux effets, que l'on ne sait pas toujours minimiser: l'agent d'oxydation peut réagir sur la protéine: la libération subite et non contrôlée de l'iode ne va pas, probablement, être favorable à une iodation homogène et reproductible.

Pour éviter, au moins partiellement, ces défauts, nous avons employé pour nos expériences, une méthode de marquage par électrolyse, déjà décrite dans des travaux précédents [7, 8]. La méthode consiste à électrolyser, dans une cellule spéciale, une solution de sérumalbumine et d'iodure de potassium marqué au I^{131} . L'iode libre se forme dans la solution par décharge des ions iodures à l'anode. La vitesse de formation de l'iode élémentaire peut être réglée par le courant qui circule dans le circuit d'électrolyse. On évite ainsi la présence d'agents oxydants, et la méthode est tout à fait appropriée à l'étude de l'iodation progressive de la sérumalbumine dans des conditions contrôlées et reproductibles.

Description de la méthode de marquage

La cellule d'électrolyse (fig. 1) a une capacité de 15 ml environ. L'anode est une feuille en platine lisse (13 cm²): la cathode est un fil en platine et la séparation de la zone catho-

dique de la zone anodique est assurée par une membrane de dialyse. Dans la zone anodique, on introduit la sérualbumine dissoute dans une solution aqueuse de NaCl à 0,9%. La solution contient également l'iodure de potassium marqué à l' I^{131} (volume total 10 ml). Dans la zone cathodique, on introduit 1 ml de la solution de NaCl. On agite pendant l'électrolyse la solution, et on réfrigère à 10 °C. La cellule est alimentée par un courant constant par un coulombomètre, à une valeur comprise entre 0,1 et 5 mA.

Mesure du taux d'iodation

Le taux d'iodation de l'albumine (nombre d'atomes d'iode liés en moyenne par molécule de protéine) est mesuré par radio-électrophorèse sur papier. L'analyse est effectuée directement sur la solution de la protéine à la fin du marquage.

Mesure des groupes de tyrosine mono- et di-iodés

Après dialyse prolongée au contact d'une solution physiologique pour éliminer l'iode élémentaire et ionique, l'albumine est soumise à une hydrolyse enzymatique par traitement à la pepsine en ampoule fermée à 37 °C.

Le produit de l'hydrolyse est analysé par chromatographie sur papier (n-butanol, acide acétique 2N).

Mesure des groupes -SH

Les groupes -SH de la sérualbumine sont titrés par ampérométrie [9]. Dans chaque échantillon analysé, on dose les groupes -SH «réactifs» par titrage, avec une solution de $AgNO_3$, de la protéine dissoute dans une solution de tris tamponnée à pH 7. On ajoute ensuite de l'urée, jusqu'à une concentration finale de 8 M; les groupes -SH devenus disponibles sous l'effet du réactif sont à leur tour titrés par $AgNO_3$.

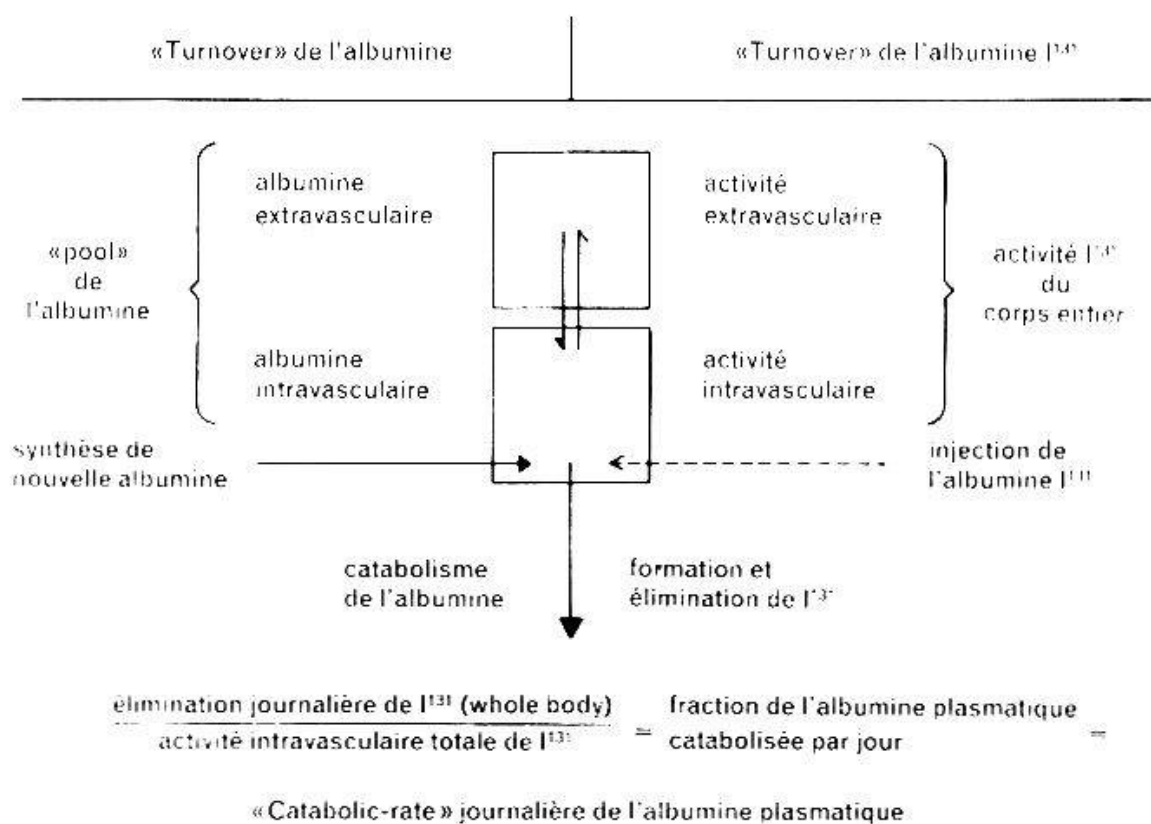


Fig. 2. Représentation schématique du procédé durant la mesure du «catabolic-rate» des préparations de sérualbumine iodée.

L'iode ne peut provoquer d'interférence dans le titrage que s'il est présent sous forme inorganique, mais aucun des traitements décrits ne peut désioder la protéine.

Mesure du «catabolic rate» de la protéine

Pour mesurer les caractéristiques métaboliques des différentes préparations d'albumine iodée, on a effectué la mesure du «catabolic rate» par la méthode indiquée à la figure 2. Après administration, par injection, de l'albumine marquée dans un sujet sain, on mesure l'activité totale éliminée chaque jour, soit dans les urines, soit en mesurant l'activité résiduelle de l'organisme entier, à l'aide d'un «total body counter». En divisant l'activité éliminée chaque jour par l'activité moyenne liée aux protéines plasmatiques dans le même jour, on calcule la fraction d'albumine plasmatique métabolisée par jour: c'est le «fractional catabolic rate».

La mesure du «catabolic rate» d'une préparation d'albumine iodée peut donner deux types d'information sur l'allure du métabolisme de la protéine. Une valeur constante du «catabolic rate» pendant toute l'expérience (6 jours) indique que la protéine est traitée par l'organisme d'une façon homogène.

Ce résultat peut signifier que la protéine n'a pas été endommagée pendant l'iodation, ou bien que le dommage, s'il y en a, a affecté en moyenne au même degré toutes les molécules protéiques. Ce type d'information, bien que d'importance considérable, n'est pas suffisant pour conclure que la protéine iodée a le même comportement que la protéine native. Une information différente peut être obtenue par la comparaison du «catabolic rate» de diverses préparations homogènes d'albumine iodée. La préparation la moins altérée sera, dans ce cas, celle qui a la plus petite valeur du «catabolic rate».

Résultats et conclusions

Dans le tableau 1, on voit en fonction du degré d'iodation, les résultats des différentes mesures effectuées sur l'albumine, à savoir:

- le pourcentage, par rapport aux valeurs correspondantes de l'albumine native, des groupes -SH réactifs (indiqués comme groupes «extérieurs») et non réactifs (indiqués comme groupes «intérieurs») titrables dans l'albumine iodée;
- la distribution de l'iode combiné à la protéine sous forme de groupes de tyrosine mono- et di-iodés.

Comme on le remarque dans le tableau 1, les groupes -SH «réactifs» et titrables immédiatement dans la protéine native sans emploi de produits dénaturants, sont les premiers à être engagés par l'iode élémentaire, probablement pour donner formation à des ponts -S-S-. Cette interprétation est confirmée par le fait que, si l'on titre la protéine iodée dissoute en tampon «tris» en présence de sulfite, on retrouve une quantité de groupes «SH» égale à la quantité contenue dans albumine native. Il est bien connu, que dans ces conditions en absence d'urée, le sulfite devrait ouvrir seulement les ponts -S-S- intermoléculaires. Ces ponts n'existent pas dans l'albumine native, et ne peuvent provenir que de l'oxydation des groupes -SH.

Tandis que les groupes -SH «extérieurs» sont tout de suite engagés par l'iode et oxydés, les groupes -SH «intérieurs» sont oxydés plus len-

Tableau I

Degré d'iodation moyen (atomes d'iode par molécule de protéine)	Groupes -SH titrables (pourcentage par rapport à l'albumine native)		Distribution de l'iode, comme MIT ou DIT (pourcentage par rapport à l'iode total comb.)	
	SH extérieurs en %	SH intérieurs en %	MIT*	DIT**
0	96 ± 3,5	100 ± 4,5	0	0
0,05	48 ± 2,7	88 ± 7,5	97	3,0
0,20	4 ± 3,6	66 ± 5,4	91,9	8,1
0,50	non mesurables	54 ± 5,1	78,9	21,1
0,91	idem	49 ± 5,0	90,5	9,5
1,52	idem	42 ± 4,5	87,5	12,5
2,10	idem	47 ± 4,5	76,2	23,8
3,01	idem	37 ± 4,0	64,3	35,7
4,00	idem	34 ± 4,0	52,4	47,6
6,10	idem	41 ± 4,8	45,8	54,2

* mesuré

** calculé par différence

tement. A partir d'un taux d'iodation d'environ 0,8, les groupes -SH «intérieurs» sont engagés encore plus lentement. Cela, probablement, du fait que ceux que l'on appelle -SH «intérieurs» appartiennent, à leur tour, à deux classes douées de réactivité différente envers l'iode élémentaire.

Bien qu'une interprétation correcte soit malaisée, cela pourrait signifier que, pour un taux d'iodation croissant, la protéine est de plus en plus dénaturée, de façon à sensibiliser à l'oxydation une partie des groupes -SH «intérieurs».

Il est intéressant aussi de remarquer la formation progressive des groupes de tyrosine di-iodés, au fur et à mesure que le taux d'iodation croît. Comme on le voit, une proportion non négligeable de groupes di-iodés est formée déjà à des taux d'iodation très réduits. Cela ne concorde pas avec l'affirmation d'autres auteurs [1], selon laquelle une proportion notable des groupes de tyrosine serait immédiatement accessible à l'iodation.

Il semble, par contre, qu'il n'y aurait qu'une proportion très réduite des groupes de tyrosine qui serait apte à réagir immédiatement.

Les résultats des mesures du «catabolic rate» pour des préparations différentes d'albumine iodée, sont indiqués dans les figures 3 et 4. Comme

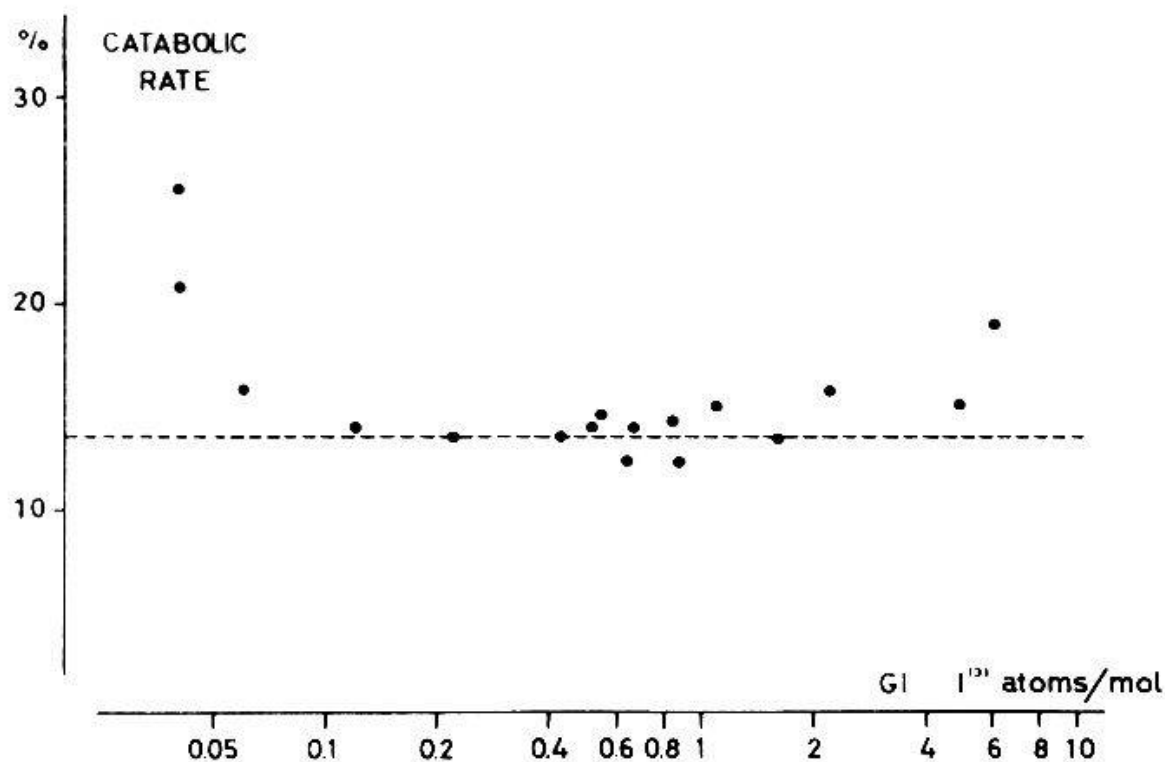


Fig. 3. Valeurs du «catabolic-rate» de préparations de sérumalbumine humaine marquée à l'iode 131, en fonction du degré moyen d'iodation GI.

on le voit, l'albumine iodée demeure homogène pour un taux d'iodation compris entre 0,2 et 4 (fig. 3). Dans cet intervalle, le «catabolic-rate» est constant pour un taux d'iodation compris entre 0,2 et 0,8. Pour des

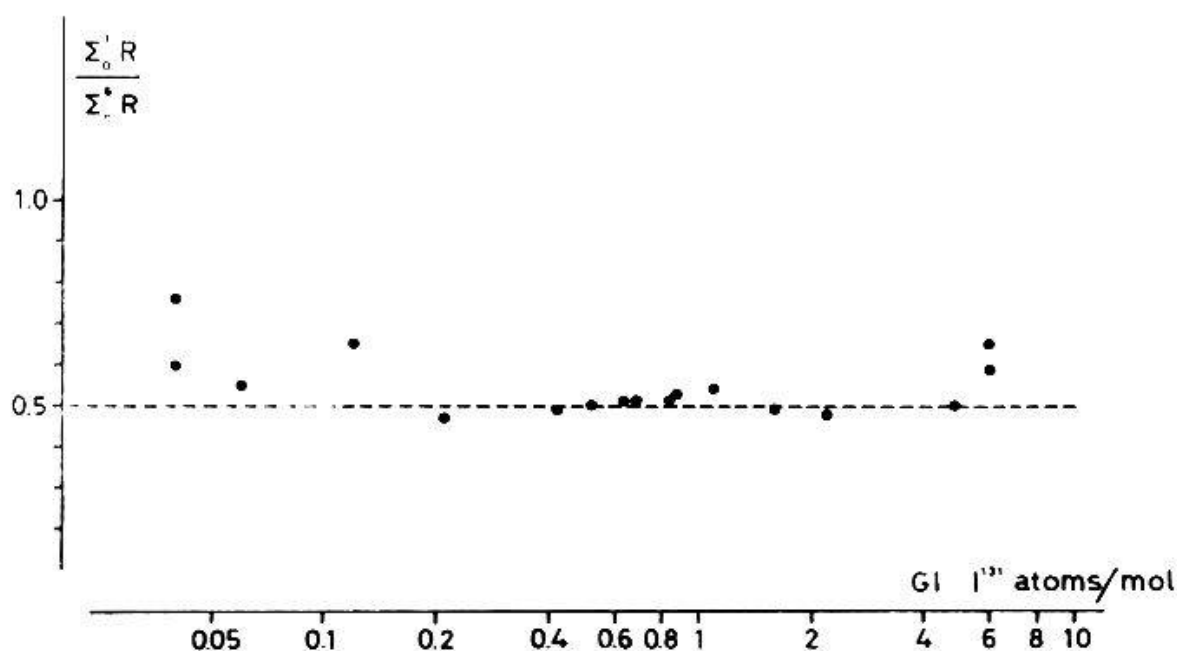


Fig. 4. Développement du rapport entre la somme des valeurs du «catabolic-rate» pendant les premiers trois jours de chaque expérience et la somme des valeurs relative à la durée totale de l'expérience \sum_0^6 en fonction du degré d'iodation GI. Le rapport \sum_0^3 vaut 0,5, quand la protéine est métabolisée d'une façon homogène.

valeurs plus élevées du taux d'iodation, le «catabolic rate» croît très rapidement. Pour un taux d'iodation plus grand que 5-6, l'albumine devient hétérogène, et le «catabolic rate» ne saurait plus être considéré comme un indice de dénaturation valable.

A ce stade de notre travail expérimental, il est malaisé de tirer des conclusions définitives. Nous sommes maintenant en train de multiplier les mesures chimiques aussi bien que biologiques, pour les valeurs critiques des différents paramètres.

On peut toutefois, croyons-nous, tirer quelques conclusions préliminaires. Il semble donc que le changement du comportement métabolique de l'albumine occasionné par l'iodation serait négligeable pour des taux peu élevés d'iodation, quitte à acquérir une importance croissante pour des valeurs croissantes du taux d'iodation. La protéine serait dénaturée alors que, par un effet de l'iodation croissante, un déroulement des chaînes moléculaires se produit.

Ce phénomène serait donc apparemment lié à l'iodation progressive des groupes de tyrosine localisés dans des positions moins accessibles de la molécule protéique. On remarque, en effet, que la réaction parallèle d'oxydation des groupes -SH «intérieurs» est relativement lente, même lorsque la quantité d'iode élémentaire, disponible pour la réaction, est largement excédente par rapport à la quantité qui est strictement nécessaire pour réagir avec tous les groupes -SH.

Ces résultats nous autorisent à estimer que la transformation de l'albumine native, avec métabolisme normal, à l'albumine iodée dénaturée est progressive. Il s'ensuit de cette hypothèse que l'oxydation des groupes -SH extérieurs, seul phénomène à se vérifier rapidement, ne devrait pas avoir de conséquences importantes sur le métabolisme de l'albumine. Si cela est vrai, on devrait pouvoir affirmer que le «catabolic rate» de l'albumine avec un taux d'iodation de 0,2-0,8 est la valeur valable également pour l'albumine native.

Toutefois nous désirons encore augmenter le nombre de nos expériences, avant d'avancer une affirmation pouvant revêtir un caractère de certitude.

Résumé

Les résultats préliminaires d'une étude sur le comportement métabolique de la sérumalbumine humaine marquée à l'I¹³¹ en fonction du degré d'iodation, sont exposés.

Les effets chimiques provoqués par l'iodation de l'albumine sont principalement la substitution progressive de l'iode dans les résidus de la tyrosine, avec formation de groupes mono- et di-iodés, et l'oxydation

des groupes -SH. Le premier effet est mis en évidence par hydrolyse enzymatique de la protéine iodée, suivie d'une analyse par chromatographie et détermination de la mono-iodo- et de la di-iodo-tyrosine formées. L'oxydation des groupes -SH est mesurée par titrage ampérométrique. Le marquage est effectué par une méthode électrochimique, assurant l'iodation progressive de l'albumine en conditions reproductibles.

Les premiers résultats semblent prouver que l'oxydation progressive des groupes -SH n'influence pas le comportement métabolique de la sérumalbumine, qui se modifie substantiellement quand le taux de iodation devient supérieur à 6.

Zusammenfassung

Der Grad der Jodination eines mit I^{131} markierten Proteins wird mit dessen Stoffwechselverhalten in Beziehung gesetzt.

Durch die Jodination des Albumins kommt es hauptsächlich zu zwei chemischen Veränderungen: Eine zunehmende Substitution des Jodes in den Tyrosingruppen mit Bildung von mono- und diiod-substituierten Derivaten und eine progressive Oxydation der -SH-Gruppen. Der erste Effekt wurde anhand einer vollständigen enzymatischen Hydrolyse mit nachfolgender chromatographischer Analyse gezeigt. Zum Nachweis des zweiten Effekts titrierte man amperometrisch die nach der Jodination im Albumin noch vorliegenden-SH-Gruppen.

Die Markierung des Proteins wurde mit einer elektrochemischen Methode durchgeführt, welche die fortschreitende Jodination des Albumins unter reproduzierbaren Bedingungen gewährleistete.

Die Ergebnisse der Versuche scheinen zu beweisen, daß die fortschreitende Jodination (Oxydation) der -SH-Gruppen das Stoffwechselverhalten des Serumalbumins nicht beeinflußt. Dieses ändert sich jedoch deutlich, sobald der Jodinationsgrad (Jodatome pro Proteinmolekül) 6 übersteigt.

Riassunto

Vengono riferiti i risultati preliminari di uno studio che ha per scopo di stabilire una correlazione tra il comportamento metabolico della sieralbumina umana marcata con I^{131} ed il grado di iodurazione.

Le modificazioni chimiche indotte nell'albumina dalla iodurazione, sono la progressiva iodurazione dei residui di tirosina, con formazione di gruppi mono- e di-iodati, e l'ossidazione dei gruppi -SH. Il primo effetto viene investigato sottoponendo la proteina iodata ad idrolisi enzimatica totale seguita da analisi cromatografica dell'idrolizzato e

successiva determinazione della mono-iodo e di-iodo tirosina formatasi. Il secondo effetto viene seguito mediante titolazione amperometrica dei gruppi -SH contenuti nell'albumina dopo iodurazione. La marcatura della proteina viene eseguita mediante un metodo elettrochimico, che consente la iodurazione della albumina in condizioni riproducibili.

I risultati sperimentali sembrano provare che la progressiva iodurazione dei gruppi -SH non influenza il comportamento metabolico della sieralbumina, che risulta invece essere sostanzialmente modificato quando il grado di iodurazione (atomi di iodo per molecola di proteina) diviene superiore a 6.

Summary

Preliminary results about a study on the correlation between the iodination degree and the metabolic behaviour of I^{131} labelled human serum albumin are reported.

The chemical modifications induced into the protein by the iodination are chiefly the formation of mono- and di-iodinated tyrosine residues and the progressive iodination of -SH groups. The former effect is put in evidence by total hydrolysis of the iodinated protein followed by chromatographic analysis of the hydrolysate, the latter by amperometric titration of the -SH groups. The protein labelling is carried out by an electrolytic method, which allows the protein to be iodinated in reproducible conditions.

The experimental results seem to prove that the progressive oxidation of -SH groups has no effect on the metabolic behaviour of the serum albumin, which appears on the contrary to be substantially modified when the iodination degree (iodine atoms per proteinc molecule) is higher then 6.

1. *Li C. H.*: J. Amer. chem. Soc. 67, 1065 (1945). 2. *Benesch R. et Benesch R. E.*: Arch. Biochem. 19, 35 (1948). 3. *Jensen E. V.*, in: Sulphur in Proteins, 75, 88. Academic Press, New York 1959. - 4. *Francis G. E. et Mulligan W.*: Nature (Lond.) 167, 148 (1951). - 5. *Hunter W. M. et Greenwood F. C.*: Nature (Lond.) 194, 495 (1962). - 6. *MacFurlane A. S.*: Biochem. J. 62, 135 (1956). - 7. *Rosa U.*: Proc. Euratom Conf. Nov. 1963, EUR 1625e, 197. 8. *Rosa U., Donato L. et Pennisi F.*: Proc. Bad Gastein Conf. 245, 8 (1964). - 9. *Benesch R. E., Lardy A. et Benesch R.*: J. biol. Chem. 216, 663 (1955).

Discussion

A. S. McFurlane (London): In the slide relating to case 45 I thought I noticed an inconsistency, namely a constant or slightly increasing catabolic rate and a falling rate of elimination from the body. Did you give inactive iodine in the drinking water to block the thyroid?

We investigated ^{131}I albumins down to 0,1 atoms per molecule but failed to find—as you have confirmed—any evidence of denaturation. Could your finding below 0,1 atoms—that the catabolic rate increases rapidly—be due to a small degree of denaturation occurring at the electrode? When the supply of active iodine is limited the molecules or particles nearest the electrode may get most of it.

L. Donato (Pisa): Dr. McFarlane, the answer to your question concerning case 45 is a very simple one. All the curves are plotted on linear paper: this accounts for their decreasing slopes. Evidently you thought that the curves were plotted on semilog paper, and in that case your objection would have been valid.

R. A. Collet (Genève): Lors d'un récent colloque de l'Agence Atomique Internationale, *Blaedel et Evenson* [1] ont présenté une technique de marquage des acides aminés, qui présente certaines analogies avec la méthode que vous venez de décrire. Dans le travail mentionné, l'indicateur radioactif (le cobalt-58, sous forme bivalente) est fixé sur le groupe $-\text{NH}_2$ de l'acide aminé par oxydation anodique. Ce complexe ne serait pas labile.

Questions: a) Pensez-vous que cette méthode pourrait être utilisée pour marquer des protéines? Le cobalt-58 a une période de 71 jours (classe 3 des nucléides radioactifs): il émet, en outre, un rayonnement gamma de 0,8 Mev. Ces propriétés seraient assez favorables pour l'utilisation clinique de protéines marquées. On sait que la plupart des métaux sont transportés dans l'organisme sous forme de complexes protéiniques. Un complexe du type protéine-Co serait-il moins «physiologique» qu'une protéine iodée?

b) L'idée d'oxydation anodique que vous avez proposée est fort séduisante. Si des essais ultérieurs devaient montrer que cette méthode peut dans certaines conditions, dénaturer ou modifier les protéines marquées, pourrait-on envisager une «oxydation enzymatique» qui serait peut-être moins «traumatisante» et plus spécifique?

c) Avez-vous essayé votre méthode avec le brome 82?

I. Blaedel W. J. et Evenson M. A.: A continuous isotope derivative procedure with direct readout for amino acid. I.A.E.A. Symposium on Radiochemical Methods of Analysis. Salzburg, Oct. 1964.

H. Nitschmann (Bern): Was für Ausbeuten werden bei der elektrolytischen Methode der Albuminjodierung erreicht, und zwar in bezug auf das aktive Jod, das ja schließlich teuer bezahlt werden muß? Bei Einsatz von elementarem Jod ist die obere Grenze 50%, nur bei Jodidchlorid liegen die Werte höher.

Um jodierte Proteine auf allfällige Denaturierung zu prüfen, scheinen neben den üblichen physikochemischen Prüfungen vergleichende Messungen der Geschwindigkeit des proteolytischen Abbaues durch Proteasen geeignet. Solche Messungen dürften besonders am Platz sein, wo die Präparate für Turnover-Untersuchungen dienen sollen. Sind solche Messungen an Ihrem elektrolytisch jodierten Albumin gemacht worden?

U. Rosa (Saluggia):

Réponse aux questions de M. Collet:

a) je ne connais malheureusement pas la technique de marquage dont vous parlez. Le Co^{58} serait un très bon traceur des protéines, au point de vue nucléaire, mais je doute de la stabilité de la liaison Co-protéine «in vivo».

b) l'oxydation enzymatique est en principe possible, mais il est difficile de prévoir si cette méthode serait vraiment moins «traumatisante», étant donné que, «in vitro», la chimie du processus serait toujours la même.

c) en effet notre méthode a été conçue pour le marquage des protéines au Br^{82} (*U. Rosa et coll. I.A.E.A. «Symposium on the production and use of short lived radioisotopes from reactors», pag. 161, Vienna 1963).*

Réponse aux questions de M. Nitschmann

a) le rendement de marquage peut bien dépasser les 50%, si les iodures, provenant de la réaction entre l'iode élémentaire et l'albumine, sont à nouveau oxydés à l'anode. Dans

ce cas, la valeur limite correspondant à la stéchiométrie de la réaction entre l'iode et la tyrosine, n'est évidemment plus respectée: d'ailleurs le même résultat est obtenu par la méthode à l'hypochlorite, où l'oxydant est ajouté en excès en portions successives. Nous avons atteint les 90% de rendement de marquage.

b) je suis en plein accord avec vous que la mesure de la vitesse d'attaque enzymatique est très importante. Cela est prévu dans nos programmes de recherche.