

PRÉPARATION ET PROPRIÉTÉS DE LA LACTOSIDÉROPHILINE (LACTOTRANSFERRINE) DU LAIT DE FEMME

JEAN MONTREUIL, JACQUES TONNELAT* ET SUZANNE MULLET

*Laboratoires de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie**
et de la Faculté des Sciences, Lille (France)*

(Reçu le 21 juillet 1960)

SUMMARY

Preparation and properties of lactotransferrin of human milk

The authors describe a method of isolating and purifying from human milk a mucoid that has, like plasma siderophilin, the ability to bind iron reversibly. It differs, however, from siderophilin in its physico-chemical and immunological properties. The authors propose to call this specific protein: lactosiderophilin or lactotransferrin.

INTRODUCTION

Nous avons entrepris l'isolement des mucoïdes du lait de Femme d'abord par précipitation fractionnée des protéides par le sulfate d'ammonium, puis par chromatographie sur échangeurs d'ions des précipités obtenus. Ce procédé nous a permis d'isoler du lait de Femme le gynolactomucoïde I (voir ref. 1) et les β -2A-globulines². Au cours des fractionnements, nous avions été frappés par la coloration rose saumon de certains filtrats et précipités; cette coloration s'atténueait lors de l'acidification des solutions et s'intensifiait par neutralisation. Cette observation nous a conduits à l'isolement d'un métalloprotéide: le gynolactomucoïde II, qui possède comme la sidérophiline du plasma sanguin la propriété de fixer réversiblement le fer. Il se distingue cependant de la sidérophiline par ses propriétés physiques, chimiques et immuno-chimiques. Nous proposons d'appeler ce mucoïde spécifique du lait de Femme: lactosidérophiline ou lactotransferrine***.

Isolement de la lactosidérophiline

3 l de lait de Femme, délipidés par une centrifugation à 0°, sont neutralisés et additionnés d'un volume égal d'une solution aqueuse saturée de sulfate d'ammonium ajustée à pH 7. Le précipité est séparé par filtration et le filtrat, de teinte rose, est amené à pH 3.8. Après un séjour de 2 à 3 jours à 2°, on élimine par filtration un léger précipité. La solution obtenue est alors ajustée à pH 7 et saturée en sulfate d'ammonium. On recueille un précipité rose saumon ("fraction lactosidérophiline")

* Laboratoire de Biologie Physico-chimique de la Faculté des Sciences de Paris (Directeur: Professeur R. WURMSER).

** Directeur: Professeur P. BOULANGER.

*** Nos résultats ont fait l'objet d'une note préliminaire à l'Académie des Sciences³ (Séance du 22 février 1960).

qui est redissous dans l'eau distillée. La solution est dialysée et lyophilisée. On obtient environ 5 g d'une poudre rose saumon qui renferme 9.7 g d'oses et 2,14 g d'acide sialique pour 100 g. Les études électrophorétiques et immuno-électrophorétiques de cette préparation révèlent la présence d'au moins 4 composants.

Le précipité obtenu est ensuite soumis à un fractionnement sur colonne d'échangeur de cations faiblement acide (Amberlite XE 64; 3.5 × 60 cm; grain 200-400; forme citrate). La résine est préalablement traitée et purifiée selon le procédé décrit par HIRS⁴ et amenée sous la forme citrate selon le mode opératoire de SCHMID *et al.*⁵. On la "stabilise" par le passage d'une solution de citrate trisodique 0.05 M, amenée à pH 5.2 par addition d'une solution d'acide citrique, jusqu'à ce que les pH des solutions effluente et affluente soient identiques. La solution de protéides (2 g dans 20 ml de citrate trisodique 0.05 M), ajustée à pH 5.2, est déposée avec précautions à la surface de la résine et on la laisse s'écouler très lentement (0.5 ml/min). Le développement des

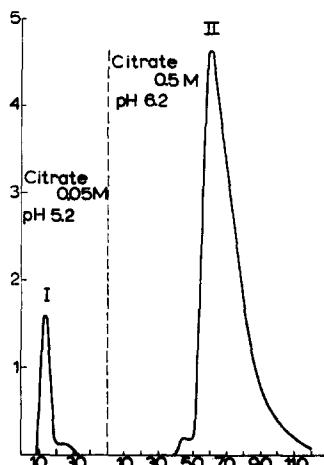


Fig. 1. Chromatographie sur Amberlite XE64 (3.5 × 60 cm; grains 200-400 ; forme citrate) des protéides (2 g) de la "fraction lactosidérophiliné" isolée du lait de Femme par la méthode de relargage par le sulfate d'ammonium. En abscisses: nombre de fractions de 10 ml recueillies; en ordonnées: absorbances mesurées à 278 m μ en cuve de 1 cm d'épaisseur.

protéides est ensuite effectué par passage successif d'une solution de citrate trisodique 0.05 M ajustée à pH 5.2, puis d'une solution de citrate trisodique 0.50 M ajustée à pH 6.2. La Fig. 1 illustre ce mode opératoire. Le contenu des tubes correspondant à chacun des deux pics majeurs est rassemblé et les protéides sont précipités en saturant les solutions en sulfate d'ammonium à pH 3.8. Les précipités obtenus sont dissous dans l'eau distillée et les solutions sont dialysées, puis lyophilisées.

La solution correspondant au pic I fournit 0,3 g environ d'une poudre blanche qui contient une proportion élevée d'oses (22.5 à 29.25 g d'oses/100 g) et d'acide sialique (5.6 à 5.9 g/100 g) et dont le constituant majeur est le gynolactomucoïde I. Elle ne renferme pas de lactosidérophiline.

La solution rose correspondant au pic II fournit de 0.8 à 1 g d'une substance de couleur rose saumon. L'électrophorèse en gélose (tamponnée à pH 8.2) et l'électrophorèse en gel d'amidon (appareil vertical de SMITHIES⁶; tampon boraté discontinu de POULIK⁷) montrent la parfaite homogénéité de la préparation. L'immuno-électrophorèse

en gélose révèle la présence d'un seul arc de précipitation (révélation par un sérum de Lapin antiprotéides du lait de Femme) (Fig. 2).

Propriétés physiques de la lactosidérophiline

Coloration: La lactosidérophiline possède une couleur rose saumon dont la teinte est d'autant plus intense que le chromoprotéide contient plus de fer. Privée du métal, la lactosidérophiline se présente comme une poudre blanche.

Solubilité: La lactosidérophiline est très soluble dans l'eau à pH 7. Elle est précipitée et dénaturée par l'addition de 4 volumes d'éthanol absolu, d'un volume d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 10 g/100 ml, de 3 volumes d'acide sulfosalicylique 0.2 M ou de 10 volumes d'acide perchlorique 1.8 M. Le sulfate d'ammonium précipite une lactosidérophiline, contenant 2.2 g de fer/1000 g, d'une solution aqueuse à 0.5 g/100 ml, à des concentrations comprises entre 60 et 75 % de la saturation à pH 7

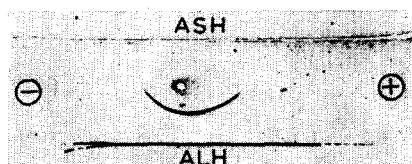


Fig. 2. Immuno-électrophorèse en gélose (tampon vénoral de pH 8.2; durée de l'électrophorèse: 2 h) de la lactosidérophiline (à 2.2 g de fer/1000 g). ALH: sérum de Lapin antiprotéides du lait de Femme; ASH: sérum équin antiprotéides sériques humains.

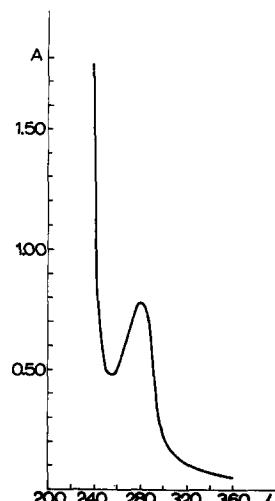


Fig. 3. Spectre d'absorption dans l'u.v. d'une solution à pH 7 de lactosidérophiline saturée en fer (1 g de lactosidérophiline/150 ml d'eau distillée; cuve de 1 cm d'épaisseur). A: absorbances; λ: longueurs d'onde.

(maximum à 67 %), entre 55 et 75 % de la saturation à pH 5 (maximum à 65 %), et entre 50 à 70 % de la saturation à pH 3.8 (maximum à 50 %).

Spectres d'absorption: Les solutions neutres de lactosidérophiline saturée en fer présentent, dans l'u.v., un maximum d'absorption à 278.5 m μ et un minimum d'absorption à 255 m μ (Fig. 3). Le coefficient d'extinction, déterminé à 280 m μ et à pH 7, est de:

$$\frac{10 \text{ mg/ml}}{\epsilon = 1 \text{ cm; } 280 \text{ m}\mu} = 11.7$$

Le spectre d'absorption de la lumière visible varie avec le pH de la solution et avec le degré de saturation en fer de la lactosidérophiline. La Fig. 4 représente les spectres d'absorption d'une solution aqueuse à pH 7 de lactosidérophiline saturée en fer (courbe I) et de la même solution amenée à pH 1.72 (courbe II). Les solutions neutres de lactosidérophiline saturée en fer possèdent un maximum d'absorption à 452.5 m μ et un minimum d'absorption à 414 m μ . Les coefficients d'extinction déterminés à 452.5 m μ sont les suivants:

$$\begin{aligned} \text{at } 10 \text{ mg/ml} &= 0.500 (\pm 0.01) \\ \varepsilon & \quad \text{at } 1 \text{ cm; } 452.5 \text{ m}\mu \\ \text{at } 1 \text{ mg fer/ml} &= 0.0144 (\pm 0.0004) \\ \varepsilon & \quad \text{at } 1 \text{ cm; } 452.5 \text{ m}\mu \end{aligned}$$

Constantes de sédimentation et de diffusion: Les constantes de sédimentation et de diffusion ont été déterminées sur des solutions en tampon phosphate $M/15$ à pH 7.35 d'une préparation de lactosidérophiline renfermant 0.22 % de fer.

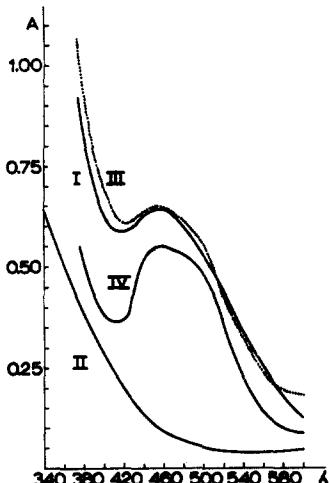


Fig. 4. Spectres d'absorption de la lumière visible par des solutions de lactosidérophiline (cuve de 2 cm d'épaisseur). Courbe I: spectre d'absorption d'une solution neutre à 0.1 g/15 ml de lactosidérophiline saturée en fer. Courbe II: spectre d'absorption de la même solution amenée à pH 1.72. Courbe III: spectre d'absorption de la solution acide précédente ramenée à la neutralité. Courbe IV: spectre de la sidérophiline (d'après FIALA⁸). A: absorbances; λ : longueurs d'onde en $m\mu$.

L'étude des diagrammes d'ultracentrifugation montre l'homogénéité de la préparation (Fig. 5). La mesure de la constante de sédimentation a été effectuée à 20° à l'aide d'une ultracentrifugeuse Spinco modèle E dans une cellule de 12 mm d'épaisseur. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau I.

La constante de diffusion a été mesurée à 20° par la méthode de diffusion libre. Elle possède une valeur de 4.6.

TABLEAU I

Concentration (en grammes/100 ml)	A_{n^*}	S_{20w}
I	$1.79 \cdot 10^{-3}$	4.64
0.5	$0.89 \cdot 10^{-3}$	4.65
—	$0.50 \cdot 10^{-3}$	4.7

* Différence entre les indices de réfraction du tampon et de la solution à la concentration indiquée.

Poids moléculaire: Le poids moléculaire de la lactosidérophiline, calculé à partir des constantes de sédimentation et de diffusion et du volume partiel spécifique (0.735), est de 95,000. Cette valeur est en accord avec le résultat apporté par l'étude de la diffusion de la lumière qui permet d'attribuer au poids moléculaire une valeur du même ordre de grandeur: 89,000 (\pm 3,000).

Mobilité électrophorétique: L'électrophorèse sur papier et l'électrophorèse en gélose effectuées à pH 8.9 (tampon véronal) confèrent à la lactosidérophiline saturée en fer une vitesse de β -globuline. Sa mobilité électrophorétique en veine liquide (Appareil *Aminco*), dans le tampon véronal de pH 8.6 ($\mu = 0.1$), est de $-3.45 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V/sec}$.

Propriétés chimiques de la lactosidérophiline

1. La lactosidérophiline est un métalloprotéide: La teneur en fer a été déterminée par la méthode à l' α , α' -dipyridyle. Elle varie dans de larges proportions suivant les échantillons:

No des échantillons de la lactosidérophiline	Teneur fer (en g/1000 g de la lactosidérophiline)
1	0.480
2	1.196
3	0.640
4	2.200

2. La lactosidérophiline fixe réversiblement le fer: Les variations, en fonction du pH, de l'intensité de la coloration des filtrats provenant du fractionnement du lait de Femme par le sulfate d'ammonium, d'une part, la variabilité de la teneur en fer des différentes préparations de lactosidérophiline, d'autre part, nous ont incités à rechercher une éventuelle propriété de fixation réversible du fer par le composé que nous avions isolé.

Fixation du fer: L'application des différentes méthodes décrites à propos de la sidérophiline nous a permis de démontrer que la lactosidérophiline pouvait fixer, *in vitro*, 6 atomes de fer par molécule.

Nous avons mesuré la capacité de fixation du fer par la lactosidérophiline à l'aide de la méthode colorimétrique décrite par SCHADE ET CAROLINE⁹, qui est fondée sur l'intensification de la coloration des solutions de sidérophiline par l'addition d'un sel de fer. On ajoute progressivement une solution ferrique à une solution du protéide jusqu'à ce que cesse l'accroissement de l'absorption à 452.5 m μ . On déduit la capacité de fixation du métal par la sidérophiline de la teneur initiale en fer et de la quantité de fer ajoutée à la solution. Ce mode opératoire est parfaitement applicable à la lactosidérophiline.

On introduit 7 ml d'une solution, ajustée à pH 7, de 100 mg de lactosidérophiline dans 15 ml d'eau bidistillée. L'absorbance est déterminée à 452.5 m μ . On ajoute 10 μ l d'une solution contenant 5 μ g de fer dans 10 μ l* et l'on mesure l'absorbance de la solution 5 min après chaque addition. On continue ainsi jusqu'à ce que plusieurs additions successives ne modifient plus l'absorbance. On obtient, de cette manière, des courbes caractéristiques dont l'une est reproduite dans la Fig. 6. La capacité de

* La composition de la solution ferrique est la suivante: protosulfate de fer et d'ammonium (sel de Mohr): 875 mg; HCl 6 N: 0.5 ml; eau bidistillée q.s.p. 250 ml.

fixation du fer par la lactosidérophiline, exprimée en grammes/1000 g de protéide, est donnée par la formule suivante:

$$\frac{(p + p')}{P}$$

p : quantité de fer, en μg , contenu dans 7 ml de solution de lactosidérophiline; p' : quantité de fer ajoutée, en μg ; P : quantité de lactosidérophiline dans 7 ml de solution, en mg.

La lactosidérophiline saturée en fer contient 3.47 g (± 0.13) de ce métal/1000 g, soit 6 atomes de fer par molécule.

Réversibilité de la réaction de fixation du fer: L'abaissement du pH par l'addition d'acide chlorhydrique provoque une diminution progressive de la coloration des solutions de lactosidérophiline "native" (Fig. 7). Les solutions prennent une teinte jaune

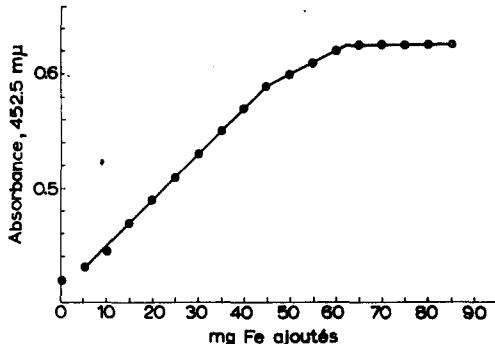


Fig. 6. Courbe de saturation en fer de 7 ml d'une solution neutre de 100 mg de lactosidérophiline renfermant 2.2 μg de fer/mg dans 15 ml d'eau distillée. En ordonnées: absorbances de la solution (mesurées à 452.5 m μ ; cuve de 2 cm d'épaisseur).

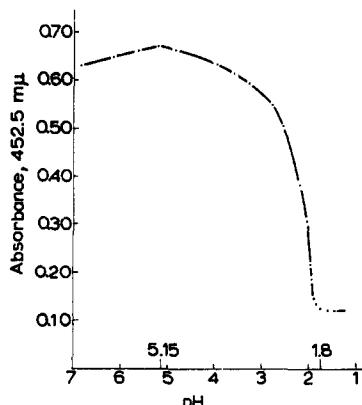


Fig. 7. Courbe de dissociation du complexe fer-lactosidérophiline par l'abaissement du pH d'une solution aqueuse renfermant 100 mg de lactosidérophiline saturée en fer/15 ml d'eau distillée. En ordonnées: absorbances de la solution (mesurées à 452.5 m μ ; cuve de 2 cm d'épaisseur).

à pH 2 et sont pratiquement décolorées à pH 1.75. La dissociation du complexe fer-lactosidérophiline est complète pour cette dernière valeur de pH et le fer peut être totalement éliminé par dialyse: on obtient alors, après lyophilisation de la solution dialysée, un protéide incolore.

La dissociation est réversible, puisque le retour à un pH neutre par l'addition de soude à des solutions de lactosidérophiline préalablement décolorées par l'addition d'acide chlorhydrique fait réapparaître la coloration rose avec son intensité initiale (courbe III de la Fig. 4).

3. La lactosidérophiline est un mucoïde: La lactosidérophiline se révèle intensément, sur les électrophorégrammes sur papier ou en gélose, par la réaction à l'acide périodique-fuchsine de SCHIFF. Cette observation, ainsi que les analogies avec la sidérophiline, nous ont amenés à caractériser et à doser les constituants glucidiques de la lactosidérophiline: les oses* par la méthode à l'orcinol de TILLMANS ET PHILIPPI¹¹,

* L'application de la méthode de chromatographie des oses constituant les glycoprotéides¹⁰ nous a permis de caractériser le galactose, le mannose et le fucose.

modifiée par RIMINGTON¹²; les osamines par la méthode de ELSON ET MORGAN¹³, modifiée par BELCHER *et al.*¹⁴; les acides sialiques par la méthode à la diphénylamine de NIAZI ET STATE¹⁵, modifiée par WERNER ET ODIN¹⁶. Nous avons rassemblé nos résultats dans le Tableau II. Selon la nomenclature de MEYER¹⁷, la lactosidérophiline est donc un mucoïde.

DISCUSSION

Nous avons donc isolé du lait de Femme un mucoïde de coloration rose saumon contenant, lorsqu'il est saturé, 3.5 g de fer/1000 g. Il est différent des chromo- et métallo-protéides caractérisés jusqu'à présent dans le lait de Femme.

En effet, la lactosidérophiline ne possède ni les propriétés physico-chimiques, ni l'activité enzymatique de la lactoperoxidase, chromoprotéide porphyrinique contenant 1 atome de fer par molécule d'enzyme^{18, 19}. Elle est différente des ferrilactines de BLOCK *et al.*²⁰⁻²², qui sont des combinaisons ferriques réversibles de diverses protéines du lait, comme l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline: les ferrilactines sont capables, en effet, de fixer des quantités élevées de fer (jusqu'à 34.2 g de fer/100 g de ferrilactines) et leur coloration varie du blanc au jaune et au brun foncé pour des proportions de fer, respectivement, de 3 à 4 g, 6 à 15 g et 18 à 34.2 g/100 g de ferrilactines.

La lactosidérophiline, dont nous décrivons les propriétés, paraît identique à la métalloprotéine ("iron-containing red protein") caractérisée par JOHANSSON²³ au cours de séparations chromatographiques sur des colonnes de phosphate de calcium de la lactalbumine du lactosérum humain, et récemment isolée dans des conditions analogues par le même auteur²⁴.

La lactosidérophiline et la sidérophiline plasmatique^{25, 26} possèdent quelques caractères communs comme la coloration rose saumon et la capacité de fixer réversiblement le fer. Nous avons pu, cependant, faire la discrimination entre la lactosidérophiline et la sidérophiline grâce aux caractères distinctifs suivants:

1. Certaines propriétés physico-chimiques des deux protéides sont différentes. Le Tableau II est à cet égard très démonstratif. On remarque, en particulier: (a) que la lactosidérophiline contient une proportion de glucides plus élevée et fixe une quantité de fer supérieure; (b) que le complexe fer-lactosidérophiline est plus stable en milieu acide que le complexe fer-sidérophiline et se dissocie à un pH inférieur.

2. La lactosidérophiline possède une vitesse de migration électrophorétique en gel d'amidon inférieure à celle des sidérophilines.

3. La lactosidérophiline est immunologiquement différente de la sidérophiline; elle n'est pas révélée, en immuno-électrophorèse en gélose, par un sérum équin antiprotéides sériques humains (Fig. 2). En outre, l'épuisement de cet anti-sérum par la lactosidérophiline ne fait pas disparaître, des diagrammes d'immuno-électrophorèse de sérum humains, l'arc correspondant à la sidérophiline.

L'importance biologique de la lactosidérophiline est évidente. Ce métalloprotéide représente, en effet, la forme de "transport" du fer dans le lait de Femme. Les premiers résultats que nous avons apportés l'application d'une méthode de dosage de la lactosidérophiline du lait de Femme, fondée sur le principe de la méthode de dosage de la sidérophiline plasmatique de SCHADE ET CAROLINE⁹, montre que le lait de Femme contient, par litre, 1.5 g de lactosidérophiline en moyenne, soit environ 0.75 à 3 mg de fer suivant le degré de saturation en fer du métalloprotéide. Ces nombres sont en accord avec les résultats des dosages de fer effectués dans le lait de Femme par divers

TABLEAU II

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE LA LACTOSIDÉROPHILINE ET DE LA SIDÉROPHILINE

	<i>Lactosidérophiline</i>	<i>Sidérophiline</i>
λ_{\max}	452.5 m μ	460 m μ
ϵ^{10} mg/ml 1 cm; 280 m μ	11.7	11.2
ϵ^{10} mg/ml 1 cm; 452.5 m μ	0.500 (\pm 0.01)	—
ϵ^1 μ g fer/ml 1 cm; 452.5 m μ	0.0144 (\pm 0.0004)	0.017
Constante de sédimentation	4.8 (\pm 0.1)	5-5.3
Constante de diffusion	4.6	—
Poids moléculaire		
déterminé par la constante de sédimentation	95,000	90,000
déterminé par la diffusion de la lumière	89,000	—
Mobilité électrophorétique en tampon véronal (μ , 0.1; pH, 8.6)	$-3.45 \cdot 10^{-5}$ cm 2 /V/sec	$-3.1 \cdot 10^{-5}$ cm 2 /V/sec
Capacité de fixation du fer (à pH 7-7.5) en μ g de fer/mg de protéine	3.47 (\pm 0.13)	1.25
en atomes de fer/molécule de protéine	6	2
pH de dissociation totale du complexe fer protéine	1.75	4
Azote	14.84 %	15.4 %
Oses (galactose, mannose, fucose)	3.90 %	1.80 %
Osamines	2.40 %	1.30 %
Acides sialique	0.87 %	0.90 %
Oses/acide sialique	4.48	2

auteurs (voir, en particulier, la revue générale de DREYFUS ET SCHAPIRA²⁷, p. 177 et 178). On peut, d'autre part, penser que les propriétés ferriprivées de la lactosidérophiline entraînent, comme dans le cas de la sidérophiline⁹, une activité antibiotique vis-à-vis de certains germes pathogènes pour le Nourrisson.

CONCLUSIONS

Le lait de Femme contient un mucoïde de coloration rose saumon qui est capable de fixer réversiblement 6 atomes de fer par molécule. Il ne s'agit cependant pas de la sidérophiline, dont il se distingue par ses propriétés physico-chimiques et par ses caractères immunologiques. Il est, en outre, différent des chromoprotéides et des métalloprotéides isolés jusqu'à présent du lait de Femme. Nous proposons d'appeler ce protéide spécifique: lactosidérophiline ou lactotransferrine.

ADDENDUM À LA CORRECTION

GROVES²⁸ vient de décrire un procédé d'isolement d'une protéine colorée ("red protein") du lait de Vache sur des colonnes de DEAE-cellulose. Il s'agit d'un glycoprotéide (4.3 à 4.73 g d'oses par 100 g; 2.12 à 2.28 g d'osamines par 100 g; 0.3 g d'acide sialique par 100 g) capable de fixer réversiblement 2 atomes de fer par molécule. Ses propriétés physiques sont les suivantes: $s_{20,w} = 5.55$; $D_{20,w} = 5.75 \cdot 10^{-7}$; P.M. = 86,100; vitesse de migration électrophorétique à pH 9.85: —2.18 à —2.31 · 10^{-5} cm 2 /V/sec; pH_i: 7,8.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur GERNEZ-RIEUX, Directeur de l'Institut Pasteur de Lille, qui a bien voulu nous fournir gracieusement le lait de Femme nécessaire à nos travaux. Nous remercions vivement Monsieur le Professeur J. DEQUIDT, qui a dosé le fer dans nos échantillons de lactosidérophiline, Mademoiselle S. GUINAND, qui a effectué l'étude de la diffusion de la lumière, Monsieur le Docteur R. HAVEZ, qui nous a aidé de ses conseils dans l'étude immuno-électrophorétique de la lactosidérophiline et a effectué les électrophorèses en gel d'amidon, Monsieur Y. MOSCHETTO, qui a réalisé les électrophorèses en veine liquide, Monsieur le Docteur R. SEYNAVE, qui a bien voulu se charger de la préparation des immunosérum s de Lapin. Nous remercions de leur collaboration technique Mesdemoiselles C. PICQUET ET N. SCHEPPLER.

RÉSUMÉ

Les auteurs décrivent un procédé d'isolement et de purification, à partir du lait de Femme, d'un mucoïde qui possède, comme la sidérophiline plasmatique, la propriété de fixer réversiblement le fer. Il se distingue cependant de la sidérophiline par ses propriétés physico-chimiques et immunologiques. Les auteurs proposent d'appeler ce protéïde spécifique: lactosidérophiline ou lactotransferrine.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. MONTREUIL ET J. HOLLEMAN, *Compt. rend.*, 243 (1956) 1069.
- ² J. MONTREUIL, A. CHOSSON, R. HAVEZ ET S. MULLET, *Compt. rend.*, 154 (1960) 732.
- ³ J. MONTREUIL ET S. MULLET, *Compt. rend.*, 250 (1960) 1736.
- ⁴ C. H. W. HIRS, in S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. I, Academic Press, New-York, 1955, p. 113.
- ⁵ K. SCHMID, M. B. MACNAIR ET A. F. BÜRGI, *J. Biol. Chem.*, 230 (1959) 853.
- ⁶ O. SMITHIES, *Biochem. J.*, 71 (1959) 585.
- ⁷ M. D. POULIK, *Nature*, 180 (1957) 1477.
- ⁸ S. FIALA, *Coll. trav. chim. tchècoslov.*, 14 (1949) 287.
- ⁹ A. L. SCHADE ET L. CAROLINE, *Science*, 104 (1946) 340.
- ¹⁰ J. MONTREUIL ET N. SCHEPPLER, *Bull. soc. chim. biol.*, 41 (1959) 13.
- ¹¹ J. TILLMANS ET K. PHILIPPI, *Biochem. Z.*, 215 (1929) 36.
- ¹² C. RIMINGTON, *Biochem. J.*, 34 (1940) 931.
- ¹³ L. A. ELSON ET W. T. J. MORGAN, *Biochem. J.*, 27 (1933) 1824; 28 (1934) 988.
- ¹⁴ R. BELCHER, A. J. NUTTEN ET C. M. SAMBROOK, *Analyst*, 79 (1954) 201.
- ¹⁵ S. NIAZI ET D. STATE, *Cancer Research*, 8 (1948) 653.
- ¹⁶ J. WERNER ET L. ODIN, *Acta Soc. Med. Upsaliensis*, 57 (1952) 230.
- ⁷ K. MEYER, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 6 (1938) 91; *Advances in Protein Chem.*, Vol. II, Academic Press, New-York, 1945, p. 249.
- ⁸ H. THEORELL ET Å. ÅKESON, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, 17B (1943) 1.
- ⁹ B. D. POLIS ET H. W. SHMUKLER, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 475.
- ⁰ R. J. BLOCK, D. BOLLING, K. W. WEISS ET G. ZWEIG, *Arch. Biochem. Biophys.*, 47 (1953) 88.
- ¹ R. J. BLOCK ET G. ZWEIG, *Arch. Biochem. Biophys.*, 48 (1954) 386.
- ² G. ZWEIG ET R. J. BLOCK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 51 (1954) 200.
- ³ B. JOHANSSON, *Nature*, 181 (1958) 996.
- ⁴ B. JOHANSSON, *Acta Chem. Scand.*, 14 (1960) 510.
- ⁵ D. M. SURGENOR, B. A. KOEHLIN ET L. E. STRONG, *J. Clin. Invest.*, 28 (1949) 73.
- ⁶ B. A. KOEHLIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 2649.
- ⁷ J. C. DREYFUS ET G. SCHAPIRA, *Le fer, Expansion Scientifique Française*, éd., Paris, 1958.
- ³ M. L. GROVES, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 3345.