

CEA - R - 3898

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

---

2.1

DETERMINATION RADIOCHROMATOGRAPHIQUE  
DE L'ADENOSINE DEAMINASE  
(A.D.) PLASMATIQUE

*par*

*Jean-Jacques CHIVOT, Dany DEPERNET*

*Jacques CAEN*

SOUS-DIRECTION DES RECHERCHES

Centre d'Etudes de Bruyères-le-Chatel :

Rapport CEA - R - 3898

---

1970

SERVICE CENTRAL DE DOCUMENTATION DU C.E.A

Ba

C.E.N. - SACLAY B.P. n°2, 91 - GIF-sur-YVETTE - France

CEA-R-3898 - CHIVOT Jean-Jacques, DEPERNET Dany,  
CAEN Jacques

DETERMINATION RADIOCHROMATOGRAPHIQUE DE  
L'ADENOSINE DEAMINASE (A.D.) PLASMATIQUE

Sommaire. - Nous avons pu, en utilisant une méthode radiochromatographique, mesurer une activité adénosine déaminasique dans le plasma humain pauvre en plaquettes hépariné qui peut dégrader 0,016  $\mu\text{M}$  d'adénosine. Cette activité qui est supprimée par chauffage à 56° 30 minutes, est réduite par conservation à -20°C pendant une semaine, est inhibée par d'importantes concentrations d'urée et ne l'est pas, ni par le dipyridamol, ni par le pHMB. Cette activité est proportionnelle à la quantité de plasma, source d'enzyme, mise dans les différents systèmes réactifs.

1970 - Commissariat à l'Energie Atomique - France 18 p.

---

CEA-R-3898 - CHIVOT Jean-Jacques, DEPERNET Dany,  
CAEN Jacques

RADIOCHROMATOGRAPHIC DETERMINATION  
OF PLASMATIC ADENOSINE DEAMINASE (A.D.)

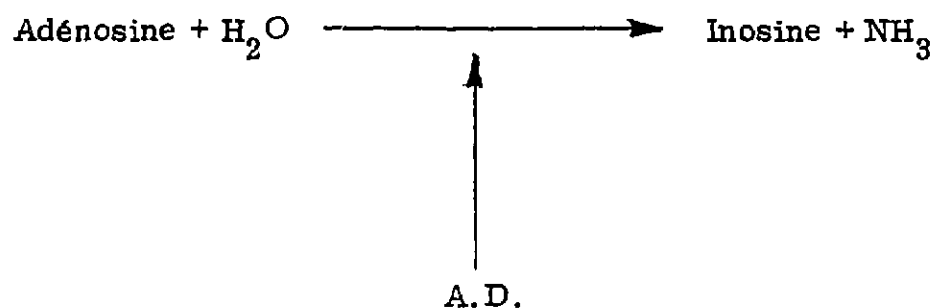
Summary. - We were able, by using a radiochromatographic method, to measure an adenosine deaminase activity in normal human heparinized platelet-poor plasma, which can degrade 0,016  $\mu\text{M}$  adenosine. This activity suppressed by heating 56° 30 minutes is inhibited by high concentrations of urea and is proportional to the amount of plasma, source of enzyme, in the systems.

1970 - Commissariat à l'Energie Atomique - France 18 p.

DETERMINATION RADIOCHROMATOGRAPHIQUE  
DE L'ADENOSINE DEAMINASE (A.D.) PLASMATIQUE

L'adénosine déaminase a été reconnue dans le sang et dans différents tissus par E. J. CONWAY et R. COOKE (1939) et son activité a été mise en évidence par différents auteurs dans la muqueuse intestinale de peau de veau par H. M. KALCKAR, 1947, A. CODDINGTON, 1965, H. P. BÄR et G. I. DRUMMOND, 1966, R. VOLFENDEN, 1967, et G. RONCA, 1967. Elle a également été reconnue dans la muqueuse de la rate de boeuf par E. M. O'BRIEN et E. R. TULLY, 1968, dans les leucocytes par H. KARKER, 1965, dans les sérums ou les plasmas par L. H. KOEHLER et J. BENZ, 1962, R. G. MARTINEK, 1963, H. KARKER, 1964, et D. M. GOLDBERG en 1965.

L'A.D. catalyse la réaction :



ce qui permet sa détermination selon deux principes de dosages :

- a - Mesure de l'ammoniac libéré (J.B. SOLOMON, 1960, L.H. KOEHLER et J. BENZ, 1962, R. MARTINEK, 1963, H. KARKER, 1964),
- b - Mesure spectrophotométrique de la dégradation de l'adénosine à 265 m $\mu$  (H.M. KALCKAR, 1947).

Ces techniques n'étant pas applicables pour les très faibles concentrations de l'ordre de un micromole (BORN, 1962), où l'activité inhibitrice de l'adénosine est capable de s'opposer à l'agrégation des plaquettes à l'adénosine diphosphate (A.D.P.), nous avons été amenés à élaborer une méthode de dosage dans le plasma dont la sensibilité est très nettement augmentée par rapport aux méthodes connues ; nous avons pour cela utilisé un traceur isotopique sous la forme de <sup>14</sup>C-adénosine. La radioactivité permet de suivre aisément les variations de la réaction : dégradation de l'adénosine, formation d'inosine et, éventuellement, d'hypoxanthine.

## - MATERIELS

### A - Obtention du plasma

#### 1 - Plasma pauvre en plaquettes : PPP

Le sang de donneurs humains sains, prélevé sur anticoagulant à la veine du pli du coude, est centrifugé à + 4°C pendant 40 minutes à 8 000 g. Afin de reconnaître si une hémolyse éventuelle interférerait dans les dosages (IRELAND et MILLS, 1966), nous avons isolé des PPP issus de plasmas riches en plaquettes (PRP) et de sang total ; nous n'avons décelé aucune différence entre les deux PPP ; aussi, dès lors, nous avons utilisé pour une raison de simplicité du PPP issu de sang total.

#### 2 - Anticoagulant

Nous avons comparé des prélèvements pratiqués sur EDTA (sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique, 1 partie d'une solution à 1 g °/ en sérum physiologique pour 9 parties de sang), sur citrate de soude (1 partie d'une solution à 3,8 °/ pour 9 parties de sang) et sur héparine à la dose de 0,1 ml à 5 000 U.I. /ml pour 10 ml de sang et avons retenu ce dernier anticoagulant pour toutes nos expériences.

#### 3 - Conservation du PPP

Afin de pouvoir utilement comparer d'éventuels plasmas, considérés comme pathologiques, à des plasmas normaux, nous avons évalué l'activité enzymatique des PPP fraîchement recueillis, aux mêmes PPP conservés à - 20°C pendant une semaine.

#### 4 - Chauffage

Des essais ont été pratiqués après chauffage du PPP à 56°C pendant 30 minutes pour apprécier la thermostabilité de l'enzyme.

#### 5 - Inhibiteurs

Nous avons étudié l'effet de certains inhibiteurs de la réaction :

- parahydroxymercuribenzoate (pHMB) (WOLFENDEN, 1967, E.M. O'BRIEN et E.R. TULLY, 1968) à des concentrations de  $1.10^{-4}$  à  $2.10^{-3}$  M.
- dipyridamol (persantine) (E.M. O'BRIEN et E.R. TULLY, 1968) aux concentrations de  $1.10^{-4}$  M,  $5.10^{-4}$  M et  $1.10^{-3}$  M.
- urée (G. RONCA, 1967) aux concentrations suivantes : 0,07 M , 0,7 M , 1,4 M.

#### B - La molécule marquée

C'est une Bêta adénosine  $^{14}\text{C}$ -8 fournie par le Commissariat à l'Energie Atomique obtenue par condensation de la N acétyl adénine  $^{14}\text{C}$ -8 et du tétracétyl D-ribose par la méthode dite "de fusion", suivie d'une désacétylation (L. PICHAT, P. DUFAY et Y. LAMORRE, 1964). La purification est faite sur résine échangeuse d'ions. L'activité spécifique de 20,4 mCi/mM soit 76,5  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ .

Après dilution dans le sérum physiologique pour obtenir une concentration de 10  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ , nous fractionnons la solution pour disposer de quantités de 0,2 à 0,5 ml congelés à - 25°C et utilisés selon nos besoins. Cependant, ayant constaté qu'en fonction des lots livrés, une quantité plus ou moins importante d'adénine contaminait la préparation, surtout après conservation, nous avons habituellement utilisé une préparation fraîche d'adénosine ne datant pas de plus de deux semaines.

#### - METHODES

Une évaluation de l'activité enzymatique, aux concentrations physiologiquement actives, nécessite un dosage séparé des constituants de la réaction. Le schéma de notre méthode sera donc, après incubation des systèmes réactifs :

- a) une séparation réalisée par chromatographie bidimensionnelle,
- b) une identification par autoradiographie des constituants marqués,
- c) un dosage isolé des produits de la dégradation par comptage.

## A - Systèmes réactifs

1,9 ml PPP + 0,1 ml adénosine  $^{14}\text{C}$  6,66  $\mu\text{Ci/ml}$ .

L'adénosine 6,66  $\mu\text{Ci/ml}$  est obtenue par dilution de la solution mère congelée décrite précédemment, en tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7,4.

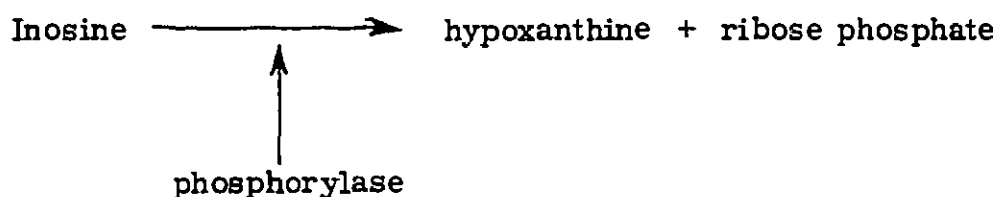
Tampon	(	phosphate monosodique	0,2 M	19 ml
	)	phosphate disodique	0,2 M	81 ml
	)	$\text{OH}_2$ bidistillée	q. s. p.	200 ml

Après les dilutions successives, la quantité d'adénosine mise en réaction dans le système est de 0,032  $\mu\text{M}$ , soit 0,016  $\mu\text{M/ml}$ .

### 1 - Temps de réaction

Un système préparé au temps zéro sert de témoin. La déprotéinisation du plasma est réalisée par adjonction d'acide trichloracétique (TCA). Le substrat radioactif n'est introduit qu'après ce stade pour écarter tout risque de début d'activité enzymatique sur l'adénosine.

Des essais ayant été réalisés après incubation de 2, 5, 10, 20 et 30 minutes, nous avons adopté le temps de réaction de 10 minutes car, si dès la deuxième minute, l'adénosine subit une dégradation et l'inosine se forme, des quantités plus importantes d'adénosine sont ensuite déaminées et d'inosine formées en fonction du temps d'incubation. A la dixième minute cependant, l'hypoxanthine apparaît ce qui laisse à penser qu'une réaction secondaire intervient. Une partie de l'inosine se dégrade alors sous l'action d'un autre enzyme, sans doute une nucléoside-phosphorylase :



Dans aucune de nos expériences une trace d'AMP ne fut décelée.

### 2 - Déprotéinisation

Après incubation, la déprotéinisation des systèmes a été obtenue :

- soit par l'alcool éthylique à 96° 2 ml,
- soit par l'acide trichloracétique à 40 ou 60 % 0,5 ml.

L'acide trichloracétique à 60 % conduisant à la précipitation la plus complète a été retenu.

Après agitation des tubes, on laisse reposer 30 minutes dans de la glace à + 4°C puis on centrifuge 15 minutes à + 4°C à 1 500 g. Les surnageants acides décantés sont recueillis pour la chromatographie et les précipités protéiques éliminés. Pour vérifier l'efficacité de l'opération, certains précipités, après deux lavages en eau bidistillée, sont redissous dans une solution NaOH 0,1 M et chromatographiés dans les mêmes conditions que les surnageants acides. Les résultats montrent qu'il ne subsiste que de très faibles traces d'adénosine radioactive.

### 3 - Températures d'incubation

Différentes expériences menées à + 4°C, + 20°C, + 37°C et + 56°C nous ont déterminé à considérer + 37°C comme la température où l'activité adénosine déaminasique est maximale.

### 4 - Concentrations variables de l'enzyme

Afin d'étudier le comportement du système selon la concentration enzymatique, outre le système défini précédemment, nous avons mis en réaction un PPP préalablement dilué en tampon phosphate au 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6 et 1/10.

### 5 - Concentrations variables du substrat

Par addition de quantités croissantes d'adénosine non radioactive (froide), nous avons observé le comportement du système en réaction. Les doses complémentaires de substrat vont de 0,1 ml d'adénosine  $0,66 \cdot 10^{-2} \mu M$  à  $3,2 \cdot 10^{-2} \mu M$ .

## B - Séparations chromatographiques

Nous utilisons un papier Whatmann n° 1, non lavé. Chaque essai est pratiqué sur une feuille de 33 cm x 33 cm. La température pendant la migration est de  $22^\circ C \pm 3$ . La quantité totale déposée est de 25 microlitres. Des chromatographies unidimensionnelles révèlent un Rf commun pour l'inosine et l'AMP avec le solvant a dans nos conditions expérimentales. Seule dès lors une chromatographie bidimensionnelle permet-elle la séparation de ces deux composants, si on utilise les solvants suivants :

### a - Première dimension

Acide isobutyrique	62,50
NH <sub>4</sub> OH concentré	2,62
EDTA 0,1 M	1
H <sub>2</sub> O	33,75

Dans nos premières expériences, un temps de migration de 16 heures s'est avéré trop long pour les dimensions du papier utilisé. Nous avons obtenu une bonne séparation avec une durée de chromatographie de 9 heures dans la première dimension. Les chromatogrammes sont séchés à la température du laboratoire, soit environ  $+ 22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

b - Deuxième dimension

n-Butanol	45
Acétone	15
CH <sub>3</sub> COOH	10
NH <sub>4</sub> OH concentrée	2
H <sub>2</sub> O	28

Le temps de migration optimal est de 18 heures.

Dans les mêmes conditions expérimentales, on réalise une migration après dépôt d'un mélange de solutions témoins d'ATP, ADP, AMP, adénosine, inosine, hypoxanthine et adénine à des concentrations de  $50\mu\text{g}$ .

C - Identification par autoradiographie

Technique

Les chromatogrammes séchés sont traités en chambre noire, en lumière vert sombre (lanterne "Variaphot" KD, réf. 7/1525 et écran panchro 8 vert sombre).

1 - Mise en contact

On emploie des films "Kodirex" monocouche. On met en contact le côté émulsionné du film avec le chromatogramme en le maintenant sur la surface sensible par un ruban de cellophane adhésive. On introduit les films dans des enveloppes noires et on laisse en contact, sous presse, pendant une semaine au moins. La radioactivité faible rend ce délai nécessaire pour obtenir une localisation précise des substances à doser.

2 - Développement

On utilise trois bacs contenant :

- Premier bac : 3 mn 30, révélateur radiokodak L x 24
- Deuxième bac : simple passage pour rincer à l'eau
- Troisième bac : 20 mn dans un fixateur radiokodak AL 4.



On rince à l'eau courant pendant deux heures ; le dernier rinçage se fait à l'eau distillée ou permutée. Les films sont séchés à la température de la pièce pendant environ 24 heures.

Sur un papier calque, à l'aide d'un crayon noir, on cerne l'emplacement des taches radioactives qui apparaissent sur le film. Ce calque appliqué sur le chromatogramme permet une localisation précise du matériel radioactif. Après découpage du papier il sera mesuré par comptage.

#### D - Mesure des produits de la réaction

Chaque morceau de papier contenant le radiocarbone est introduit au sein du scintillateur liquide qui est distribué par fractions de 20 ml dans des flacons faits d'une matière plastique spéciale ayant une transparence maximale aux photons émis.

#### Formule du liquide scintillant

##### Solvant

Dioxane	5 parties
Alcool éthylique absolu	3 parties
Xylène	5 parties

##### Scintillateur

POPOP	0,05 g
PPO	5 g
Naphtalène	80 g
Solvant	q. s. p. 1 000 ml.

Les flacons sont conservés trois jours à + 4°C, pour atteindre l'équilibre du système. Puis on mesure la radioactivité du carbone 14 dans un compteur à scintillation liquide. Le rendement de l'appareil est établi par rapport à des solutions standards de radioactivité absolue connue. Un facteur de correction inhérent à l'appareil doit être appliqué (+).

#### E - Expression des résultats

Soit y le nombre de désintégrations par minute lues sur l'appareil, z le nombre de chocs correspondant au bruit de fond de l'appareil. Si le rendement de comptage est de 65 %, l'activité par tache de 0,025 ml sera donnée par la formule

$$\frac{y - z \times 100}{65 \times 2,22 \times 10^6} = \mu\text{Ci}/0,025 \text{ ml}$$

1 curie =  $3,7 \times 10^6$  désintégrations par seconde.

---

(+) Nous avons utilisé un compteur "Tricarb" de la firme Packard.

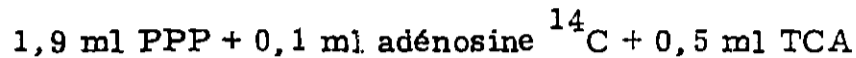
Soit  $x$  l'activité au temps zéro et  $x'$  l'activité après 10 minutes d'incubation.  
 $x - x'$  représente la dégradation d'adénosine ou la formation d'inosine ou d'hypoxanthine en 10 minutes, ce qui permet d'écrire

$$\frac{x - x' \times 40}{10} = \mu\text{Ci/ml/mn},$$

ou

$$4 \cdot 10^4 (x - x') = m \mu\text{Ci/ml/mn}.$$

Ceci représente donc l'activité par ml de surnageant. D'après le système de réaction :



il est nécessaire de multiplier par le facteur de dilution

$$\frac{2,5}{1,9} = 1,31$$

afin de s'exprimer par ml de PPP.

Connaissant l'activité spécifique de l'adénosine, il est aisé de convertir les  $\mu\text{Ci}$  en  $\mu\text{M}$ .

$$\text{PM adénosine} = 267,2$$

## - RESULTATS

Les moyennes rassemblées dans le Tableau I, calculées sur les résultats de 19 échantillons normaux, montrent l'importance de l'activité adénosine déaminasique (A.D.) d'un PPP normal après dix minutes d'incubation. On peut voir que la dégradation de  $5,8 \times 10^{-4} \mu\text{M}$  (12  $m\mu\text{Ci}$ ) d'adénosine par minute et par millilitre de plasma est contemporaine de la formation de 15  $m\mu\text{Ci}$  d'inosine et de 3  $m\mu\text{Ci}$  d'hypoxanthine qui est le témoin d'une dégradation secondaire qui n'intéresse pas directement l'étude que nous nous sommes proposés. Ainsi remarquons-nous que la somme inosine et hypoxanthine formée est souvent supérieure à la quantité d'adénosine dégradée si nous nous exprimons en  $m\mu\text{Ci}$ . Ce fait est sans doute dû aux absorptions relatives de la radioactivité des diverses molécules sur notre support de chromatographie, le comptage étant fait directement sur le papier sans élution préalable. Nous avons estimé qu'il n'y avait pas lieu d'introduire un facteur de correction dans les calculs si nous ne prenons en considération pour l'interprétation des résultats que les variations des quantités d'inosine formée dans les systèmes expérimentaux, par rapport à la quantité d'inosine obtenue dans le système témoin, système témoin établi pour chaque série d'expériences.

La nature des anticoagulants essayés n'a pas d'incidence sur l'activité enzymatique. Ainsi les quantités d'inosine formées sont-elles respectivement de 15  $m\mu\text{Ci}$  avec le citrate de sodium, 14  $m\mu\text{Ci}$  avec l'EDTA et 15  $m\mu\text{Ci}$  avec l'héparine (Tableau II).

Le Tableau III indique une diminution dans la formation d'inosine qui, de 14  $m\mu\text{Ci}$  avec un PPP frais, n'est plus que de 10  $m\mu\text{Ci}$  après une semaine de conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$ , ce qui révèle une perte d'activité A.D.

De même, un chauffage préalable des PPP 30 minutes à  $+56^{\circ}\text{C}$  révèle une thermostabilité de l'enzyme. La quantité d'inosine formée n'est plus que de 6  $m\mu\text{Ci}$  après traitement à  $56^{\circ}\text{C}$  (Tableau IV).

Nous avons essayé comme inhibiteurs le p-hydroxymercuribenzoate ou pHMB qui, aux diverses concentrations utilisées, ne paraît pas être inhibiteur (Tableau V). Avec le dipyridamol, nous constatons une légère inhibition pour les concentrations les plus élevées. Alors que dans le système témoin on trouve 14  $m\mu\text{Ci}$  d'inosine, en présence de dipyridamol on ne trouve que 11  $m\mu\text{Ci}$ , ce qui représente une diminution de l'ordre de 20 % (Tableau VI).

L'urée à fortes concentrations, 0,7 M et 1,4 M, inhibe nettement la réaction. Par contre, à la concentration de 0,07 M, l'activité A.D. ne semble pas perturbée (Tableau VII).

Le tableau VIII met en relief le fait que l'augmentation de la concentration en substrat inhibe la réaction et que nous obtenons le meilleur rendement sans addition d'adénosine froide.

L'activité A.D. du plasma est fonction de la concentration enzymatique (figure 1), c'est-à-dire de la concentration du plasma.

## - DISCUSSION

L'activité adénosine déaminase n'a été que rarement recherchée dans le plasma normal (KOEHLER et BENZ, MARTINEK, KARKER, GOLDBERG) par dosage de l'ammoniac libéré dans la réaction pour les trois premiers, étude spectrophotométrique pour GOLDBERG. Ces différentes méthodes ne permettent en aucune façon de mesurer la dégradation de l'adénosine et la formation de l'inosine dans la réaction aux concentrations ( $1\mu\text{M}$ ) où l'adénosine est, savons-nous, inhibiteur de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP (BORN, 1962, IRELAND et MILLS, 1966, CAEN et MICHEL, 1969). La technique que nous proposons permet de mesurer la dégradation de  $0,016\mu\text{M}$  d'adénosine/millilitre de plasma, soit une concentration de l'ordre de  $1/60^{\circ}$  de celle qui nous intéresse.

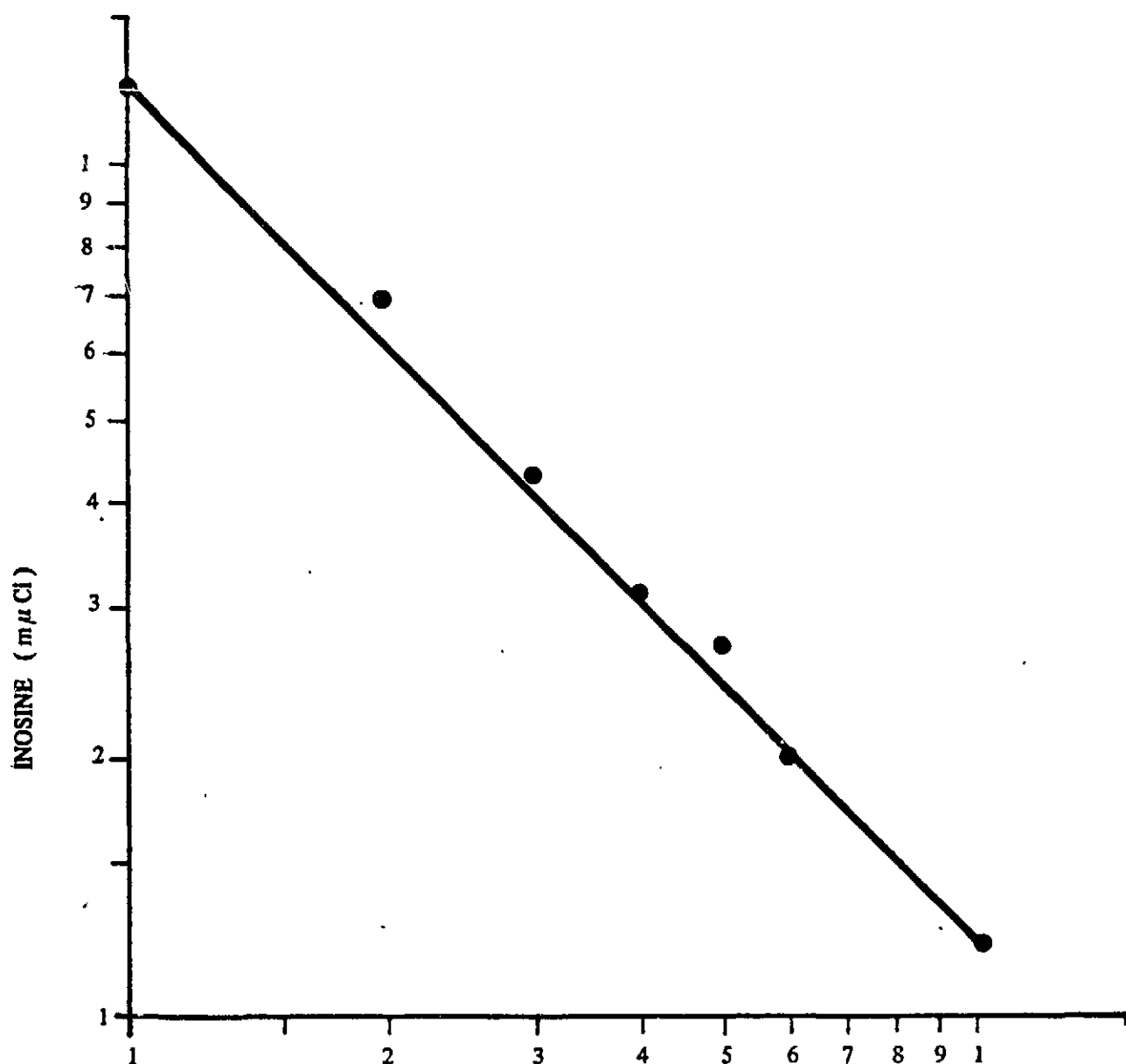
Cette activité assez constante pour les plasmas normaux, est réduite à la conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 7 jours, est pratiquement abolie après chauffage à  $56^{\circ}\text{C}$  30 minutes, se retrouve également dans les plasmas héparinés, citratés ou sequestrenés.

Nous n'avons pas ou peu retrouvé dans nos conditions expérimentales d'effet inhibiteur ni du pHMB, ni du dipyridamol. Par contre, l'urée à des concentrations supérieures ou égales à 0,7 M est un puissant inhibiteur.

L'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration du plasma, source d'enzyme, dans le milieu.

Ces résultats nous permettent dès lors de pouvoir envisager l'utilisation de cette technique pour la mesure des activités adénosine déaminase du plasma dans les syndromes hémorragiques et thrombotiques.

De plus, elle nous autorise à poursuivre en parallèle l'activité A.D. du plasma avec l'incorporation du  $^{14}\text{C}$ -adénosine dans les plaquettes (CAEN et MICHEL).



Inosine formée (mμCi/mn/ml PPP) en fonction de la concentration de l'enzyme (Dilution du PPP héparine)

TABLEAU I

Activité adénosine déaminasique de 19 PPP normaux (adénosine dégradée, inosine et hypoxanthine formées, par minute et par ml de PPP (source d'enzyme))

Nombre de cas	Adénosine		Inosine	Hypoxanthine
	$\mu\text{M}$	$\text{m}\mu\text{Ci}$	$\text{m}\mu\text{Ci}$	$\text{m}\mu\text{Ci}$
19	$- 5,8.10^{-4}$	- 12	+ 15	+ 3
	$\pm 1,5$	$\pm 3$	$\pm 5$	+ 1

TABLEAU II

Expériences faites avec des mêmes PPP issus des mêmes prélèvements pris sur différents anticoagulants

	Sang n°	Adénosine $\text{m}\mu\text{Ci}$	Inosine $\text{m}\mu\text{Ci}$	Hypoxanthine $\text{m}\mu\text{Ci}$
Citrates de sodium	1	- 11	+ 14	+ 4
	2	- 11	+ 15	+ 4
	3	- 10	+ 15	+ 2
	Moyenne	- 11	+ 15	+ 3,3
E.D.T.A.	1	- 11	+ 14	+ 5
	2	- 11	+ 14	+ 5
	3	- 11	+ 15	+ 2
	Moyenne	- 11	+ 14	+ 4
Héparine	1	- 11	+ 15	+ 5
	2	- 10	+ 15	+ 5
	3	- 11	+ 15	+ 2
	Moyenne	- 11	+ 15	+ 4

N.B. - Les résultats sont exprimés en millimicrocuries ( $\text{m}\mu\text{Ci}$ ) par minute d'incubation à 37°C par ml de PPP.

TABLEAU III

Incidence de la conservation du PPP à - 20°C pendant 7 jours  
sur l'activité adénosine déaminasique

	Nombre de cas	Adénosine m $\mu$ Ci	Inosine m $\mu$ Ci	Hypoxanthine m $\mu$ Ci
Avant conser- vation	5	- 12	+ 14	+ 2,5
Après conser- vation d'une semaine	5	- 10,5	+ 10	+ 1,8

TABLEAU IV

Moyenne des résultats obtenus avant et après chauffage  
de 4 PPP 30 minutes à 56°C

	Adénosine m $\mu$ Ci	Inosine m $\mu$ Ci	Hypoxanthine m $\mu$ Ci
Plasmas non chauffés	- 14	+ 14	+ 5
Plasmas chauffés	- 2,3	+ 6	+ 4

TABLEAU V

Effet du p-hydroxymercuribenzoate (pHMB) sur la formation d'inosine et la dégradation d'adénosine. Les PPP et le pHMB sont laissés en contact 30 mn à la température du laboratoire avant l'adjonction du substrat suivie de l'incubation de 10 mn à 37°C

	Adénosine m $\mu$ Ci	Inosine m $\mu$ Ci	Hypoxanthine m $\mu$ Ci
Sans inhibiteur	- 13	+ 8	+ 3
+ p-HMB 1 x 10 <sup>-4</sup> M	- 12	+ 9	+ 1
+ p-HMB 2 x 10 <sup>-4</sup> M	- 11	+ 9	+ 1
Sans inhibiteur	- 12	+ 12	+ 2
+ p-HMB 1 x 10 <sup>-3</sup> M	- 18	+ 14	+ 1
+ p-HMB 2 x 10 <sup>-3</sup> M	- 12	+ 12	+ 1

TABLEAU VI

Effet du dipyridamol à différentes concentrations sur la dégradation de l'adénosine et la formation de l'inosine et de l'hypoxanthine (sans preincubation)

	Adénosine m $\mu$ Ci	Inosine m $\mu$ Ci	Hypoxanthine m $\mu$ Ci
Sans dipyridamol	- 14	+ 14	+ 2
Avec dipyridamol :			
- 1 x 10 <sup>-4</sup> M	- 12	+ 13	+ 2
- 5 x 10 <sup>-4</sup> M	- 12	+ 12	+ 2
- 1 x 10 <sup>-3</sup> M	- 12	+ 11	+ 2

TABLEAU VII

Effet de l'urée avec préincubation de 1 heure à 37°C sur la dégradation de l'adénosine et la formation d'inosine et d'hypoxanthine

	Adénosine m $\mu$ Ci	Adénine m $\mu$ Ci	Inosine m $\mu$ Ci	Hypoxanthine m $\mu$ Ci
Sans inhibiteur	- 11	- 3	+ 14	+ 5
+ Urée 0,07	- 13	- 5	+ 15	+ 4
+ Urée 0,7 M	- 4	+ 1	+ 5	+ 0,9
Sans inhibiteur	- 17	- 5	+ 18	+ 6
+ Urée 1,4 M	- 5	- 0,3	+ 1,7	+ 0,2

TABLEAU VIII

Effet de l'adjonction d'adénosine non marquée (froide) à diverses concentrations sur la dégradation de l'adénosine  $^{14}\text{C}$  et la formation d'inosine  $^{14}\text{C}$  et d'hypoxanthine  $^{14}\text{C}$

	Adénosine m $\mu$ Ci	Inosine m $\mu$ Ci	Hypoxanthine m $\mu$ Ci
Système témoin	- 11	+ 11	+ 0,5
+ adénosine $1,6 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}$	- 11	+ 7	+ 0,9
+ adénosine $3,2 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}$	0	+ 4	+ 0,5
Système témoin	- 16	+ 10	+ 7
+ adénosine $0,66 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}$	- 9	+ 8	+ 5
+ adénosine $1,66 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}$	- 6	+ 7	+ 3,4
+ adénosine $3,32 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}$	- 2,4	+ 4	+ 2,2
+ adénosine $6,64 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}$	- 1,7	+ 2,5	+ 1,3

N.B. - Système de réaction : 1,8 ml PPP + 0,1 ml adénosine froide de concentrations variables + 0,1 ml  $^{14}\text{C}$  adénosine 6,66  $\mu\text{Ci/ml}$ .



BIBLIOGRAPHIE

- 1 - E.J. CONWAY, R. COOKE  
Blood and tissue deaminases  
Biochem. J., 33, 1939, 479.
- 2 - H.M. KALCKAR  
Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes.  
J. Biol. Chem., 167, 1947, 461.
- 3 - A. CODDINGTON  
Some substrates and inhibitors of adenosine deaminase  
Biochem. Biophys. Acta, 99, 1965, 442.
- 4 - H.P. BAR, G.I. DRUMMOND  
On the mechanism of adenosine deaminase action.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 24, 1966, 584.
- 5 - R. WOLFENDEN  
Substrate binding by adenosine deaminase specificity, pH dependance and  
competition by mercurials.  
J. Biol. Chem., 242, 1967, 977.
- 6 - G. RONCA  
Competitive inhibition of adenosine deaminase by urea, guanidine, biuret guanylures.  
Biochem. Biophys. Acta, 132, 1967, 214.
- 7 - E.M. O'BRIEN, E.R. TULLY  
Studies on purified bovine spleen adenosine deaminase.  
Biochem. J., 110, 1968, 17.
- 8 - H. KARKER  
Adenosine deaminase activity in normal leukocytes.  
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 17, 1965, 95

- 9 - L.H. KOEHLER, J. BENZ  
Serum adenosine deaminase. Methodology and clinical applications.  
Clin. Chem. 8, 1962, 133.
- 10 - R.G. MARTINEK  
Micromethod for estimation of serum adenosine deaminase.  
Clin. Chem., 9, 1963, 620.
- 11 - H. KARKER  
Method for estimation of serum adenosine deaminase  
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 16, 1964, 570.
- 12 - D.M. GOLDBERG  
Adenosine deaminase in the differential diagnosis of jaundice.  
Brit. Med. J., 431, 1965, 353.
- 13 - J.B. SOLOMON  
Constitutive enzymes of the developing chick embryo : adenosine deaminase  
Biochem. J., 75, 1960, 278.
- 14 - G.V.R. BORN  
Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.  
Nature, 194, 1962, 927.
- 15 - D.M. IRELAND, D.C.B. MILLS  
Detection and determination of adenosine diphosphate and related substances  
in plasma.  
Biochem. J., 99, 1966, 283.
- 16 - C. PICHAT, P. DUFAY, Y. LAMORRE  
Synthèse de l'adénosine <sup>14</sup>C-8. Formation simultanée des deux nucléosides  
anomères Alpha et bêta par la méthode de fusion.  
C.R. Acad. Sc., 259 (Groupe 8), 1964, 2453.
- 17 - J. CAEN, H. MICHEL  
Observation non publiée.

**FIN**