

LE CYTOCHROME *c* MARQUE AU CHROME 51—II

RÉPARTITION COMPARÉE CHEZ LA SOURIS DU CYTOCHROME *c* ET DES PROTÉINES PLASMATIQUES MARQUÉS AU CHROME 51

JACQUES INGRAND

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

(Received 10 June 1966; accepted 30 June 1966)

Abstract—Exogenous cytochrome *c*, extracted from beef or horse heart, is sometimes used in men as an adjuvant in cancer therapy. Its metabolism in the mouse has been studied after intravenous injection of the ^{51}Cr labelled compound. Kidneys and liver accumulate the label, which exhibits no special affinity for the myocardium, muscles and brain. This localization differed from the partition observed with the aid of homologous and heterologous plasma proteins. The identity of metabolic pathway of the *in vitro* ^{51}Cr labelled cytochrome *c* and its biosynthetically ^{55}Fe labelled analog must be pointed out. The simplicity of the methods employing ^{51}Cr is an important reason for the use of this radioisotope as a label for proteins and particularly for biologically active proteins.

Le CYTOCHROME *c*, extrait du coeur de boeuf ou de cheval, a été utilisé chez l'homme comme médicament adjuvant au cours de divers traitements anticancéreux.^{1, 2} Comme fondement biochimique de cette thérapeutique, il a été suggéré une correction par le pigment respiratoire des anomalies enzymatiques de la cellule tumorale.^{3, 4}

La pénétration du composé dans les cellules, mise en évidence *in vitro* sur des cultures,³ a été également observée chez l'animal entier par Beinert⁵ à l'aide de cytochrome *c* isologue marqué par biosynthèse au fer 55.

Dans ces conditions, il nous a paru intéressant de connaître la répartition du cytochrome *c* hétérologue marqué *in vitro* au chrome 51 selon une méthode décrite dans une note précédente.⁶

La spécificité des résultats a été vérifiée par comparaison du comportement du pigment respiratoire avec celui du chlorure chromique et de protéines hétérologues (les protéines plasmatiques de lapin), marqués également au chrome 51.

TECHNIQUES

Le cytochrome *c* marqué a présenté une activité spécifique comprise entre 6 et 60 mc par millimole (0,44 à 4,4 $\mu\text{c}/\text{mg}$); le chlorure de radiochrome de très haute pureté radiochimique renfermait de son côté 10 mc par mg de chrome élément.

Les protéines hétérologues ont été marquées de la façon suivante: à 2 ml de sérum de lapin, nous avons ajouté 50 μc de $^{51}\text{CrCl}_3$ et nous avons laissé le mélange à 37° pendant 45 min; le chrome trivalent n'ayant pas réagi a été éliminé par dialyses répétées à + 4° dans des sacs d'acétate de cellulose immergés dans l'eau distillée.

L'expérimentation a porté sur 46 souris, mâles et femelles, de la souche R.A.P. Gif, d'un poids voisin de 20 g au moment de l'injection intraveineuse. Les animaux

ont reçu 0,5 ml de solution isotonique de NaCl contenant environ $5 \mu\text{c}$ de chrome 51, ce qui correspondait, selon la préparation, à 3 mg de cytochrome *c*, à $0,05 \mu\text{g}$ de chrome trivalent ou à 0,2 ml de plasma de Lapin. Les animaux ont été sacrifiés aux temps de 4 h, 4 et 7 jours. Le nombre d'animaux tués pour chacun des temps a été respectivement de 5, 13 et 3 pour le cytochrome *c*, de 3,7 et 3 pour le chrome trivalent et de 3,6 et 3 pour les protéines plasmatiques hétérologues.

Nous avons pu constater au cours des premières expériences que le foie et les reins étaient les seuls organes à présenter une radioactivité spécifique nettement supérieure à la moyenne; compte tenu du rôle important joué par la rate dans les processus de catabolisme protéique, nous avons par la suite prélevé cet organe en plus des deux organes cités ci-dessus, en vue d'y comparer la répartition de la radioactivité après l'injection des trois substrats marqués au chrome 51.

Nous avons en outre effectué différents essais d'extraction du pigment radioactif dans le foie et dans les reins à l'aide des techniques de Keilin et Hartree,⁷ d'une part, et de Hagihara *et al.*,⁸ d'autre part.

RESULTATS

Les résultats de la distribution dans les différents organes de la Souris du cytochrome *c* et des deux préparations témoins marquées au chrome 51 sont exprimés sous la forme d'une moyenne affectée de l'écart type (Tableau 1).

TABLEAU 1. RÉPARTITION COMPARÉE DANS LE FOIE, LES REINS ET LA RATE DE LA RADIOACTIVITÉ APRES INJECTION INTRA VEINEUSE LA SOURIS DE CYTOCHROME *c*, DE CHLORURE CHROMIQUE ET DE PROTÉINES HÉTÉROLOGUES MARQUÉS AU CHROME 51

Temps de sacrifice	Cytochrome <i>c</i>			Chlorure chromique			Protéines plasmatiques de lapin		
	Foie	Reins	Rate	Foie	Reins	Rate	Foie	Reins	Rate
4 heures	17,8 ($\pm 3,7$)	16,3 ($\pm 0,6$)	0,1	16,1 ($\pm 3,2$)	1,4 ($\pm 0,2$)	1,5 ($\pm 0,2$)	18,6 ($\pm 2,9$)	2,0 ($\pm 0,4$)	2,0 ($\pm 0,1$)
4 jours	18,4 ($\pm 1,8$)	5,2 ($\pm 2,1$)	0,6 ($\pm 0,1$)	19,3 ($\pm 4,3$)	1,2 ($\pm 0,1$)	1,5 ($\pm 0,2$)	23,6 ($\pm 4,2$)	1,3 ($\pm 0,1$)	1,7 ($\pm 0,1$)
7 jours	10,6 ($\pm 5,7$)	7,4 ($\pm 2,4$)	0,7 ($\pm 0,1$)	36,7 ($\pm 2,5$)	1,1 ($\pm 0,1$)	5,5 ($\pm 0,6$)	26,1 ($\pm 4,5$)	2,2 ($\pm 0,1$)	1,6 ($\pm 0,1$)

Chiffres exprimés en pourcentage de la radioactivité corporelle totale.

Le foie contient à la 4ème h 17,8 % du cytochrome *c*; cette proportion tombe à 10,6 % le 7ème jour. Dans le cas des préparations témoins, la proportion passe de 16,1 à 36,7 % (chlorure chromique) et de 18,6 à 26,1 % (protéines plasmatiques de Lapin).

Les reins renferment à la 4ème h jusqu'à 16,3 % de la radioactivité corporelle totale; cette teneur relative diminue lentement par la suite (7,4 % au 7ème jour). Par contre,

à tout moment, ces organes ne retiennent jamais plus de 2,2 % de la radioactivité lorsqu'il s'agit du chlorure chromique et des protéines hétérologues.

Le pourcentage de chrome 51 dans la rate après injection de cytochrome *c* radioactif reste inférieur à 0,7 % le 7^{ème} jour; il s'élève, pour un même temps de sacrifice, à 1,6 % pour les protéines hétérologues et à 5,5 % pour les chlorure chromique.

Les tentatives d'extraction du cytochrome *c* radioactif dans le foie et dans le rein à l'aide des méthodes usuelles^{7, 8} ont échoué et seule une très faible fraction du produit marqué a pu être isolée.

DISCUSSION

Les difficultés d'extraction du pigment exogène injecté ne sont pas observées uniquement avec le cytochrome *c* marqué au chrome; elles ont été rencontrées également par Beinert¹¹ avec le même produit marqué par biosynthèse au fer 55 puisque dans ce cas 6 à 13 % seulement du pigment ont pu être récupérés après l'injection.

La raison de cet échec semble devoir être attribuée à la labilité *in vivo* du cytochrome *c*-⁵¹Cr ou ⁵⁵Fe. Cette labilité, commune par ailleurs à de nombreuses molécules protéiques marquées par l'adjonction d'un atome radioactif (y compris l'iode 131) présente un inconvénient certain dont il faut tenir compte lors de l'utilisation de tels composés.

En l'absence d'une preuve formelle, l'identité du produit radioactif détecté et du cytochrome *c* apparaît toutefois comme vraisemblable si l'on tient compte de plusieurs observations fondamentales.

En premier lieu, le sort du chrome 51 lié au cytochrome *c* est différent à la fois de celui du chlorure de chrome ⁵¹Cr (connu pour se fixer rapidement *in vivo* sur les protéines plasmatiques^{9, 10}) et de celui de protéines sanguines hétérologues: le métabolisme du cytochrome ⁵¹Cr se signale par une accumulation dans le rein, une rétention moins durable dans le foie et une fixation négligeable dans la rate.

En second lieu, la répartition de l'hétéroprotéide marqué dans la portion protéique par le chrome 51 se révèle identique à celle du même composé marqué dans l'hème à l'aide du fer 55⁵: après administration parentérale au Rongeur, le cytochrome *c* s'accumule non pas dans les tissus qui sont les plus riches en pigment respiratoire de nature endogène (myocarde, muscles et cerveau¹¹), mais dans les reins et le foie. Compte-tenu de la similitude des résultats, des considérations d'ordre pratique militent en faveur du choix du chrome 51 pour le marquage de l'hétéroprotéine biologiquement active; en effet, la simplicité des méthodes de marquage à l'aide de ce radioisotope s'oppose à la complexité des techniques de biosynthèse à partir du fer radioactif.

BIBLIOGRAPHIE

1. M. MALBY, J. DUBARRY et G. CASSAGNE, *Archs Mal. Appar. dig.* n° 4 (1956).
2. B. GUILHAMON, Thèse Médecine Bordeaux (1956).
3. J. P. GREENSTEIN, *J. natn. Cancer. Inst.* 5, 55 (1944).
4. R. DERACHE, *Path. Biol., Paris* 1/2, 121 (1958).
5. H. BEINERT, *Science, N. Y.* 111, 469 (1950).
6. J. INGRAND, *Biochem. Pharmac.* 15, 1647 (1966).
7. D. KEILIN et E. F. HARTREE, *Biochem. J.* 39, 289 (1945).
8. B. HAGIHARA, I. MORIKAWA, I. SEZUKI et K. OKUNUKI, *J. Biochem. Japan* 45, 551 (1958).

9. L. KRAINTZ et R. V. TALMAGE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **81**, 490 (1952).
10. W. J. VISEK, I. B. WHITNEY, U. S. G. KUHN et C. L. COMAR, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **84**, 610 (1953).
11. H. WREGE, *Farmaco* **10**, 79 (1955).