

SUMMARY

The synthesis and some of the properties of cycloheptatriene-1,6-dicarboxylic acid and its norcaradieneoid anhydride are described.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule Zürich

322. Transfert et équilibre de dialyse du ^{59}Fe entre les principales «ferriprotéines»¹⁾

par B. Blanc et H. Isliker

(30 IX 63)

Par le terme *ferriprotéines*, on désigne des protéines non hémiques fixant spécifiquement le fer trivalent sous forme de complexes colorés. Selon leur fonction, leur poids moléculaire et le nombre d'atomes de fer susceptibles d'être liés, on peut distinguer deux groupes de ferriprotéines:

1. Les ferriprotéines *transporteuses* qui prélèvent le fer des dépôts, le véhiculent dans l'organisme et le libèrent à l'endroit voulu. D'un poids moléculaire inférieur à 100000 elles ne fixent qu'un nombre restreint d'atomes de fer par molécule: 2 au maximum pour la transferrine sérique²⁾ et la conalbumine³⁾ de l'œuf, normalement 2 pour la lactotransferrine lactosérique⁴⁾ qui peut cependant en fixer jusqu'à 6⁵⁾.

2. Les ferriprotéines *dépositaires* qui retiennent le fer jusqu'au moment propice à sa libération. Leur poids moléculaire dépasse 400000. L'apoferritine en fixant le fer devient la ferritine qui peut en contenir environ 2000 atomes, soit le 20 à 24% de son poids moléculaire d'environ 500000. L'hémosidérine contient 37% de fer soit environ 3000 atomes par molécule.

Le métabolisme du fer étant conditionné par les échanges entre les ferriprotéines transporteuses et dépositaires, le but de notre travail était d'explorer, par équilibre de dialyse, les modalités de ces transferts.

Matériel et méthodes

Préparation des ferriprotéines: La transferrine humaine a été isolée selon KISTLER *et coll.*⁶⁾. La lactotransferrine humaine a été préparée par la méthode de BLANC & ISLIKER⁴⁾, et la lactotransferrine bovine, isolée par GROVES⁷⁾ a été aimablement mise à notre disposition par M. le Prof. T. L. McMEEKIN (Eastern Regional Laboratory, Philadelphia, Penn., U.S.A.). La ferritine équine commerciale a été fournie par PENTEX INC., Kankakee, Ill., U.S.A.

¹⁾ Dédié au Prof. K. BERNHARD à l'occasion de son 60^e anniversaire.

²⁾ C. B. LAURELL & B. INGELMAN, *Acta chem. scand.* **1**, 770 (1947).

³⁾ R. C. WARNER & I. WEBER, *J. biol. Chemistry* **191**, 173 (1951); R. C. WOODWORTH & A. L. SCHADE, *Arch. Biochemistry Biophysics* **82**, 78 (1959).

⁴⁾ B. BLANC & H. ISLIKER, *Bull. Soc. Chim. biol.* **43**, 929 (1961); J. MONTREUIL, J. TONNELAT & S. MULLET, *Biochim. biophys. Acta* **45**, 413 (1960).

⁵⁾ J. MONTREUIL, J. TONNELAT & S. MULLET, *Biochim. biophys. Acta* **45**, 413 (1960).

⁶⁾ P. KISTLER, Hs. NITSCHMANN, A. WYTTEBACH, M. STUDER, Ch. NIEDERÖST & M. MAUERHOFER, *Vox Sanguinis* **5**, 403 (1960).

⁷⁾ M. L. GROVES, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 3345 (1960).

Relation entre la teneur en fer des ferriprotéines et la valeur de l'extinction à 455 m μ . Les ferriprotéines transporteuses possèdent un maximum d'absorption entre 452 et 470 m μ . La valeur absolue de l'extinction est en relation directe avec la quantité de fer fixée par la protéine et l'intensification de la coloration du complexe fer-protéine. Lorsque la capacité totale de fixation de fer par la protéine est atteinte (saturation), il n'y a plus de changement de couleur ni de variation de l'extinction.

Sur ces constatations sont basées des méthodes directes d'estimation de la teneur en fer d'une ferriprotéine et de sa capacité de fixation de fer supplémentaire (VENTURA⁸); SHADE & CAROLINE⁹).

Nous avons établi le comportement de la transferrine humaine isolée, en solution à 0,65% et privée préalablement d'une partie de son fer, lors d'additions successives de fer (sous forme de FeSO₄, (NH₄)₂SO₄ dont le Fe²⁺ est évidemment oxydé par l'air en Fe³⁺) jusqu'à obtention du maximum d'absorption observé dans nos conditions d'expérimentation à 455 m μ . Les lectures ont été faites 5 min après chaque adjonction. La sérualbumine humaine (SAH) a servi de témoin.

La figure 1 montre l'influence du NaHCO₃ et du tampon citrate sur la formation du complexe coloré et permet de repérer le degré de libération de fer, obtenu pour les diverses ferriprotéines étudiées dans nos expériences utilisant le fer radioactif.

La courbe de gauche, obtenue en tampon 0,02M en phosphate et 0,005M en NaHCO₃, pH 6,5, est d'allure rectiligne jusqu'au point de saturation ($E_{455m\mu}^{1cm} = 0,525$) correspondant à 30 μ g de fer ajoutés. C'est la courbe de référence. Les cuvettes contenant 3,8 ml, cela équivaut à 1,21 μ g de fer par mg de transferrine, ce qui correspond à la valeur de 1,25 indiquée par KOECHLIN¹⁰).

Dans le tampon phosphate 0,02M, pH 6,5, seul, le point de saturation est atteint déjà avec 20 μ g de fer ($E_{455m\mu}^{1cm} = 0,218$). L'introduction de 5 mmoles de NaHCO₃ dans le milieu a élevé le coefficient d'extinction qui, à 30 μ g de fer, rejoint presque le niveau de 0,5 environ atteint par la courbe de référence.

Lorsque la transferrine se trouve en tampon citrate 0,1M, pH 6,5 (tampon de l'expérience II utilisant du fer radioactif), la formation du complexe est fortement inhibée. Il y a compétition entre le chélateur et la protéine pour le fer et seule une faible proportion de ce dernier (1/5 environ) se lie à la protéine. L'adjonction de 5 mmoles de NaHCO₃ a cependant pour effet d'élever les coefficients d'extinction de 0,11 à 0,25.

Les coefficients d'extinction (voir partie droite de la figure 1) des ferriprotéines avant le début des expériences ont été mesurés en milieu phosphate 0,02M, pH 6,5, contenant 5 mmoles de NaHCO₃, comme pour la courbe de référence à 0,65%. Pour les expériences des types I et III, (voir plus loin) la concentration protéique a été ultérieurement abaissée, respectivement à 0,55 puis 0,1%.

Les précautions qu'exigent les manipulations des substances radioactives n'ont pas permis de mesurer les coefficients $E_{455m\mu}^{1cm}$, après couplage du ⁵⁹Fe aux protéines ci-dessus, à la fin de l'expérience.

Dissociation du fer lié aux ferriprotéines. Les ferriprotéines des solutions réceptrices ont été soumises au préalable à la libération de fer la plus poussée compatible avec une non-dénaturation protéique. Pour cela nous avons combiné l'effet du pH, de réducteurs et de chélateurs, en dialysant 1 volume de solution de ferriprotéine à 0,65% contre 100 volumes environ du tampon: citrate 0,1M, pH 4,5, 10⁻⁶M en chlorhydrate de L-cystéine et 20 · 10⁻⁶M en chlorhydrate de phénantroline. Par 5 dialyses successives de 8 h chacune, le dialysat étant de moins en moins coloré par le complexe fer-phénantroline, le taux en fer de la *transferrine humaine* (TRH) a été considérablement abaissé. On peut en repérer la valeur obtenue après dialyse contre tampon phosphate 0,02M, pH 6,5 + NaHCO₃ par comparaison avec la courbe de référence (1re à gauche sur la figure 1) donnant la relation entre teneur en fer et extinction: dans les trois types d'expériences, les coefficients respectifs $E_{455m\mu}^{1cm}$ étaient de 0,111, 0,132 et 0,087. Ils ont été notés dans la partie droite de la figure 1 (l'échelle pour $E_{455m\mu}^{1cm}$ est partout la même).

⁸) S. VENTURA, J. clin. Path. 5, 271 (1952).

⁹) A. L. SHADE & L. CAROLINE, Science 104, 340 (1946).

¹⁰) B. A. KOECHLIN, J. Amer. chem. Soc. 74, 2649 (1952).

Dans les mêmes conditions la lactotransferrine humaine (LFH) présenta un coefficient $E_{455m\mu}^{1cm}$ de 0,195 (voir figure 1, partie de droite, sous II). Afin d'abaisser la teneur en fer de cette ferriprotéine et de son homologue lactique bovine (LFB) à des montants comparables à ceux de la transferrine, lors des essais suivants, on a eu recours à une préparation de desferri-ferrioxamine (Desferrine, lot 29837 Ba, CIBA S.A., Bâle).

Par deux dialyses de 8 h chacune contre une solution du tampon: citrate 0,1M, pH 3,5, 10^{-3} M en desferri-ferrioxamine (p. mol. voisin de 600), on obtient pour les lactotransferrines humaines et bovines des valeurs d'extinction à 455 m μ du complexe fer-protéine très voisines entre elles et très proches de celle de la transferrine (voir figure 1, partie droite, colonnes I et III).

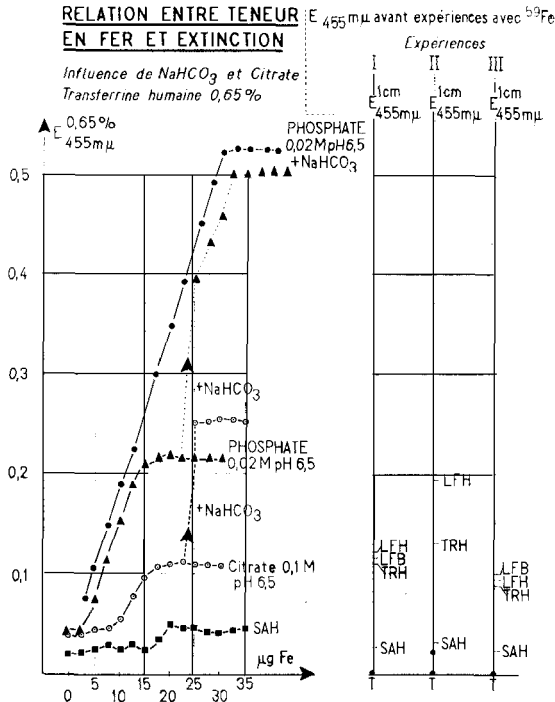


Fig. 1. Relation entre la teneur en fer des ferriprotéines et l'intensité de la coloration du complexe fer-protéine mesurée par l'extinction à 455 m μ

A gauche: influence de l'adjonction progressive de fer sous forme de FeSO₄, (NH₄)₂SO₄ sur le coefficient d'extinction de transferrine à 0,65% en solution et dans les tampons citrate 0,1M, pH 6,5 et phosphate 0,02M, pH 6,5 avant et après l'adjonction de 5 mmoles de NaHCO₃. SAH: solution témoin de sérumalbumine humaine à 0,65% dans le tampon phosphate 0,02M, pH 6,5 + 5 mM NaHCO₃.

On remarque l'acroissement de $E_{455m\mu}^{0,65\%}$ après l'adjonction de NaHCO₃, l'influence défavorable du citrate et, pour toutes les courbes, apparition de la saturation de la capacité de fixation du fer par la protéine (partie horizontale des courbes).

A droite: comparaison des coefficients d'extinction des ferriprotéines avant les expériences de transfert de fer radioactif types I, II et III. Concentrations respectives des solutions protéiques: 0,55%, 0,65% et 0,1%. LFH: lactotransferrine humaine; LFB: lactotransferrine bovine; TRH: transferrine humaine; SAH sérumalbumine humaine (témoin); T: tampon solvateur.

Le découplage partiel du fer de la *ferritine* a été réalisé selon MICHAELIS¹¹⁾ et GRANICK & MICHAELIS¹²⁾, par réduction au moyen de dithionite de sodium sous azote dans tampon acétate de pH 4,6, puis formation d'un complexe coloré avec l' α, α' -dipyridyle et dialyse jusqu'à disparition de la coloration dans le dialysat.

De cette façon, la teneur initiale en fer de la *ferritine* (22,5%) a été abaissée à 4,2%. On ne saurait cependant comparer sans autre l'extinction à 455 $\mu\mu$ de la *ferritine* à celle d'autres ferriprotéines dans lesquelles le taux en fer et le mode de liaison sont foncièrement différents.

Technique de dialyse pour les expériences de transfert. Dans le tube à essai (\varnothing int. 15 mm, épaisseur des parois 1,5 mm, longueur 100 mm) on dépose 2,4 ml de solution réceptrice de ⁵⁹Fe additionnée de 0,05 ml de thiomersal 1% (éthylmercurithio-salicylate de Na). Avant le début de l'essai la radioactivité du tube et de son contenu est déterminée dans le compteur à scintillation «Tracerlab» utilisé avec un appareil de mesure FRIESEKE & HOEPFNER, Erlangen. On obtient ainsi la mesure radioactive témoin, supérieure de 100 cpm environ à celle du bruit de fond du compteur vide, oscillant entre 300 et 350 cpm.

La solution donatrice de ⁵⁹Fe est déposée à l'intérieur d'un sac de dialyse (8/32 in. de la VISKING CORPORATION, Chicago, U.S.A.) fixé sur un support *ad hoc* assurant une étanchéité parfaite.

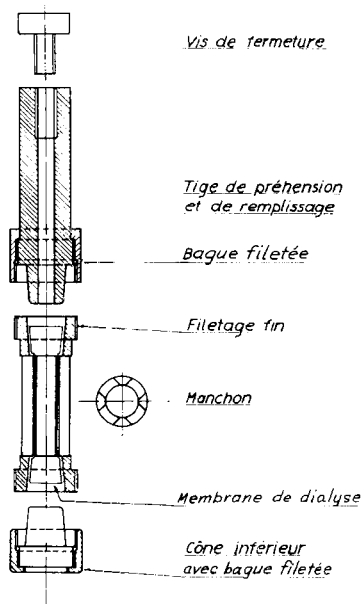


Fig. 2. Support pour membranes dialysante (échelle 2:1)

La membrane de dialyse (VISKING 8/32 in.) est placée dans le manchon. La mise en place du cône inférieur et de la tige de préhension, maintenus au manchon par des bagues filetées, assurent une parfaite étanchéité, la membrane dialysante elle-même jouant le rôle de joint. Le produit (radioactif) est introduit au moyen d'une seringue par le canal central de la tige de préhension. Une vis permet d'obturer le canal dans sa partie supérieure. Des espaces libres sont ménagés sur toute la hauteur du manchon. Ainsi le processus de dialyse n'est pas ralenti.

Le dispositif imaginé (v. fig. 2) permet:

1. de maintenir béants les sacs, qui offrent ainsi tous la même surface de dialyse; le sac de dialyse est maintenu entre deux cônes serrés sur des contre-cônes par des bagues filetées;

¹¹⁾ L. MICHAELIS, *Adv. Protein Chemistry* **3**, 53 (1947).

¹²⁾ S. GRANICK & L. MICHAELIS, *J. biol. Chemistry* **147**, 91 (1943).

2. de faciliter le remplissage du sac par la solution donatrice radioactive: à travers le canal central de la partie supérieure de notre support, il est aisé d'introduire l'aiguille de la seringue de précision permettant la mesure exacte de 0,5 ml;

3. de diminuer grandement les dangers de contamination radioactive lors de la séparation sac-solution réceptrice, nécessaire lors de chaque mesure. En effet la forme et le maintien de ce support pour sac de dialyse permet la préhension du sac par une pince à longue portée.

Après avoir mesuré la radioactivité initiale des sacs on les immerge selon un ordre déterminé et à des intervalles réguliers dans les tubes contenant les solutions de ferriprotéines réceptrices.

Les tubes complets sont alors immédiatement soumis à une rotation de 60 t/min sur un plan incliné à 30°. Les concentrations protéiques à l'intérieur des sacs et dans les solutions extérieures ont été ajustées aux mêmes valeurs. Après des temps de contact égaux, et dans l'ordre adopté lors de leur mise en contact, les sacs sont retirés de leur solution, pour la mesure de leur radioactivité dans le compteur à scintillation. Sacs et solutions sont mesurés séparément; parfois l'activité totale a été également prise en considération.

Les cpm lus sont corrigés pour tenir compte des variations du bruit de fond (BF) radioactif, et pour les solutions, de leur radioactivité initiale (RI). Ainsi: $\text{valeur corrigé} = \text{valeur lecture} - (RI - BF)$.

Ces valeurs corrigées sont extrapolées au temps 0 du début de l'expérience, la période du ^{59}Fe étant admise à 45,1 jours selon SULLIVAN¹³⁾.

A la fin des essais, le ^{59}Fe de tous les produits radioactifs de déchet a été retenu sur une colonne de Dowex-50/8 (forme H⁺).

Autoradiographies. Après électrophorèse en gélose ou sur papier ou encore après immunoelectrophorèse des solutions radioactives de ferriprotéines, nous avons procédé à des autoradiographies avec une durée de contact de 2 et 20 jours suivant l'intensité radioactive des produits étudiés (papier «KODAK Medical X-Ray Film No-Screen»). Le développement a été exécuté selon les indications du fabricant.

Expériences de transfert. Comme substance donatrice de fer radioactif, nous avons utilisé une préparation de ^{59}Fe -transferrine commerciale (« ^{59}Fe -Iron globulin complex sterile» des laboratoires ABBOT, North Chicago, Ill., U.S.A., du lot FGC-015-1) contenant 13,8 mg de protéine par ml et 80,55 $\mu\text{C}/\text{ml}$, avec une activité spécifique de 14,3 $\mu\text{C}/\text{mg}$. Une électrophorèse de contrôle sur papier de cette préparation a révélé une fraction unique en position β_1 ; l'enregistrement de la radioactivité le long du trajet électrophorétique montre que le sommet de la radioactivité due au fer correspond à la position de la fraction protéique (voir fig. 3).

La correspondance suivante a été notée dans la solution initiale légèrement diluée: 1 ml contenant 7 mg de transferrine et 6 μg de fer possède une radioactivité de 6 500 000 cpm correspondant à environ 40 μC .

Nous avons procédé à trois types d'expériences.

Type I. Transfert du fer de ^{59}Fe – transferrine à diverses ferriprotéines en milieu phosphate. Des solutions suivantes de ferriprotéines ont été utilisées (concentration: 0,55 g/100 ml dans tampon phosphate 0,1M, pH 6,5):

1. lactotransferrine humaine (LFH), $E_{455\text{m}\mu}^{1\text{cm}}$ au début 0,119;
2. lactotransferrine bovine (LFB), $E_{455\text{m}\mu}^{1\text{cm}}$ au début 0,115;
3. transferrine humaine (TRH), $E_{455\text{m}\mu}^{1\text{cm}}$ au début 0,112;
4. ferritine équine (FRE), $E_{455\text{m}\mu}^{1\text{cm}}$ au début 2,0.

Les extinctions initiales à 455 m μ permettent de comparer les quantités de fer lié aux diverses protéines avant l'expérience; ces points sont reportés sur la partie droite de la figure 1. Une solution de sérumalbumine humaine a servi de témoin pour l'absorption non spécifique du fer sur les protéines. Enfin l'emploi du tampon phosphate seul a permis de mettre en évidence la quantité de ^{59}Fe non liée ou qui spontanément diffusait à l'extérieur du sac contenant la ^{59}Fe -transferrine. Les activités des sacs au début et à la fin de l'expérience sont reportés sur la figure 4 (v. légende): avec les ferriprotéines utilisées, on remarque une élévation de la radioactivité, qui atteint, après

¹³⁾ W. H. SULLIVAN, «Trilinear chart of nuclides». Atomic Energy Commission USA, 2^e édition, 1957.

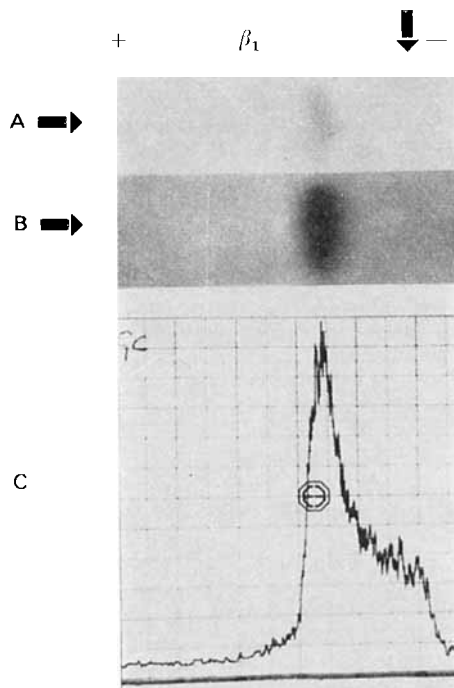


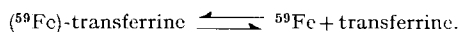
Fig. 3. Spécificité de la liaison du ^{59}Fe à la transferrine

A: électrophorèse sur papier de la transferrine liée au ^{59}Fe , utilisée pour les expériences de transfert; la coloration à l'azocarmin montre l'homogénéité de la transferrine employée (zone β_1).

B: autoradiographie obtenue après contact de 3 jours, avec l'électrophérogramme décrit sous A; la radioactivité coïncide avec la position de la transferrine.

C: enregistrement de la radioactivité de l'électrophérogramme de la transferrine. Le pic, important, correspond à l'emplacement de la fraction protéique.

un ralentissement momentané, un plateau définitif d'équilibre à partir de la 65^e heure. Afin de montrer que le plateau atteint ne signifiait pas la saturation en fer pour nos solutions, ce qui eût été impossible avec les doses utilisées (0,5 ml à 0,55% de protéine contenant 0,10-0,12% de fer à l'intérieur du sac ne peuvent saturer 2,4 ml de solution de ferriprotéines à la même concentration privées initialement de leur fer¹⁴), nous avons à la 90^e heure immergé de nouveaux sacs de dialyse. Cela a eu pour effet d'élever à nouveau les radioactivités des solutions extérieures, mais un équilibre n'a pas tardé à se manifester. On peut expliquer l'allure des courbes et l'apparition du plateau final d'équilibre de la manière suivante: au début, la transferrine du sac contient seule du fer en concentration normale tandis que les ferriprotéines des solutions en sont privées; celles-ci captent donc avec avidité le fer radioactif libéré par la réaction:



Les sacs de ferriprotéine donatrice de ^{59}Fe (^{59}Fe -transferrine) ont été renouvelés à la 90^e heure; un trait vertical sépare les deux parties de l'expérience. La zone du rectangle hachuré est agrandie en dessus et légèrement à droite ce qui permet de mieux apprécier la position respective des points des différentes courbes au cours des 5 premières heures. Les positions respectives des extinctions (E) à 455 m μ des ferriprotéines au début peuvent être repérées graphiquement sur la figure 1.

¹⁴) Avec des ferriprotéines non privées de leur fer, il aurait fallu - d'après les résultats d'essais préliminaires - étendre les expériences à plusieurs semaines, ce qui est incompatible avec la stabilité des préparations étudiées.

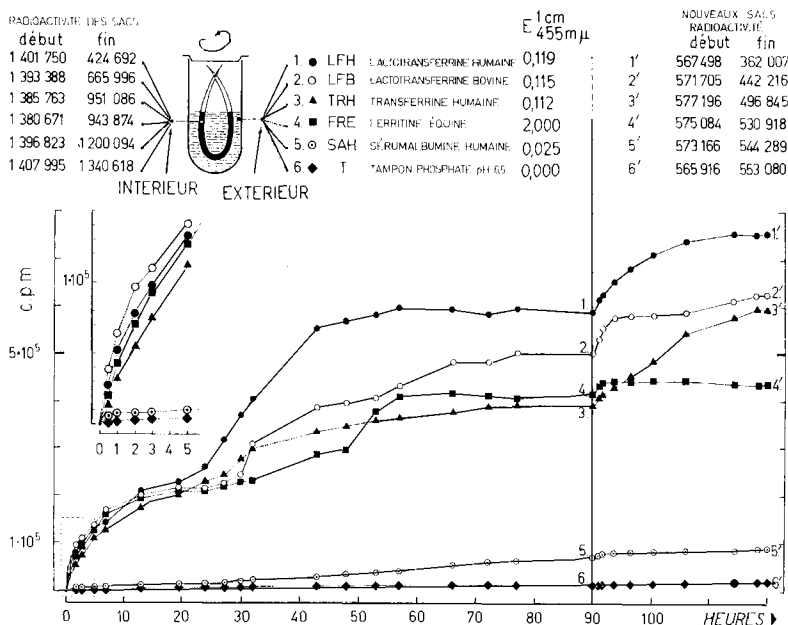


Fig. 4. Expérience du type I

Transfert du fer de ⁵⁹Fe-transferrine humaine en milieu phosphate, 0,1M, pH 6,5, aux principales ferriprotéines en solution à 0,55% : lactotransferrine humaine (LFH, courbes 1-1'), lactotransferrine bovine (LFB, courbes 2-2'), transferrine humaine (TRH, courbes 3-3'), ferritine équine (FRE courbes 4-4'), sérumalbumine (SAH, courbes 5-5') et le tampon phosphate 0,1M, pH 6,5 (T, courbes 6-6').

Résultats des expériences du type I. Un des produits de dissociation du complexe étant séquestré immédiatement et au fur et à mesure de sa libération, l'équilibre de la réaction est déplacé vers la droite. La radioactivité due au fer se stabilise pour chaque protéine à un niveau différent, niveaux d'autant plus élevés que la constante d'association de la protéine avec le fer est plus grande. Ceci est confirmé par le fait que plus la solution extérieure a capté de fer, moins le sac correspondant en contient à la fin de l'expérience, et inversement.

A la 90^e heure, la radioactivité de la transferrine humaine était légèrement inférieure à celle de la ferritine; les activités observées dans les nouveaux sacs ont permis d'établir l'ordre d'affinité (A) suivant, que nous rencontrerons aussi dans les autres types d'expériences:

$$A_{LFH} > A_{LFB} > A_{TRH} > A_{SAH}$$

Type II. Transfert du fer de ⁵⁹Fe-transferrine à diverses ferriprotéines en milieu citrate. L'influence du citrate, agent chélateur présent normalement dans les liquides biologiques, sur les transferts du fer entre les principales ferriprotéines a été examiné dans ce type d'expérience. Nous avons adopté le pH 6,5 et la molarité 0,1M du tampon phosphate des expériences du type I, ce qui nous a permis de préparer les solutions suivantes de ferriprotéines à 0,65% :

- lactotransferrine humaine (LFH), E^{1cm}_{455mμ} au début 0,193 (fig. 1);
- transferrine humaine (TRH), E^{1cm}_{455mμ} au début 0,133 (fig. 1);
- ferritine équine (FRE), E^{1cm}_{455mμ} au début 2,0 (fig. 1).

Une solution de sérumalbumine à 0,65% et le tampon citrate lui-même ont été utilisés comme contrôles. La figure 5 donne les résultats obtenus au cours de 127 heures de dialyse.

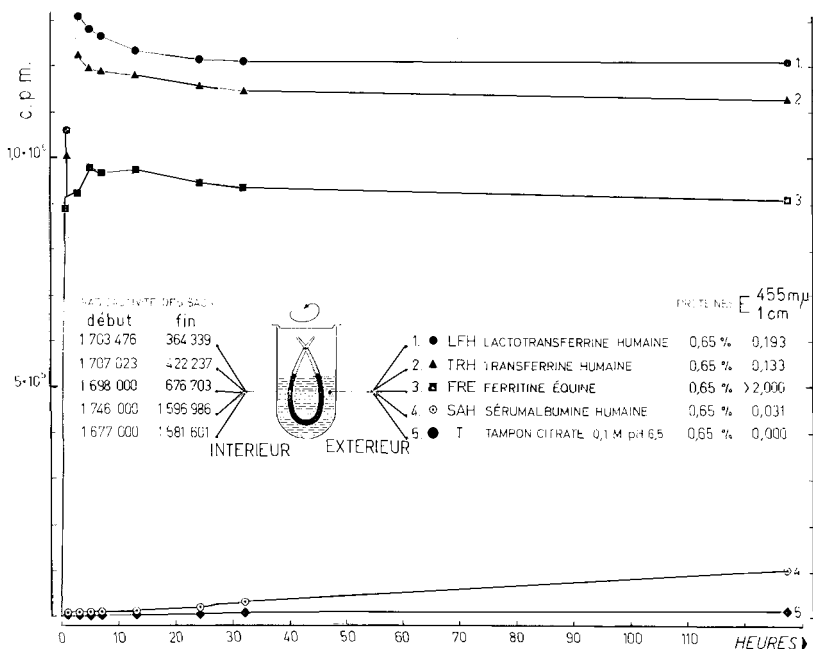


Fig. 5. Expérience du type II

Transfert du fer de ^{59}Fe -transferrine en milieu citrate 0,1M, pH 6,5, contenue dans les sacs, par dialyse de 127 h, aux ferritoprotéines suivantes en solution à 0,65% : 1. lactotransferrine humaine (LFH); 2. transferrine humaine (TRH); 3. ferritine équine (FRE). Comportement des solutions de contrôle: sérumalbumine (SAH) (voir courbe 4) tampon (T) (voir courbe 5). La radioactivité des sacs est donnée au début et à la fin de l'expérience. Les extinctions correspondantes peuvent être repérées graphiquement sur la figure 1.

Résultats des expériences du type II. On constate d'emblée un transfert considérable de radioactivité des sacs aux solutions sauf dans la solution extérieure du tampon seul et dans celle du témoin sérumalbumine, dont les radioactivités se maintiennent à des niveaux très bas garantissant ainsi la spécificité des résultats obtenus avec les ferritoprotéines. En trois heures la lactotransferrine humaine (LFH) et la transferrine humaine (TRH) ont atteint leur maximum de radioactivité. Il faut 5 h à la ferritine équine pour s'élever à $9,849 \cdot 10^5$ cpm. A la 5^e heure on a mesuré une activité de $1,282 \cdot 10^6$ cpm pour LFH et de $1,198 \cdot 10^6$ cpm pour TRH. En poursuivant la dialyse on a observé légère une régression des valeurs, de l'ordre de 15%, difficile à expliquer puisque les mesures de radioactivité ont été extrapolées au temps 0. Comparée à la fixation non spécifique du fer sur la sérumalbumine, l'affinité des ferritoprotéines pour ce métal est nettement supérieure. La même série d'affinité (A) décroissante se retrouve ici:



Ainsi le citrate n'a pas modifié la fixation différentielle du ^{59}Fe par la série de ferritoprotéines prises en considération, mais a exagéré les différences et accru la rapidité des échanges.

Type III. Transfert du fer de ^{59}Fe -transferrine à diverses ferritoprotéines par l'intermédiaire d'un manchon de ferritine. Pour étudier l'influence de la ferritine sur le transfert du fer *in vitro* d'une ferritoprotéine à l'autre, nous avons intercalé entre le sac donateur et la solution, un second sac de dialyse d'un diamètre très légèrement supérieur au premier et séparé de celui-ci par un treillis de nylon (toile n° 220, fabricant: G. BOPP & Co, Zurich 46). Les deux sacs étaient maintenus concentriquement dans le support *ad hoc* (voir fig. 3). Dans l'espace restreint ménagé entre eux,

on a déposé 0,1 ml de solution de ferritine à 0,5% ou, comme contrôle de l'efficacité de la ferritine, 0,1 ml de solution de sérualbumine humaine à 0,04%. Ces solutions intermédiaires constituaient des manchons à travers lesquels devaient se faire les échanges du sac aux solutions habituelles hors des sacs.

La substance donatrice était la transferrine humaine marquée au ⁵⁹Fe déjà décrite. Les prises étaient constituées par 2,4 ml de solution de ferriprotéine à 0,1% (voir fig. 6). L'influence d'un manchon de ferritine (solution 1) ou de sérualbumine (solution 2) a été examinée sur la lactotransferrine humaine, comparée par ailleurs à la lactotransferrine bovine (solution 3) et à la transferrine humaine (solution 4), ces deux dernières avec manchon de ferritine. La sérualbumine (solution 5) avec manchon de sérualbumine, et le tampon phosphate 0,1M pH 7,4 (solution 6) avec manchon de ferritine, ont servi de témoins.

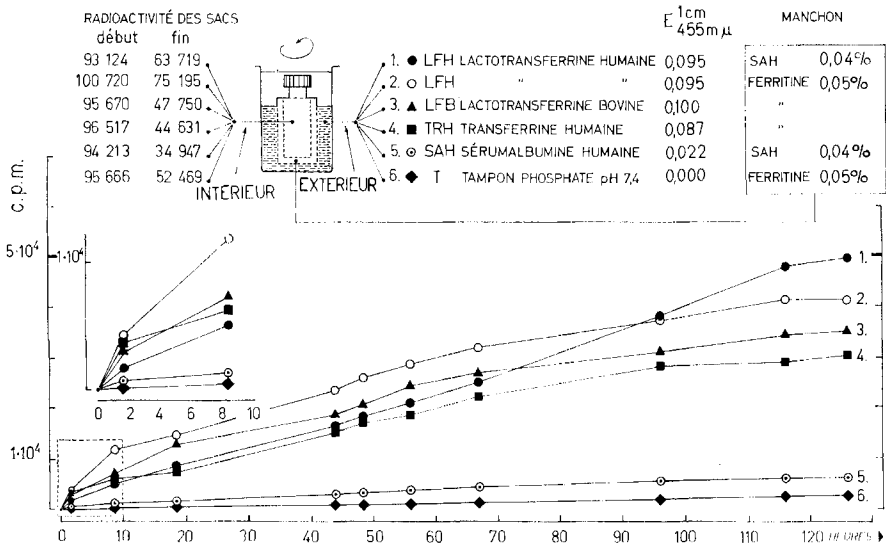


Fig. 6. Expérience du type III

Transfert du fer de ⁵⁹Fe-transferrine (sac donateur par dialyse à travers un manchon (concentrique au sac) contenant 0,1 ml de ferritine 0,05% ou 0, 1 ml de sérualbumine à 0,04%, aux ferriprotéines principales en solution à 0,1% : 1. lactotransferrine humaine (LFH) avec manchon de sérualbumine (SAH); 2. lactotransferrine humaine (LFH) avec manchon de ferritine; 3. lactotransferrine bovine (LFB) avec manchon de ferritine; 4. transferrine humaine (TRH) avec manchon de ferritine. Les contrôles: 5. sérualbumine (SAH) et 6. tampon phosphate 0,1M, pH 7,4, ont respectivement des manchons de sérualbumine et de ferritine.

La position des différentes courbes au cours des 10 premières heures (rectangle hachuré) est détaillée dans un graphique superposé. La radioactivité des sacs est donnée au début et à la fin de l'expérience. Les positions des extinctions peuvent être repérées graphiquement sur la figure 1.

Résultats des expériences du type III.

1. Le manchon de ferritine a pour effet d'accélérer au début le transfert du fer de la transferrine du sac à la lactotransferrine humaine (LFH) de la solution 2.

2. Cependant dès la 96^e heure la solution 1 de lactotransferrine humaine dans laquelle le fer diffuse par l'intermédiaire d'un manchon témoin de sérualbumine présente une radioactivité supérieure à celle de la solution 2.

3. Le manchon de ferritine ne modifie pas l'ordre des affinités globales des diverses ferriprotéines établi lors des précédentes expériences.

4. Le tampon n'a pas capté significativement plus de fer libre dans cet essai avec manchon de ferritine que dans les expériences précédentes.

5. De nouveau on note la relation inverse entre l'importance de la radioactivité finale dans la solution et dans le sac correspondant. Ainsi le manchon de ferritine, capable d'accélérer le passage du fer et de favoriser son échange, maintient captif une certaine partie de celui-ci. La ferritine utilisée n'a pas été privée de fer avant l'expérience, mais sa capacité de fixation est si élevée qu'elle a encore été capable d'en retenir.

Discussion

Nos expériences de transfert du ^{59}Fe à diverses ferriprotéines montrent que l'affinité de la ferritine dépositaire pour le fer est inférieure à celle des protéines transporteuses. Ces dernières se classent comme suit par ordre d'affinité décroissante pour le fer:

lactotransferrine humaine > lactotransferrine bovine > transferrine humaine

La petitesse des quantités de fer respectivement libre ou lié à la sérumalbumine met en évidence la nécessité d'un substrat protéique spécifique pour les échanges de fer. Le contrôle de la fixation effective du ^{59}Fe sur les ferriprotéines des solutions extérieures a été réalisé par autoradiographie des immuno-électrophorèses.

La figure 7 met en évidence l'adsorption non spécifique faible du fer sur la sérumalbumine et la fixation spécifique forte du fer sur la transferrine. Les figures 7A et

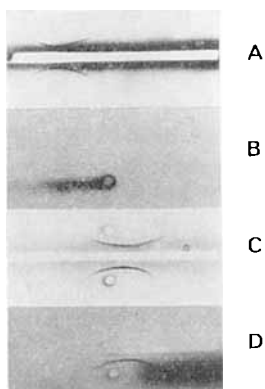


Fig. 7. Fixation non spécifique faible du fer sur la sérumalbumine, fixation spécifique forte du fer sur la transferrine

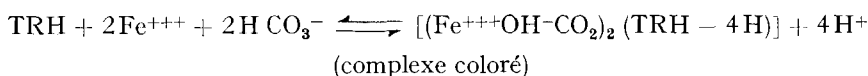
Immunoélectrophorèse de sérumalbumine en A, ou de transferrine en C, révélées par un immunosérum anti-sérum humain normal. On a placé des protéines avant la fixation de ^{59}Fe dans les réservoirs supérieurs, et après celle-ci, dans les réservoirs inférieurs.

L'autoradiographie B correspondant à l'immuno-électrophorèse de la sérumalbumine présente une faible trace radioactive. L'autoradiographie D correspondant à l'immuno-électrophorèse de la transferrine présente au contraire une forte trace de radioactivité. Seules les protéines prélevées après leur mise en contact avec le ^{59}Fe ont présenté des traces de radioactivité.

7C présentent des immuno-électrophorèses respectivement de sérumbumine et de transferrine, révélées par un immunsérum anti-sérum humain normal. Dans ces expériences les réservoirs supérieurs contenaient les protéines avant le début de l'expérience de transfert (type I), et les réservoirs inférieurs, les mêmes solutions protéiques à la fin de l'expérience. Les autoradiographies 7B et 7D présentent des traces de radioactivité uniquement dans les cas (réservoirs inférieurs) des protéines ayant été en contact avec le ^{59}Fe . L'autoradiographie B correspondant à l'immuno-électrophorèse de la sérumbumine, présente une très faible trace radioactive, reflet des basses valeurs de radioactivité mesurées avec cette protéine et de la fixation non spécifique du fer. Par contre l'autoradiographie D correspondant à l'immuno-électrophorèse de la transferrine montre un marquage spécifique et très fort de la ferriprotéine par le ^{59}Fe . Le fait que cette solution de transferrine réagit encore parfaitement après l'expérience témoigne du maintien, au cours de celle-ci, de l'intégrité protéique.

Mais dans les associations du fer aux ferriprotéines définies plus haut, d'autres facteurs peuvent intervenir et modifier dans une large mesure la rapidité et la valeur absolue des échanges. Plusieurs possibilités se présentent d'agir *in vitro* sur l'ensemble fer-ferriprotéines privées de la plus grande partie de leur fer: pH, agents réducteurs, HCO_3^- , chélateurs.

L'équation proposée par LAURELL¹⁵⁾ pour la formation du complexe peut expliquer nos observations avec HCO_3^- et le citrate:



L'hydrogénocarbonate fait partie intégrante du complexe en quantité équimoléculaire et une carence en ce composé en empêche la formation.

Le rôle des chélateurs est important. Le citrate en particulier séquestre le fer trivalent pour former lui-même un complexe, non coloré cependant, et favorise la dissociation du complexe fer-transferrine. Il agirait comme transporteur de Fe d'une protéine à l'autre. Une influence semblable du citrate sur la dissociation du ^{59}Fe de la transferrine sérique du Rat a été observée par CHARLEY *et coll.*¹⁶⁾. D'autres chélateurs, tels la phénanthroline et l'acide éthylènediamine-tétracétique sont utilisés par ces auteurs qui confirment nos résultats.

L'application de nos résultats au cas de l'animal vivant, avec les restrictions que l'on se doit d'évoquer dans ce genre d'extrapolation, permet d'éclairer plusieurs points du métabolisme martial. Ainsi lors de la résorption duodénale du fer déjà, les chélateurs et réducteurs de la nourriture agissent dans le même sens que ceux qui ont favorisé *in vitro* le transfert du ^{59}Fe d'une ferriprotéine à l'autre ou permis sa dissociation des formes liées. La transferrine privée de fer s'est montrée capable de soustraire le métal à la transferrine liée au fer, ce qui permet de rendre compte des transports physiologiques de ce métal par cette protéine (expérience du type I). De plus,

¹⁵⁾ C. B. LAURELL, *Acta physiol. scand.* 14, Suppl. 46 (1947).

¹⁶⁾ P. CHARLEY, M. ROSENSTEIN, E. SHORE & P. SALTMAN, *Arch. Biochemistry Biophysics* 88, 222 (1960).

l'affinité de la ferritine s'est révélée plus faible que celle de la transferrine partiellement dissociée, ce qui indique la possibilité pour cette dernière de prélever du fer dans les dépôts de ferritine et d'hémosidérine hépatiques ou spléniques (expériences des types I et II). La ferritine de son côté peut également capter, à partir de la ^{59}Fe -transferrine proche de la saturation, une partie du fer que celle-ci cède facilement, ce qui explique la formation des dépôts (expérience du type III).

Lors d'une étude ultérieure des modalités de transfert du ^{59}Fe aux tissus et liquides biologiques nous aurons l'occasion de faire intervenir les données de base présentées ici et d'en indiquer d'autres prolongements d'intérêts physiologiques¹⁷⁾.

Remerciements. Nous remercions le Professeur H. AEBI de l'aimable hospitalité dans son institut; nous remercions également le D^r H. KELLER, Hôpital de Belp, et le D^r G. PORETTI, Laboratoire des Isotopes, Hôpital de l'Île, Berne, d'avoir mis à notre disposition leurs installations de mesure de radioactivité.

SUMMARY

The exchange of ^{59}Fe between various 'ferriproteins' has been studied by equilibrium dialysis. The affinity (A) of the proteins for iron decreases in the following order:

$$A_{\text{human lactotransferrin}} > A_{\text{bovine lactotransferrin}} > A_{\text{human transferrin}} > A_{\text{equine ferritin}}$$

Ferritin has been claimed to play an important part for the *in vivo* transfer of iron. No such effect has been observed in our *in vitro* experiments: the sequence of the affinities for iron remains in the same order: human lactotransferrin, bovine lactotransferrin, human transferrin.

On the other hand, chelating agents such as citrate increase the rate of ^{59}Fe exchange as well as the total amount of iron transferred. The sequence of the affinities for iron is not modified by the presence of chelating agents.

The above results explain several particularities of the iron metabolism.

Institut de Biochimie de l'Université de Lausanne
Medizinisch-Chemisches Institut der Universität Bern

¹⁷⁾ B. BLANC & H. ISLIKER, *Helv. physiol. pharmacol. Acta*, sous presse.