

MARQUAGE A HAUTE ACTIVITE SPECIFIQUE PAR  $I^{25}$ I, RADIOLYSE ET CONSERVATION DU 3-5, 3'-5', TETRAIODO-L-TYROSYL-L-TYROSINE.

J.C. MAURIZIS, C. NICOLAS et J. MICHELOT

INSERM U 71, B.P. 184, rue Montalembert, 63005 CLERMONT-FERRAND et  
Laboratoire de Biophysique Médicale, Faculté de Médecine,  
28, place H. Dunant, 63001 CLERMONT-FERRAND CEDEX (FRANCE)

#### SUMMARY

This paper describes the labeling at high specific activity (1,000 - 1,200  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) by  $I^{25}$ I, the purification and the study of the storage conditions of 3-5, 3'-5', tetraiodo-l-tyrosyl-l-tyrosine.

#### RESUME

Nous décrivons le marquage à haute activité spécifique (1.000 - 1.200  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) par  $I^{25}$ I, la purification et l'étude des conditions de conservation du 3-5, 3'-5', tetraiodo-l-tyrosyl-l-tyrosine.

Mots clés : 3-5, 3'-5', tetraiodo-l-tyrosyl-l-tyrosine, iodination, conservation.

#### INTRODUCTION

Lors de travaux antérieurs, un groupe de chercheurs de notre laboratoire a pu mettre en évidence, sous certaines conditions d'hydrolyse, la présence dans la glande thyroïde d'un dipeptide iodé, le tétraiodo 3-5, 3'-5', l tyrosyl-l-tyrosine ( $I_2\text{Tyr}-I_2\text{Tyr}$ ) qui a été isolé et identifié à partir de la thyroglobuline bovine (1). Depuis l'hypothèse de Harrington, la diiodotyrosine

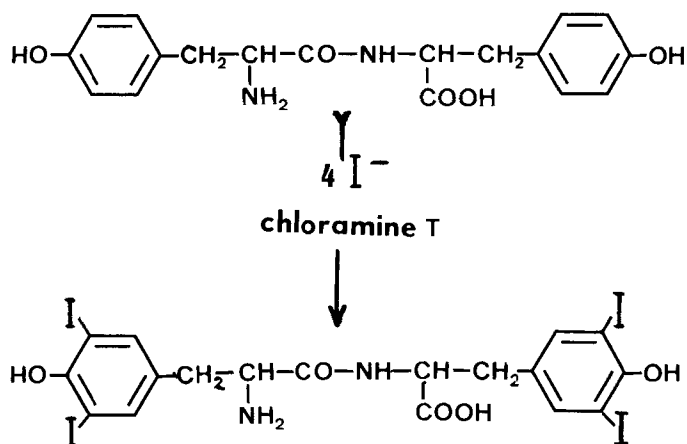
(I<sub>2</sub>Tyr) est considérée comme le précurseur de la thyroxine. Nous avons pensé que la séquence pourrait jouer un rôle dans la synthèse des hormones thyroïdiennes. En effet, nous avons pu montrer que ce dipeptide donnait lieu, *in vitro*, à la formation d'hormones thyroïdiennes par un mécanisme de synthèse différent de celui mettant en jeu la I<sub>2</sub>Tyr (2,3,4,5).

Par ailleurs la présence de ce composé a été constatée à l'état de traces dans le sang circulant chez l'homme lors de certaines dysthyroïdies. Cette constatation permet de penser que le dosage du dipeptide pourrait jouer un rôle important sur le plan du diagnostic et de la pathogénie des dysthyroïdies.

Il était particulièrement intéressant de mettre au point le dosage radioimmunologique de I<sub>2</sub>Tyr - I<sub>2</sub>Tyr. Ce dosage nécessitait le marquage à haute activité spécifique par <sup>125</sup>I de ce composé. Cette note décrit le marquage du dipeptide par <sup>125</sup>I, la purification du produit marqué et l'étude des conditions optimales de conservation.

#### DISCUSSION

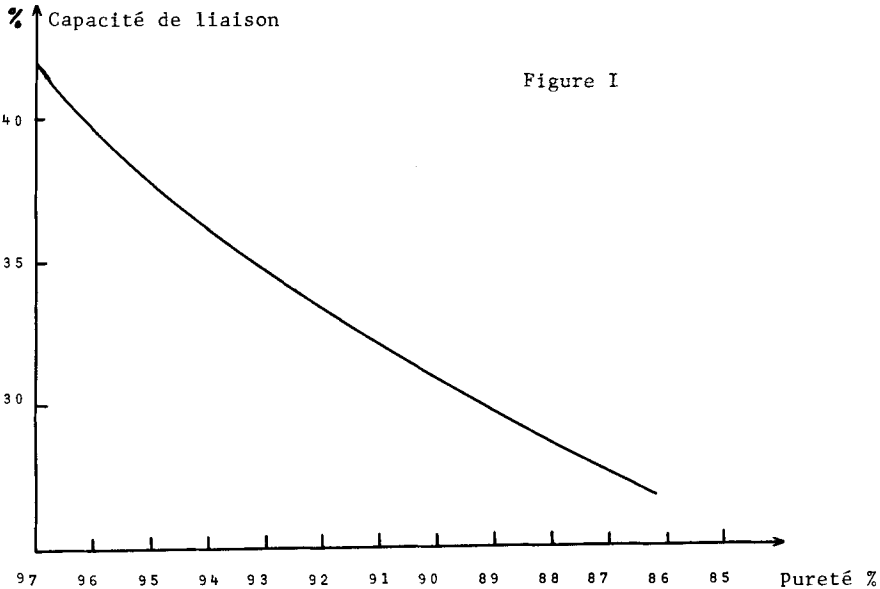
Nous avons choisi comme technique de marquage le procédé à la chloramine T qui est le plus souvent utilisé pour les peptides et protéines contenant de la tyrosine (6). Dans notre cas particulier, il s'agissait de réaliser la réaction suivante :



Il est donc nécessaire de saturer en iode la molécule de 1 tyrosyl-1 tyrosine. La proportion théorique pour obtenir le dérivé tétraiodé est de  $4 \text{ I}^-$  par mole. Cependant nous avons constaté que dans ces conditions il se formait principalement le dérivé triiodé. Un excès de 20 % par rapport à la stoechiométrie donne environ 50 % de tétraiodé. Cette proportion peut encore augmenter avec un excès d'iodure plus grand. Avec  $8 \text{ I}^-$  par molécule de 1 tyrosyl-1 tyrosine on obtient environ 80 % de tétraiodé, mais avec une activité spécifique deux fois plus faible que dans le cas précédent. Pour obtenir à la fois un rendement radiochimique suffisant et une activité spécifique  $> 1000 \text{ } \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ , nous avons utilisé un excès de 20 % par rapport à la stoechiométrie.

Après le marquage, l'iodure n'ayant pas réagi a été éliminé sur une petite colonne de résine DOWEX 50 W X 4 (200-400 mesh) et le produit marqué a été purifié sur colonne de Biogel P 2 (200-400 mesh) par la technique de Thomopoulos (7). Le rendement radiochimique en produit d'une pureté supérieure à 95 % est de 20 à 25 %. L'activité spécifique de l'antigène marqué a été mesurée par la méthode radioimmunologique de Hales et Randle (8). Nous avons trouvé des valeurs de 1000 à 1200  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

Ayant obtenu l'antigène marqué avec une pureté radiochimique et une activité spécifique satisfaisantes, il était nécessaire de posséder un milieu de conservation dans lequel les propriétés antigéniques soient préservées le plus longtemps possible. La figure I montre la décroissance de la capacité de liaison du produit marqué à un anticorps en fonction de sa pureté.



On voit d'après cette courbe qu'un produit pur à 97 % ayant une capacité de liaison de 42 % voit celle-ci chuter à 30 % lorsque la pureté de l'antigène marqué n'est plus que de 87 %. Cette valeur de la capacité de liaison est encore compatible avec des dosages radioimmunologiques de bonne précision. Nous avons donc testé la radiolyse et la conservation du  $^{125}\text{I}_2\text{Tyr}-^{125}\text{I}_2\text{Tyr}$  dans différents milieux :

La chromatographie sur colonne de Biogel P 2 donne le produit marqué en solution dans un tampon phosphate 0,05 M pH 7,5. Ce milieu est peu favorable à sa conservation et nécessite l'addition d'un radioprotecteur. La radiolyse d'un peptide iodé conduit principalement à sa désiodation et à une rupture de la liaison peptidique. L'hydrolyse du dipeptide est grandement favorisée par le fait qu'il se trouve en solution aqueuse, cependant la vitesse de cette réaction diminue avec la température. Compte tenu de ces données, nous avons testé trois milieux de conservation :

- 1) Tampon phosphate 0,05 M pH 7,5 + éthylène glycol 30 % comme radioprotecteur et antigel, maintenu à  $-20^\circ\text{C}$ .
- 2) Tampon phosphate 0,05 M pH 7,5 + éthanol 10 % comme radioprotecteur maintenu à  $4^\circ\text{C}$ .
- 3) Tampon lyophilisé, dans le but de diminuer l'hydrolyse de la liaison peptidique, maintenu à  $-20^\circ\text{C}$ .

Dans chacun des trois milieux une aliquote du produit marqué a été analysée à différents temps à l'aide des techniques décrites dans la partie expérimentale.

La figure 2 montre la décroissance du  $\text{I}_2\text{Tyr}-\text{I}_2\text{Tyr}$ , l'apparition de diiodotyrosine et d'iodures en fonction du temps dans les trois milieux de conservation. D'après la figure 2a, on voit que le milieu le plus favorable est l'éthylène glycol 30 % à  $-20^\circ\text{C}$ . En effet, au bout de 35 jours de conservation il reste 87 % de produit intact lorsqu'il est conservé dans l'éthylène glycol 30 % à  $-20^\circ\text{C}$ , 77 % lorsqu'il est conservé dans l'éthanol 10 % à  $4^\circ\text{C}$  et seulement 68 % lorsqu'il est conservé à  $-20^\circ\text{C}$  à l'état lyophilisé. La figure 2b montre l'apparition d'iodures en fonction du temps. D'après cette courbe, on voit qu'à l'état lyophilisé la désiodation est de 24 % au bout de 35 jours alors qu'elle ne dépasse pas 4 et 8 % dans les deux autres milieux. La figure 2c montre l'apparition de diiodotyrosine née de l'hydrolyse de la liaison peptidique. On voit d'après cette courbe que les deux milieux aqueux favorisent plus cette coupure que le milieu lyophilisé. Cependant, au bout de 35 jours dans l'éthylène glycol 30 % à  $-20^\circ\text{C}$ , moins de 5 % du dipeptide est hydrolysé en diiodotyrosine. Ces mesures montrent que ce dernier milieu est le plus favorable à la conservation du produit marqué qui présente un taux de désiodation très faible et une hydrolyse modérée. Par contre le fait de lyophiliser le

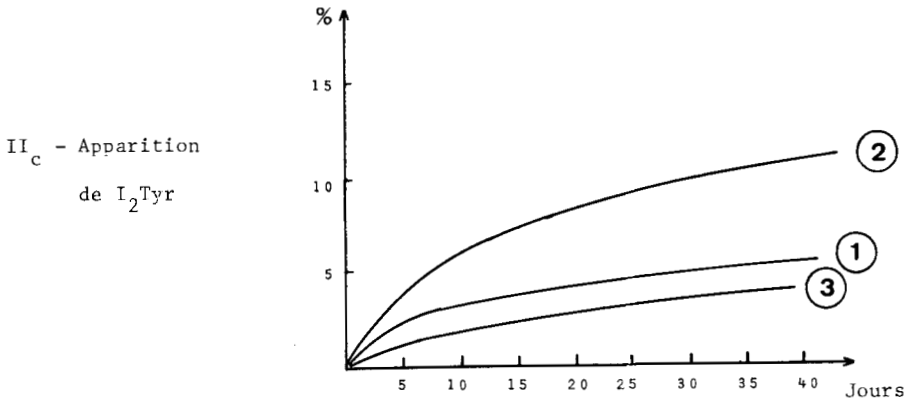
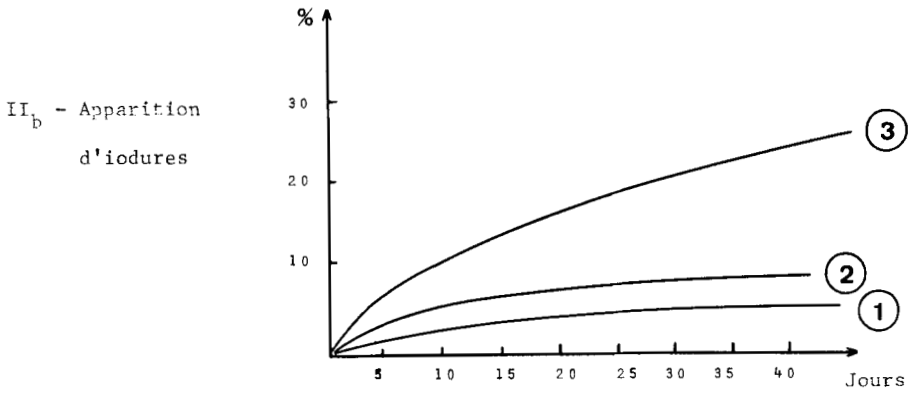
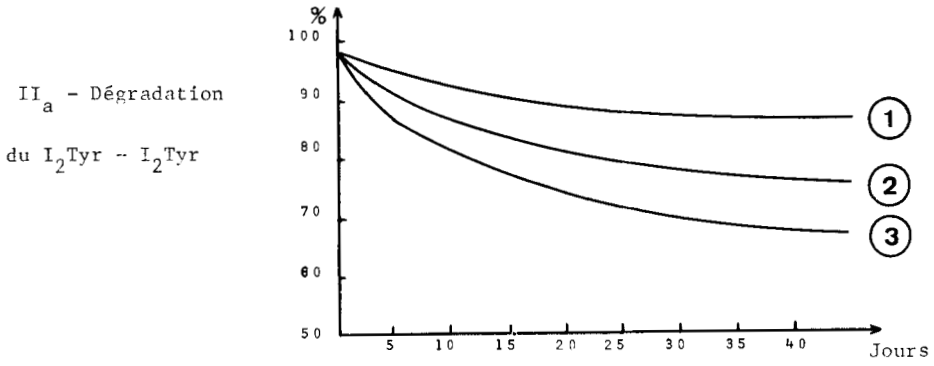


FIGURE II - Dégradation du I<sub>2</sub>Tyr - I<sub>2</sub>Tyr par désiodation et hydrolyse dans les trois milieux de conservation :

① : Ethylène - glycol 30 %

② : Ethanol 10 %

③ : Lyophilise

tampon place le produit dans des conditions très défavorables de conservation, car à l'état sec, bien que l'hydrolyse soit très faible, la désiodation est considérable.

Ces résultats montrent d'après la figure I que le produit conservé dans l'éthylène glycol 30 % à  $-20^{\circ}\text{C}$  est utilisable pendant 35 jours alors qu'il ne l'est que pendant II jours lorsqu'il est conservé dans l'éthanol 10 % à  $4^{\circ}\text{C}$  et pendant 6 jours lorsqu'il est conservé lyophilisé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## PARTIE EXPERIMENTALE

### 1) Produits utilisés :

$^{125}\text{I Na}$  nous a été fourni par le Commissariat à l'Energie Atomique (Saclay-France). Son activité spécifique est de 17 Ci/mg. Il est conservé sans réducteur à pH 8-10. Le l tyrosyl-l-tyrosine provient de Serva (Heidelberg - RFA), la chloramine T,  $^{127}\text{I Na}$  et l'éthylène glycol proviennent de Merck (Darmstadt, RFA). Les résines DOWEX 50 W X 4 (200-400 mesh) et Biogel P 2 (200-400 mesh) proviennent de Biorad (Richmond, USA).

### 2) Marquage du dipeptide :

La réaction est réalisée dans la fiole conique contenant l'iode radioactif. Les réactifs utilisés sont dissous dans un tampon phosphate 0,25 M pH 7,5 aux concentrations suivantes :

- l - tyrosyl-l-tyrosine :  $5 \times 10^{-4}$  M.
- Chloramine T :  $2,2 \times 10^{-2}$  M.
- $^{127}\text{I Na}$  :  $2,5 \times 10^{-3}$  M.
- $\text{Na HSO}_3$  :  $2,2 \times 10^{-2}$  M.

Dans la fiole contenant 5 mCi de  $^{125}\text{I Na}$ , on ajoute successivement 10  $\mu\text{l}$  de la solution de l-tyrosyl-l-tyrosine, puis 10  $\mu\text{l}$  de solution de chloramine T, on agite 15 secondes, puis on ajoute 10  $\mu\text{l}$  de solution de  $^{127}\text{I Na}$ . Au bout de 1 minute d'agitation, on ajoute 50  $\mu\text{l}$  de solution de  $\text{Na HSO}_3$  pour bloquer la réaction. Toute l'opération est menée à la température ambiante.

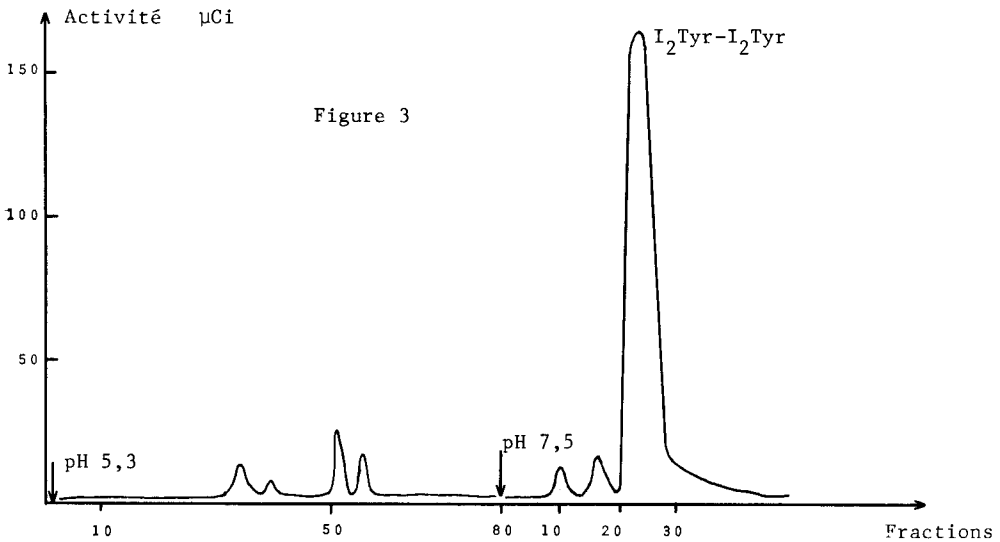
### 3) Purification du produit marqué :

Le milieu réactionnel est placé au sommet d'une petite colonne de résine Dowex 50 W x 4 (200-400 mesh) (hauteur 4 cm, diamètre 0,5 cm) qui est éluée par 10  $\text{cm}^3$  d'eau distillée pour éliminer l'iode n'ayant pas réagi, puis par 5  $\text{cm}^3$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,5 N qui élue le produit marqué.

Une chromatographie sur couche mince de cellulose avec HCl 0,01 N saturé d'acétate d'éthyle montre que le produit radioactif contient environ 50 % de

dérivé tétraiodé, le reste étant constitué de dérivés partiellement iodés et d'iodotyrosines.

Le produit à purifier est placé au sommet d'une colonne de Biogel P 2 (hauteur 50 cm, diamètre 0,9 cm) préalablement équilibrée par passage de 3 à 4 volumes de tampon tris-maléate 0,05 M pH 5,3. La colonne est éluée par 80 cm<sup>3</sup> de tampon tris-maléate 0,05 M pH 5,3 qui désorbe dans l'ordre l'iodure, la monoiodotyrosine, le monoiodotyrosyl-tyrosine, la diiodotyrosine, puis par 60 cm<sup>3</sup> de tampon phosphate 0,05 M pH 7,5 qui désorbe dans l'ordre, les di, tri et tétraiodo-tyrosyl-tyrosines. De cette façon, le produit marqué est récupéré dans un volume de 3 à 4 ml de tampon. La figure 3 montre un exemple de chromatogramme réalisé dans ces conditions.



L'éluat contenant le produit radioactif est soit additionné de 10 % d'éthanol et placé à 4° C, soit de 30 % d'éthylène glycol et placé à - 20° C, soit lyophilisé, en vue d'étudier différentes conditions de conservation.

#### 4) Vérification de la pureté du produit marqué :

Le  $\text{I}_2\text{Tyr-I}_2\text{Tyr}$  froid a été préparé dans notre laboratoire en utilisant la technique décrite par Blanquet et Meyniel qui ont également étudié son comportement chromatographique dans différents systèmes (9). Nous disposons donc de cette façon d'un standard de référence ;

##### - Vérification chromatographique.

Nous avons utilisé une chromatographie sur couche mince de cellulose dans les systèmes HCl 0,01 N saturé d'acétate d'éthyle et tert-Butanol-NH<sub>4</sub> OH 3 % (3 : 1 V/V). Les Rf des différents produits iodés sont les suivants :

	HCl 0,01 N/Acétate d'éthyle	Tert butanol/NH <sub>4</sub> OH 3 %
I <sub>2</sub> Tyr-I <sub>2</sub> Tyr	0,24	0,14
Partiellement iodés	0,25 - 0,55	0,18 - 0,57
I <sub>2</sub> Tyr	0,60	0,21
I Tyr	0,74	0,34
I <sup>-</sup>	0,92	0,95

- Hydrolyse enzymatique :

L'incubation du produit marqué en présence de 0,5 mg de produit froid avec 1 mg de pronase à pH 7,5 pendant 6 heures montre, après chromatographie sur couche mince de cellulose avec HCl 0,01 N saturé d'acétate d'éthyle, la présence, aux côtés d'une trace de dipeptide non hydrolysé, de diiodotyrosine à l'exclusion de tout autre produit.

5) Mesure de l'activité spécifique :

Soit  $C_0$  l'activité du complexe antigène marqué-anticorps en l'absence d'antigène froid et  $C_i$  l'activité du complexe antigène marqué-anticorps en équilibre avec une concentration  $i$  en antigène froid. Hales et Randle (8) ont montré que le rapport  $C_0/C_i$  est une fonction linéaire de  $i$ . Pour mesurer l'activité spécifique d'un antigène marqué, il suffit de tracer la courbe  $C_0/C_i$  en fonction de  $i$ . L'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses donne la concentration en antigène marqué. Cette valeur permet de calculer son activité spécifique.

CONCLUSION

La technique que nous avons décrite permet de marquer le I<sub>2</sub>Tyr-I<sub>2</sub>Tyr avec une activité spécifique de 1000 à 1200  $\mu$ Ci/ $\mu$ g. La méthode de purification par double chromatographie sur DOWEX 50 WX 4 (200-400 mesh) et Biogel P 2 conduit à une pureté radiochimique > 95 %. La conservation du produit marqué à pH 7,5 dans l'éthylène glycol 30 % maintenu à - 20° C permet une utilisation correcte pour les dosages radioimmunologiques pendant 35 jours.



Remerciement

Ce travail a reçu une aide de l'INSERM, C.R.L. n° 78 -  
5.047-3.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - MICHELOT J., MADELMONT J.C., et MEYNIEL G. - C.R. Acad. Sci., 276,  
I357-I359 (1973)
- 2 - MICHELOT J. Thèse de Doctorat en Biologie Humaine, Université de Clermont I  
Clermont-Ferrand (1977)
- 3 - MAURIZIS J.C., GODENECHÉ D., MICHELOT J., et MEYNIEL G. - Biochim. Biophys.  
Acta, 404, 188-201 (1975)
- 4 - MICHELOT J., MAURIZIS J.C., NICOLAS C., et MEYNIEL G. - Biochim. Biophys.  
Acta, 540, 463-471 (1978)
- 5 - MAURIZIS J.C., MICHELOT J. et MEYNIEL G. - Biochim. Biophys. Acta.,  
540, 472-477 (1978)
- 6 - GREENWOOD F.C., HUNTER W.M. et GLOVER J.J. - Biochem. J. 89, 114-123 (1963)
- 7 - THOMOPOULOS P. - Anal. Biochem. 65, 600-603 (1975)
- 8 - HALES C.M., et RANDLE P.J. - Biochem. J., 88, 137-146 (1963)
- 9 - BLANQUET P., MEYNIEL G., BERGER J.A., et CROIZET M. - C.R. Acad. Sci.,  
259, 671-678 (1964).