

LE CYTOCHROME *c* MARQUE AU CHROME 51—I PRÉPARATION, ANALYSE ET DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE

JACQUES INGRAND

Département des Radioéléments, C.E.N. Saclay, France

(Received 2 August 1966; accepted 30 June 1966)

Abstract—Chromium has both a rather general affinity for proteins, and also the capacity to activate different enzymatic systems, including the cytochrome *c* succinic dehydrogenase system. These biochemical properties have been taken in account when choosing chromium 51 as a label for cytochrome *c*. Biological controls of the Cr⁵¹ labeled heteroprotein seem to have established the validity of the compound in metabolic studies.

BEINERT^{1, 2} avait signalé dès 1948 la possibilité de marquer le cytochrome *c* par biosynthèse à l'aide du fer 55, mais la portée pratique de la méthode proposée s'est trouvée restreinte du fait des difficultés techniques inhérentes à la biosynthèse.

Devant la réactivité importante *in vitro* du chrome 51 à l'égard des protides^{3 à 9} et, en particulier, de l'hémoglobine dont la structure est assez voisine de celle du cytochrome *c*, nous avons cherché à marquer le pigment respiratoire par ce radioisotope. Le choix du chrome nous a paru d'autant plus justifié que cet élément avait déjà été signalé comme capable d'activer un système enzymatique renfermant l'hétéroprotéide, le système cytochrome *c*-déshydrogénase succinique.¹⁰

A. PRÉPARATION DU CYTOCHROME *c* MARQUE AU CHROME 51

Au cours d'expériences préliminaires, nous avons pu constater que, dans certaines conditions de milieu, de pH et de température, le chrome 51 trivalent (sous forme de ⁵¹Cr Cl₃) était retenu à raison d'environ 50 % sur le cytochrome *c*. Dans des conditions expérimentales identiques, le chrome 51 hexavalent (à l'état de Na₂ ⁵¹Cr O₄) ne s'est fixé sur l'hétéroprotéide qu'en quantité négligeable.

Par la suite, nous avons adopté le mode opératoire suivant:

1. Marquage du cytochrome *c*

Dans un tube à centrifuger, sont introduits successivement:

Cytochrome <i>c</i> lyophilisé*	15 mg
Soluté isotonique NaCl	3 ml
⁵¹ Cr Cl ₃ † (15 µg de chrome)	150 µc

Le tube est laissé en incubation pendant 45 min à l'étuve à 37°.

* Nous remercions Monsieur Mansir, des Laboratoires DEBAT, qui a fourni le cytochrome *c* nécessaire pour la réalisation de ce travail. Ce produit est extrait du cœur de boeuf ou de cheval.

† Préparé par le Département des Radioéléments, C.E.N., Saclay.

2. *Isolement et purification du cytochrome c marqué*

Selon la technique de Keilin et Hartree,¹¹ du sulfate d'ammonium est introduit de façon à obtenir une concentration en ce sel de 450 mg/ml, puis 0,025 ml de solution d'acide trichloracétique à 20 % est ajouté par ml de la solution contenue dans le tube.

Après centrifugation, le culot de cytochrome *c* est lavé à deux reprises à l'aide d'une solution renfermant par litre 450 g de sulfate d'ammonium et 25 ml de solution d'acide trichloracétique à 20 %.

A l'issue de la dernière centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot dissous dans 3 ml d'eau distillée. Cette dernière solution est soumise à une dialyse à $+4^{\circ}$ dans un sac d'acétate de cellulose contre de l'eau distillée. La dialyse est poursuivie jusqu'à élimination totale des ions NH_4 , c'est à dire jusqu'à ce que la réaction de Nessler devienne négative.

Dans les conditions expérimentales définies plus haut, la proportion de chrome 51 trivalent fixé sur le cytochrome *c* a été trouvée voisine de 50 %.

B. ANALYSE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DU CYTOCHROME *c* MARQUE AU CHROME 51

Nous avons cherché à savoir si le traitement chimique subi par le cytochrome *c* au cours du marquage n'avait pas entraîné de modifications sensibles des propriétés de l'hétéroprotéide. Dans ce but, nous avons étudié, d'une part, la mobilité électrophorétique et, d'autre part, les propriétés métaboliques du cytochrome *c* radioactif.

1. *Analyse de la mobilité électrophorétique du cytochrome c marqué au chrome 51*

Les électrophorèses ont été réalisées sur papier Whatman 1, en tampon véronal de pH 8,6 et de force ionique 0,05.¹²

Véronal	1,84 g
Véronal sodique	10, 3 g
Eau distillée Q.S.P.	1000 ml

Pour une différence de potentiel de 10 V/cm, la migration a duré 4 h.

Après séchage, les bandes d'électrophorèse ont été apposées sur un film radiographique* en vue d'une localisation de la radioactivité, puis traitées par une solution saturée d'amido Schwartz dans du méthanol contenant 10 % d'acide acétique, en vue d'un repérage de la position du cytochrome *c*.

Le cytochrome *c* radioactif, de même que le cytochrome *c* témoin, parcourt une distance de 7 à 8 cm de direction de la cathode; la tache noire du film radiographique est superposable au spot bleu révélé par l'amidoschwartz.

2. *Etude des effets du cytochrome c marqué au chrome 51 sur la consommation d'oxygène du foie de rat*

Nous avons utilisé dans ce but la technique d'Umbreit¹³ et mesuré comparative-ment le volume d'oxygène consommé par le foie de Rat en présence de la même quantité de cytochrome *c* non marqué et de cytochrome *c* radioactif.

* Kodirex, de Kodak—Paris.

Le foie est prélevé chez des rats venant d'être sacrifiés: l'organe est homogénéisé dans l'eau distillée ajoutée à raison de 100 ml pour 5 g de foie. 0,2 ml d'homogénat est introduit dans l'espace annulaire de la fiole manométrique qui contient également:

Ascorbate de sodium 0,114 M (pH 7)	0,3 ml
Tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4)	1 ml
Eau distillée	0,5 ml

Le récipient central contient 0,2 ml de soude 2 N.

Dans la diverticule latéral est versé 1 ml de solution aqueuse contenant ou non le cytochrome *c*. La fiole est reliée au manomètre, portée dans le thermostat à 39° à la pression atmosphérique.

Dix minutes plus tard, on fait passer la solution contenant ou non le cytochrome dans le compartiment annulaire et l'incubation se poursuit pendant 1 h, pendant laquelle un système d'agitation mécanique assure l'homogénéisation de l'ensemble (rythme adopté: 80 oscillations par min).

Le Tableau 1 montre que la consommation d'oxygène dans le foie de rat en présence d'ascorbate de sodium est stimulée par le cytochrome *c* ordinaire et par le cytochrome *c* radioactif de manière similaire (la différence entre les moyennes n'est pas significative¹⁵).

TABLEAU 1. CONSOMMATION D'OXYGÈNE (μ l) D'UNE PRÉPARATION DE FOIE DE RAT EN PRÉSENCE D'ASCORBATE DE SODIUM

Sans addition	En présence de cytochrome <i>c</i>	
	Témoin	Radioactif
5,4	45	56
4,8	45	50
4,3	34	39
5,0	61	66
6,2	46	49
5,1 \pm 0,6	46,9 \pm 8,6	52 \pm 8,9

3. Etude de la distribution du cytochrome *c* marqué au chrome 51 à l'échelle cellulaire hépatique

Au cours d'expériences préliminaires chez la Souris, nous avons pu remarquer une concentration importante du pigment respiratoire dans le foie de l'animal. Nous avons cherché à connaître la localisation intracellulaire du cytochrome *c*, notamment au niveau des organites présentant une forte activité enzymatique respiratoire, les mitochondries.

Nous avons employé la méthode de Schneider et Hageboom¹⁴ qui permet par application de champs gravifiques croissants à une préparation de foie homogénéisé dans un tube de Potter de séparer les noyaux cellulaires, les mitochondries, les microsomes et les constituants cytoplasmiques.

Les organes analysés ont été prélevés chez la Souris quatre jours après injection de 3 mg de cytochrome *c* radioactif.

Deux lots d'animaux témoins ont reçu l'un du chlorure de radiochrome ⁵¹Cr Cl₃, l'autre des protéines hétérologues (lapin) marquées également au chrome 51.

Les animaux ont été sacrifiés par décapitation. Après prélèvement, le foie a été lavé à l'aide d'une solution de saccharose 0,88 M et homogénéisé à basse température dans un tube de Potter avec un volume de solution de saccharose suffisant pour obtenir 10 ml d'homogénat. La radioactivité de ce dernier a été mesurée à l'aide d'une partie aliquote de 1 ml. La pulpe hépatique a subi deux centrifugations successives à 700, puis à 24,000 g dans un appareil réfrigéré.

Les culots comprenaient respectivement les noyaux cellulaires et les mitochondries, le dernier surnageant renfermait les microsomes et les protéines cytoplasmiques. La radioactivité de ces différentes fractions a été comparée à la radioactivité totale de l'homogénat.

Les résultats concernant la distribution de la radioactivité dans les fractions cellulaires du foie de Souris après injection de cytochrome *c* et des deux préparations témoins sont rassemblés dans le Tableau 2.

TABLEAU 2.

Fraction cellulaire	Cytochrome <i>c</i>	Chlorure chromique	Protéines hétérologues
Noyaux et cellules non détruites	29,0 (\pm 5,6)	26,8 (\pm 3,5)	65,3 (\pm 10,6)
Mitochondries	51,0* (\pm 2,6)	39,1* (\pm 4)	21,3* (\pm 9)
Reste	20,2 (\pm 4,9)	33,6 (\pm 2,5)	13,1 (\pm 1,9)

* La différence entre la moyenne obtenue avec le cytochrome *c* et la moyenne obtenue avec l'une ou l'autre des préparations témoins est significative.¹⁵

DISCUSSION

L'affinité du chrome trivalent n'est pas limitée aux seuls protides d'origine sanguine, hémoglobine et protéines plasmatiques. La quantité d'isotope fixé sur le cytochrome *c* est assez importante puisqu'elle atteint environ 50 % de la quantité totale introduite dans le milieu de réaction; cette incorporation n'entraîne pas de modifications de la mobilité électrophorétique, ni des effets *in vitro* du composé sur la respiration cellulaire; en outre le chromoprotéide marqué s'accumule *in vivo* de façon significative dans les mitochondries hépatiques.

Tous ces éléments militent en faveur de la validité du marquage du pigment respiratoire par le radioisotope et soulignent l'intérêt éventuel de l'emploi du cytochrome *c* marqué par le chrome 51 au cours de diverses études métaboliques.

REFERENCES

1. H. BEINERT et H. MAIER-LEIBNITZ, *Science*, N.Y. **108**, 634 (1948).
2. H. BEINERT, *Science*, N.Y. **111**, 469 (1950).
3. S. J. GRAY et K. STERLING, *J. clin. Invest.* **29**, 1604 (1950).
4. H. FRANK et S. J. GRAY, *J. clin. Invest.* **32**, 991 (1953).
5. T. A. WALDMANN, *Lancet* **2**, 121 (1961).
6. Y. COHEN, J. WEPIERRE et D. PONTY, *Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung*, Band VI, p. 273. Urban und Schwarzenberg, München (1964).
7. J. INGRAND, rapport C.E.A. (Fr.) R. 2585 (1964).
8. N. D. RITZ et H. RUBIN, *J. Lab. clin. Med.* **63**, 344 (1964).
9. A. F. BRAUDE, F. J. CAREY, D. SUTHERLAND et M. ZALESKY, *J. clin. Invest.* **34**, 850 (1955).

10. B. L. HORECKER et T. R. HOGNESS, *J. biol. Chem.* **128**, 251 (1938).
11. D. KEILIN et E. F. HARTREE, *Biochem. J.* **39**, 289 (1945).
12. R. J. BLOCK, E. L. DURRUM et G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, p. 406. Academic Press, New York (1955).
13. W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS et J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, p. 139. Burgess, Minneapolis (1949).
14. W. C. SCHNEIDER et G. H. HAGEBOOM, *J. biol. Chem.* **183**, 123 (1950).
15. M. LAMOTTE, *Initiation aux Méthodes Statistiques en Biologie*, p. 79. Masson, Paris (1957).