Zeitschrift: Mémoires de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles

Herausgeber: Société Vaudoise des Sciences Naturelles

Band: 14 (1965-1968)

Heft: 2

Artikel: Transport sanguin de suspensions colloïdales de phosphate de chrome radioactif en milieu gélatiné

Autor: Biedermann, Claude

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-258670

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 07.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Mémoires de la Société vaudoise des Sciences naturelles
N° 86 1965 Vol. 14, Fasc. 2

Transport sanguin de suspensions colloïdales de phosphate de chrome radioactif en milieu gélatiné

PAR

CLAUDE BIEDERMANN
(Travail réalisé au Centre anti-cancéreux romand sous la direction du Dr S. NEUKOMM *, privat-docent de la Faculté de médecine de Lausanne)

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

C'est en 1958 que le Dr NEUKOMM nous a suggéré d'étudier *in vivo* le comportement de suspensions colloïdales de radiophosphate de chrome (CrP^*O_4) dans le sang du lapin. NEUKOMM et coll., qui travaillent depuis de nombreuses années à déterminer les propriétés physico-chimiques du phosphate de chrome radiomarqué au P^{32}, en suspension dans de la gélatine, ont cherché une méthode permettant de préparer des *suspensions stables et homogènes.*

Nous désirons en particulier savoir si la rentabilité et l'homogénéité caractéristiques *in vitro* de ces suspensions de phosphate de chrome sont ou non altérées lorsque, *in vivo,* le colloïde est pris en charge par le système réticulo-endothélial (SRE).

Notons d'emblée que la réaction du SRE vis-à-vis des particules injectées se traduit d'une part par la vitesse de disparition de celles-ci dans le sang et d'autre part par le degré de leur fixation dans les divers organes.

De nombreux auteurs se sont penchés sur la physio-pathologie du SRE. Au cours des dix dernières années, HELLER, HALPERN et coll. (2, 3, 4, 15), GABRIELLI (11), JONES et coll. (21), GOFMAN (13), DOBSON et coll. (5, 6, 7, 8, 9), SHEPPARD et coll. (33), MUELLER et ROSSIER (27), HERVE et GOVAERTS (16, 17), ALLEN et coll. (1), NEUKOMM et coll.

* Que Monsieur le Dr Serge Neukomm trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail, et pour la manière dont il m'a conseillé.

J'adresse mes remerciements à tous les collaborateurs du Centre anti-cancéreux romand pour leur aide précieuse.

(19, 20, 23, 24, 28, 29, 30), ZILVERSMIT et coll. (35) ont tenté de préciser par divers moyens les mécanismes qui interviennent dans la captation de suspensions colloïdales variées par le SRE.

Il ressort des travaux de ces auteurs que les substances et les produits utilisés pour l'exploration du SRE doivent répondre autant que possible aux conditions suivantes :

1° *être des suspensions colloïdales* au sens propre du terme, c'est-à-dire être formées d'agrégats micellaires complexes. Le SRE ne phagocyte pas les substances en état de dispersion moléculaire ou ionique ;

2° *être stables* : toute instabilité entraîne une modification plus ou moins rapide de la concentration, voire de la structure des agrégats micellaires en suspension, et par conséquent une réponse variable du SRE ;

3° *être homogènes* dans leur constitution, c'est-à-dire être formées autant que possible de micelles de même volume et de même nature.

Suspensions homogènes et courbes de disparition.

La notion de l'homogénéité des suspensions colloïdales a retenu tout particulièrement l'attention des chercheurs. On entend généralement par « suspension homogène » une *suspension dont la dimension des particules ne varie qu'entre des limites « étroites »*. Par opposition, les particules d'une suspension hétérogène sont de dimension très variable.

Théoriquement, la courbe de disparition du sang en fonction du temps, pour les suspensions homogènes injectées dans la circulation, suit une *loi exponentielle*. En fait, il n'existe pas de suspension colloïdale si rigoureusement homogène que les micelles aient toutes le même volume et suivent de façon absolue cette loi exponentielle. Mais pratiquement, les suspensions sont dites homogènes lorsque leur courbe de disparition reportée dans un graphique semi-logarithmique est une droite. L'existence d'une telle courbe permet de définir sans difficulté la « période » de la présence des particules dans le sang (T/2), c'est-à-dire le temps nécessaire pour que disparaisse la moitié de la radioactivité des particules injectées.

Les observations de HALPERN et coll. (2, 4), DOBSON (8), GABRIELLI (11), GOFMAN (13) et NEUKOMM et coll. (28, 29), concordent entièrement sur ce point.

HALPERN et coll. (4), GABRIELLI (11) constatent que les courbes de disparition des particules colloïdales dans le sang ont une pente initiale fortement inclinée. En effet, la moitié de la dose injectée disparaît du sang en un temps (T/2) de l'ordre de la minute. Toutefois,

DOBSON et coll. (7, 13), en étudiant le comportement de différentes suspensions, observent que les courbes de disparition varient selon la grandeur des particules. Ils distinguent avec GOFMAN :

1° des *particules relativement grandes,* à fort effet Tyndall, qui disparaissent rapidement du flux sanguin et se retrouvent essentiellement dans le foie et dans la rate. La pente initiale de la courbe de disparition est grande ;

2° des *particules de grandeur moyenne,* à effet Tyndall atténué, disparaissant lentement du flux sanguin ;

3° de *fines particules,* traversant aisément les membranes biologiques, ne présentant aucun effet Tyndall.

ZILVERSMIT et coll. (35) obtiennent un résultat absolument superposable avec une suspension dont les micelles sont, une première fois, de petite dimension et, dans une deuxième expérience, de grande dimension.

Ainsi la vitesse de disparition des suspensions colloïdales est d'autant plus lente que les particules injectées ont une dimension moyenne plus petite et des dimensions maximales et minimales moins dispersées ; il est aussi démontré que la loi de disparition du sang est exponentielle quand la suspension est homogène.

NEUKOMM et coll. (19, 20, 28, 29, 30) ont obtenu des suspensions homogènes de $CrPO_4$ à particules de diamètre connu variant dans d'étroites limites, en soumettant au broyage et à la centrifugation, pendant un temps déterminé, une suspension hétérogène de $CrPO_4$ dans de l'agar-agar et de la gélose.

Sous l'action du broyage et de la centrifugation, le diamètre moyen des particules diminue. Il diminue en fonction de la durée de la centrifugation (NEUKOMM et coll. (30).

Les suspensions que nous étudions dans ce travail ont été obtenues selon un procédé de préparation mis au point par NEUKOMM et coll. (20), *en précipitant le chrome par le phosphate en présence de la gélatine.*

Effet Halpern.

Un phénomène particulièrement important a été décrit par HALPERN et peut être présenté de la façon suivante : *la réponse du SRE à une excitation, traduite par la cinétique de l'activité phagocytaire lors d'administration d'un excitant (suspension colloïdale par exemple), est fonction de la quantité totale de l'excitant.* Lorsque NEUKOMM et coll. (29) veulent reproduire l'« effet Halpern » pour leurs suspensions homogènes en injectant à des lapins des doses croissantes de la suspension en une ou plusieurs fractions, ils constatent également que l'activité phagocytaire du SRE dépend de la dose totale des particules mises en circulation dans le sang. Mais ils complètent cette observa-

tion en établissant que l'activité du SRE dépend de la dose totale injectée, *que celle-ci soit administrée en une seule ou en plusieurs doses fractionnées.* Traduite par la période (T/2) de la courbe de disparition de la radioactivité dans le sang, l'activité phagocytaire du SRE est plus faible quand la quantité des particules à capter est plus élevée (figure 1). A chaque nouvelle injection, le T/2 s'allonge et atteint en fin de compte la même valeur que si la dose totale est injectée en une seule fois.

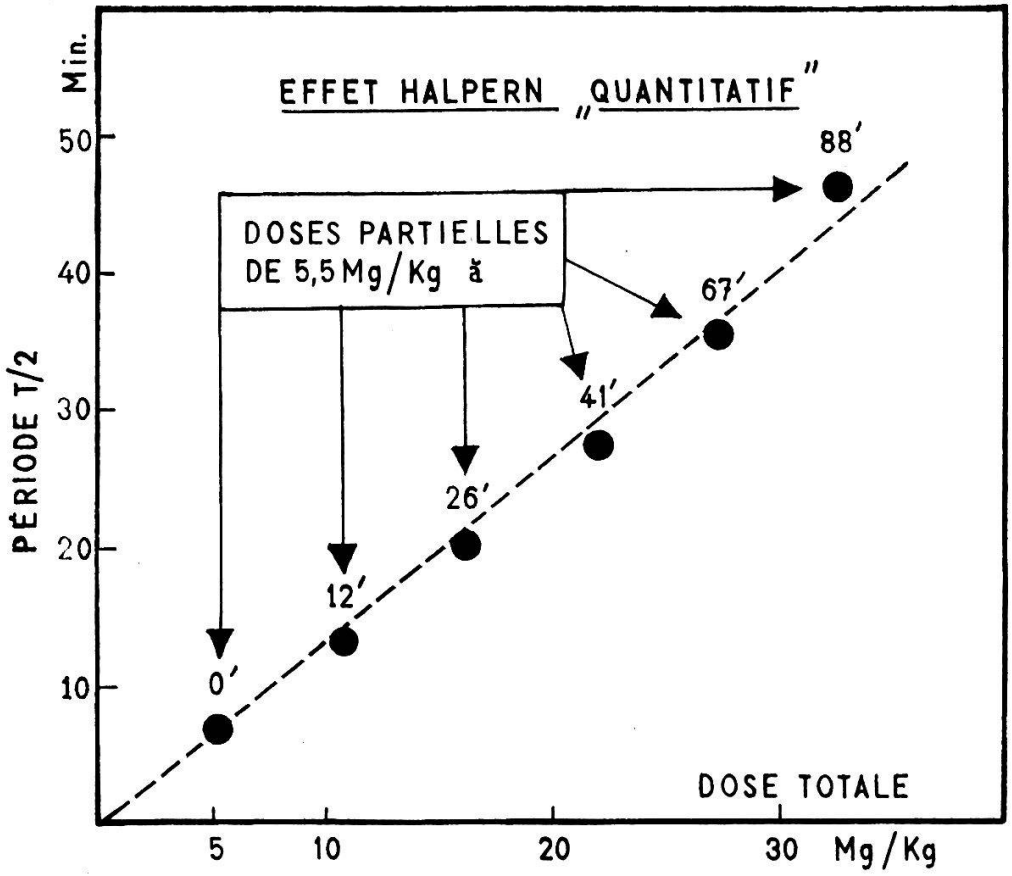

Fig. 1.

Dobson (10) rend compte du même phénomène en donnant connaissance d'une observation non publiée par Gofman et White.

Il y a donc, selon la dose globale injectée, comme un effet de « saturation » du pouvoir phagocytaire du système réticulo-endothélial.

Problèmes à résoudre.

L'analyse des travaux consacrés à la *clearance* sanguine des particules nous a finalement conduit à nous poser les questions suivantes, concernant les particules de phosphate de chrome obtenues par précipitation en milieu gélatiné :

a) Y a-t-il *in vivo* une modification des relations physico-chimiques entre le phosphate de chrome et la gélatine, c'est-à-dire entre les constituants de la suspension colloïdale de radiophosphate de chrome ?

b) Y a-t-il *in vivo* formation d'une « nouvelle micelle » par combinaison de la particule de radiophosphate de chrome gélatiné avec les protéines sériques ?

c) Dans le cas d'une réponse affirmative à cette dernière question, y a-t-il une protéine sérique spécifique qui joue le rôle de transporteur de la particule ?

CHAPITRE II

Matériel et méthodes

Programme expérimental.

Pour les deux types de suspensions utilisées, notre programme expérimental a comporté, en ce qui concerne les *recherches in vivo,* trois étapes successives :

Première étape : nous injectons dans la veine marginale de l'oreille du lapin une quantité unique d'une solution déterminée de CrP^*O_4 et nous enregistrons simultanément, par application d'un compteur de Geiger-Müller sur l'autre oreille, la courbe de disparition de la radioactivité dans le courant sanguin de l'animal.

Deuxième étape : Nous prélevons à différents moments après l'injection intra-veineuse, une certaine quantité de sang veineux, sang que nous centrifugeons pour séparer les éléments cellulaires des constituants sériques.

Troisième étape : Nous séparons par électrophorèse les fractions protéiques du sérum. Au moyen du compteur de Geiger-Müller, nous déterminons alors la position de la radioactivité par rapport à celle des protéines sériques (voir chapitre IV).

Par ailleurs, une série de *recherches in vitro* a été entreprise, en vue de déterminer le comportement électrophorétique de nos suspensions ou de leurs principaux composants en présence ou en l'absence des protéines sériques.

Suspensions colloïdales. — Nous avons étudié deux suspensions colloïdales de phosphate de chrome radioactif, conventionnellement dites « concentrées » (C) et « diluée » (C/10). Toutes deux répondent au même critère d'homogénéité défini par Neukomm et coll. ; les diamètres extrêmes des particules colloïdales de ces suspensions sont compris entre 0,03 et 0,3 μ.

Solution concentrée (C)

Dissoudre d'une part 1,6 g de chlorure de chrome $[CrCl_2(H_2O)_4]$ Cl. 2 H_2O dans 5 ml d'eau distillée ; d'autre part, dissoudre 1,9 g de phosphate trisodique

$Na_3PO_4 . 12\ H_2O$ dans 25 ml d'eau distillée, additionnée d'une solution de Na_2HPO_4 marquée au P-32 en quantité telle que la teneur en ions PO_4^{---} est négligeable vis-à-vis de la quantité précédente.

La solution de gélatine s'obtient en diluant 10 ml de gélatine Berna à 10 % dans 30 ml d'eau distillée.

La solution de chlorure de chrome est introduite dans celle de gélatine chauffée à 60° C. Puis, ajouter goutte à goutte la solution de phosphate trisodique, sous vive agitation, la solution de gélatine étant maintenue à la température de 60° C pendant l'opération.

Après refroidissement, centrifugation à 2000-3000 t/mn pendant 30 minutes ; la dialyse de la suspension, d'abord contre de l'eau distillée, puis contre du chlorure de sodium à 9 ‰ enlève l'excès de chlorure de chrome.

Solution diluée (C/10)

Même méthode ; seules les quantités de chlorure de chrome et de phosphate trisodique sont réduites dans le rapport de 1/10 (23).

Ces suspensions colloïdales doivent être conservées en flacons fermés, à basse température (2-5° C) et ramenées au moment voulu à la température ambiante.

Animaux d'expérience. — Nous utilisons pour nos expériences des lapins adultes sans considération du sexe.

Le jour précédant l'expérience, l'animal est tenu à jeun. Sa pesée nous permet de déterminer la quantité de barbiturique à injecter à l'animal. Nous injectons dans la cavité péritonéale de l'acide diallylbarbiturique — DIAL Ciba 2 ml = 0,2 g de barbiturique — à raison de 0,6 ml de DIAL par kilogramme de lapin. L'injection se fait par doses fractionnées de 0,1 ml toutes les 15 secondes. Quelque 30 minutes sont nécessaires pour obtenir l'abolition des réflexes cornéens.

Le lapin endormi est placé dans une boîte à carcan d'où n'émergent que la tête et les deux oreilles. La face postérieure d'une oreille est rasée. C'est dans la veine marginale de celle-ci que nous injectons le produit radioactif à tester et que nous prélevons le sang veineux nécessaire à l'électrophorèse du sérum. L'autre oreille est fixée devant la fenêtre du détecteur de Geiger-Müller. Il importe que l'aire de l'oreille appliquée contre la fenêtre du détecteur soit toujours de même dimension, donc que le moyen de fixation soit rigide ; par ailleurs, il faut veiller à ce que le dispositif « oreille-détecteur » n'entraîne ni torsion, ni traction à la racine de l'oreille pour assurer une circulation veineuse normale.

Equipement de mesure de la radioactivité. — Relié au détecteur de Geiger-Müller, l'équipement de mesure de la radioactivité est constitué par un intégrateur électronique, muni d'un amplificateur, d'un régulateur des impulsions et d'un milli-ampèremètre enregistreur à plume, avec bandes entraînées. L'intégrateur employé est le *ratemeter* E. K. COLE LTD, type 1037 A. 2, série N° 1038, réglé de manière constante pour les deux séries d'injections à 1500 volts, *paralyses times :* 200 μ, disc. dias : 10, *ratemeter range* X. 10 - X. K 1 (.2), capacité d'intégration : 2 μ F, temps d'intégration 40 secondes. L'appareil doit être enclanché 15 minutes avant le début de l'expérience pour éviter toute erreur due à d'éventuelles fluctuations de courant.

Enregistrement et mesure de la radioactivité dans le sang circulant du lapin. — Avant le début de l'expérience, nous déterminons la valeur moyenne de la radioactivité ambiante. Nous injectons alors, *en une seule fois,* la suspension de CrP^*O_4 dans la veine marginale de l'oreille du lapin. Simultanément à l'injection, nous enregistrons la courbe de décroissance du P* dans le sang. L'enregistrement se poursuit pendant 180 à 240 minutes. La courbe de disparition de la radioactivité est relevée sur papier semi-logarithmique. Nous portons en ordonnée la radioactivité calculée en impulsions par seconde, en abscisse le temps de disparition de cette radioactivité. Notons que la quantité de la suspension à injecter a été choisie arbitrairement pour satisfaire le désir de retrouver, en fin d'expérience, une radioactivité décelable dans les divers constituants protéiques du sérum séparés par électrophorèse. Nous avons injecté pour les trois expériences de la solution concentrée 7 ml de solution, et 9 ml pour les trois expériences de la solution diluée.

Préparation du sérum et électrophorèse. — Le prélèvement du sang veineux s'exécute en même temps que s'enregistre la courbe de disparition de la radioactivité dans le sang.

On ponctionne la veine marginale de l'oreille de l'animal et on prélève XX gouttes de sang veineux à des intervalles de plus en plus éloignés du moment de l'injection de la suspension colloïdale. Le sang de chaque prise est recueilli dans un tube à centrifuger et, après coagulation, immédiatement centrifugé pour éviter l'hémolyse et la diffusion de l'hémoglobine dans le sérum. Cette diffusion perturberait l'électrophorèse (EP) du sérum. La centrifugeuse tourne à 3000 t/mn pendant 20 minutes. Le sérum est ensuite pipeté et conservé à basse température (2-5° C). On dépose pour l'électrophorèse 12 lambdas du sérum ainsi obtenu sur la ligne de pose d'une bande de papier à EP de Whatman N° 1 et on applique aux pôles de cette bande un courant continu de 300 volts, 10 mA pendant 16 heures. La migration se fait à basse température (2-5° C).

(Appareillage et technique selon DURRUM.)

La coloration est faite selon la technique de CH. WUNDERLY (34) en utilisant l'Amidoschwarz saturé de Bayer 2 g/l avec adjonction de 9 parties de méthanol et 1 partie d'acide acétique.

Mesures de la radioactivité sur les portions du sérum séparées par EP. — Pour la recherche et la mesure de la radioactivité sur les bandes d'électrophorèse, nous utilisons un appareillage mis au point au Centre anticancéreux romand et décrit ailleurs par LERCH et NEUKOMM (24), appareillage qui associe un chariot porteur de la bande EP, déroulée d'un mouvement continu devant la fenêtre du détecteur de Geiger, et un appareil intégrateur-enregistreur à plume cité plus haut.

Les constantes choisies pour nos expériences sont :

— vitesse de déplacement du chariot : 2,5 mm/mn ;
— largeur du diaphragme du détecteur, calculée dans le sens de déroulement du papier d'EP : 3,3 mm ;
— constante de temps d'intégration : 40 s.

Finalement, nous fixons sur le chariot, entraîné en mouvement continu lent, la bande de papier d'EP et nous faisons passer de 3 à 6 fois l'EPgramme sous la fenêtre du détecteur de Geiger-Müller en enregistrant, sur du papier millimétré couplé à l'intégrateur, les impulsions provenant de la portion radioactive de la bande de papier de Whatman.

Nous représentons graphiquement l'enregistrement de la radioactivité détectée sur l'EP en portant en abscisse les impulsions par seconde et en ordonnée la migration des protéines.

CHAPITRE III

A) *Expérimentation « in vivo » avec les solutions « concentrées ».*

Nous avons utilisé trois suspensions colloïdales de CrP^*O_4 dites « concentrées » (C). Ce sont les solutions I, II et III.

L'expérimentation se déroule selon le programme exposé au chapitre précédent, en maintenant constantes les données de fonctionnement des appareils électriques (détecteur, intégrateur, enregistreur), la quantité de solution injectée, la quantité de sang prélevée, les données de fonctionnement de l'EPgraphe et celles de la détection de la radioactivité des portions protéiques migrées du sérum.

Le tableau I résume les résultats de ces expériences classées par ordre décroissant des périodes (T/2) de disparition de la radioactivité dans le courant sanguin du lapin. Ce tableau rend compte de la

durée de circulation dans le sang de la suspension injectée jusqu'au moment de la prise de sang veineux, ainsi que de la *quantité de sang prélevé.* Il donne l'*activité globale* du sang en impulsions par seconde (i/s) par ml de la solution injectée, considérée au moment de la détection des zones radioactives sur l'électrophorégramme. Il indique enfin l'*emplacement des zones radioactives* détectées par rapport à l'*emplacement des globulines sériques.*

TABLEAU I : *Solutions concentrées.*

Echantillon de sérum	T/2 (mn)	Durée de circulation dans le sang	Quantité de sang prélevé (ml)	Activité globale du sang (μC/ml)	Electrophorèse — Activité des fractions (i/s) β	γ
I/a	67	5 mn	1,0	15,7	—	14,3 5,5
I/b	67	90 mn	1,0	15,7	—	3,9 2,3
II/a	51	156 mn	1,0	11,7	0,25	0,40
II/b	51	24 h	1,0	11,7		nulle
III/a	21	15 mn	1,0	10,1	0,40	0,80
III/b	21	40 mn	1,0	10,1	0,70	0,60
III/c	21	75 mn	1,0	9,2	0,40	0,40
III/d	21	24 h	1,0	9,2		nulle

En complément des données du tableau I, nous avons reproduit dans les figures 2, 3 et 4 les courbes d'enregistrement de la radioactivité, ainsi que les courbes électrophorétiques, ce qui permet de situer plus exactement la position des unes par rapport aux autres.

Considérés dans leur ensemble, les résultats précités démontrent les faits suivants :

a) La courbe d'enregistrement de la radioactivité détectée sur l'EPgramme de chacune des trois solutions est en *double clocher,* ce qui correspond à deux zones radioactives partiellement dissociées.

b) La localisation de ces zones radioactives par rapport aux fractions sériques n'est pas la même pour chacune des trois solutions. Pour la solution I, le double clocher se situe entièrement dans la fraction des γ-globulines. Pour les solutions II et III, le double clocher s'étend sur les fractions β et γ-globulines (figure 5).

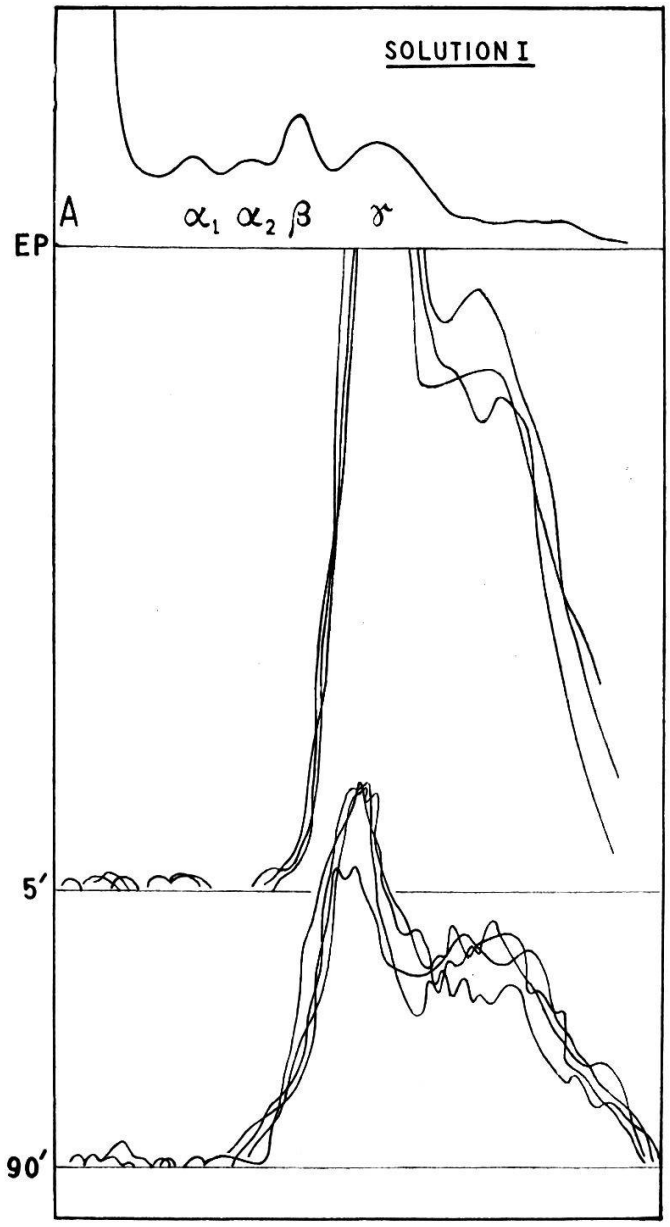

Fig. 2.

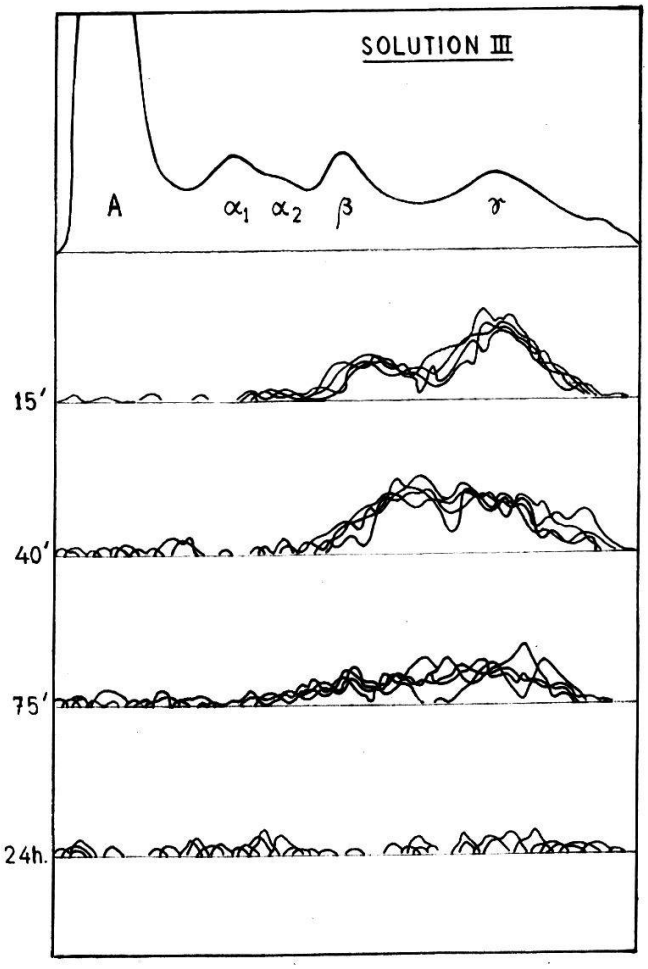

Fig. 4.

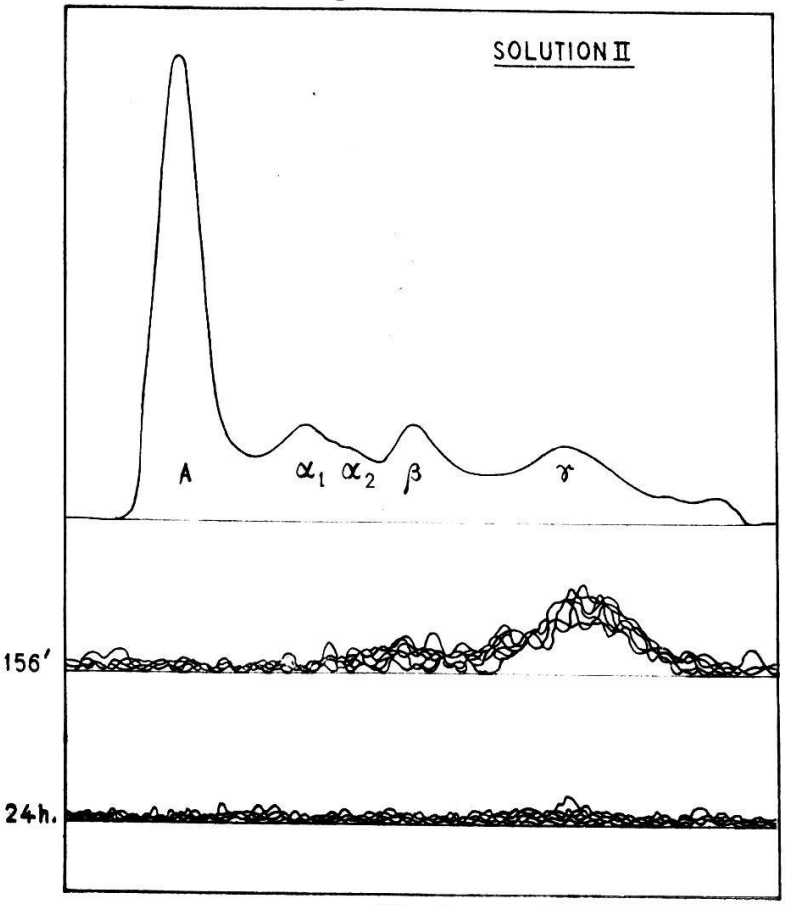

Fig. 3.

Fig. 2-4.
Localisation de la radioactivité de la suspension concentrée sur les protéines sériques séparées par électrophorèse.

c) Les deux zones radioactives ne sont pas de même intensité. Nous mettons en évidence, pour la solution I, un pic de forte intensité radioactive sur la partie avancée des γ-globulines et un dôme de plus faible intensité étalé sur la partie arrière des γ-globulines, proche de la ligne de pose de l'échantillon. Pour les suspensions II et III, les deux zones radioactives se situent, l'une de faible intensité sur la fraction des β-globulines et l'autre de forte intensité sur les γ-globulines.

d) L'intensité radioactive des zones détectées sur l'EPgramme diminue pour ne plus être apparente après 24 heures; de plus, la répartition de la radioactivité sur les protéines paraît un peu variable. Dans le cas de la solution III en particulier, le maximum d'intensité est reporté des γ-globulines (III/a) aux β-globulines (III/b).

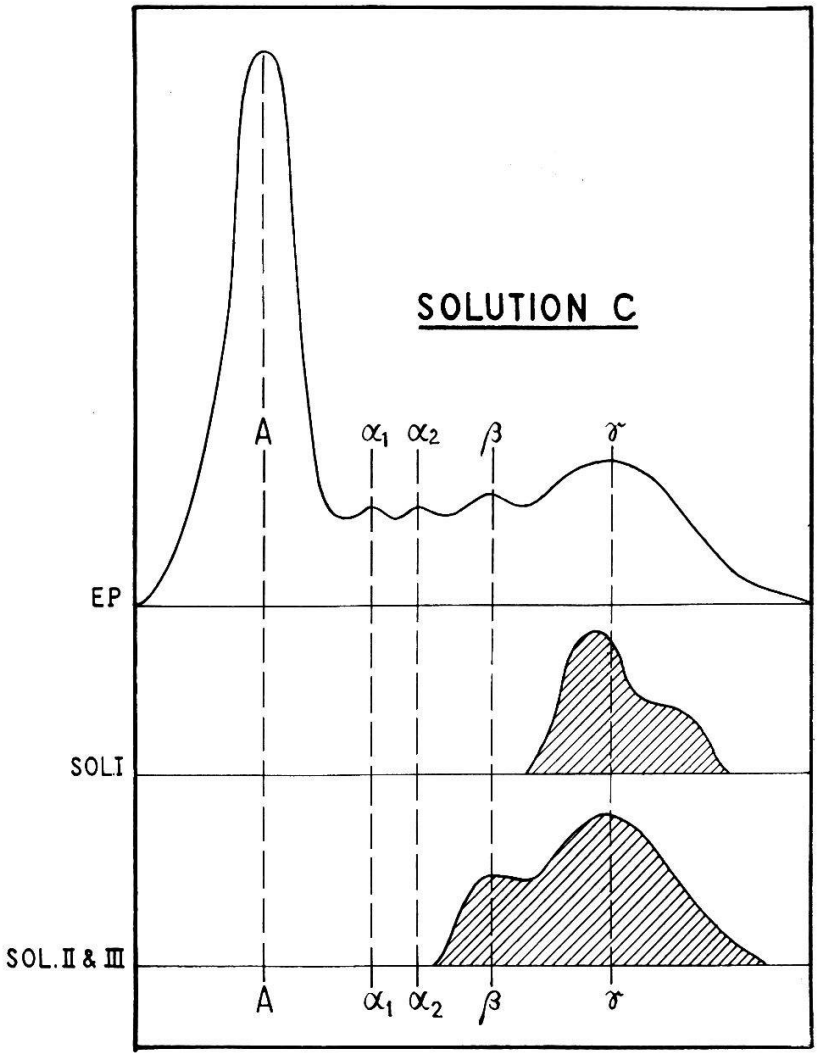

Fig. 5. — Localisation de la radioactivité de la suspension concentrée sur les protéines sériques séparées par électrophorèse.

Simultanément, un équilibre tend à s'établir entre les intensités radioactives supportées par les deux fractions protéiques β et γ (figure 4).

En résumé, toute la radioactivité que nous injectons dans le sang ne se comporte pas d'une façon univoque. Nous détectons en effet un double clocher de radioactivité qui semble indiquer que le P* est apparemment lié aux deux fractions protéiques les plus lentes à migrer; de plus, l'activité de P* n'est pas égale dans les deux zones et elle diminue jusqu'à disparaître complètement après un certain laps de temps.

TABLEAU II : *Solutions diluées.*

Echantillon de sérum	T/2 (mn)	Durée de circulation dans le sang	Quantité de sang prélevé (ml)	Electrophorèse: Activité globale du sang (μC/ml)	Activité des fractions (i/s) β	Activité des fractions (i/s) γ
XI/a	154	5 mn	0,5	13,7	—	27,5
XI/b	154	125 mn	2,0	13,7	—	11,8
XI/c	154	24 h	2,0	13,1		nulle
XII/a	94	5 mn	2,0	16,0	—	29,4
XII/b	94	120 mn	2,0	16,0	—	14,3
XIII/a	34	5 mn	2,0	12,8	—	28,2
XIII/b	34	120 mn	2,0	11,7	15,8 sur fraction inter - β - γ	

B) *Expérimentation « in vivo » avec les solutions « diluées ».*

Dans ce cas, nous utilisons également trois suspensions colloïdales de CrP^*O_4. Ce sont les suspensions XI, XII et XIII. Du point de vue expérimental, les constantes choisies pour les expériences I à III ne varient pas. Seules, les solutions injectées sont moins concentrées et la quantité injectée dans la veine marginale de l'oreille du lapin est plus importante (9 ml au lieu de 7 ml).

Les résultats de ces trois expériences sont consignés dans le *tableau II* selon le même ordre que dans le tableau I.

Comme précédemment, l'examen de l'ensemble des résultats obtenus avec les suspensions C/10 conduit à souligner les faits suivants:

a) Avec les trois suspensions C/10, il n'y a qu'une seule zone fortement radioactive sur l'EP. Cette zone a l'aspect d'un pic unique apparemment localisé sur une seule fraction protéique du sérum. Pour les deux solutions XI et XII, il se trouve en

regard des γ-globulines, sans dispersion sur les autres fractions, alors que pour la troisième solution (XIII), il se situe initialement sur les γ-globulines (XIII/a) et plus tardivement sur la fraction inter-β-γ-globulines (XIII/b).

b) Peu à peu, l'intensité radioactive portée par la fraction protéique décroît, sans s'étaler sur les fractions protéiques voisines. La décroissance est telle qu'après 24 heures de circulation, nous ne pouvons plus détecter avec certitude une radioactivité autre que la radioactivité ambiante.

C) *Expérimentation « in vivo » avec des suspensions de phosphate de chrome gélatiné doublement marquées.*

Cette expérimentation a été faite sur deux lapins traités de la manière suivante :

1° Nous injectons à un lapin préparé selon la méthode utilisée pour les suspensions C et C/10 une suspension concentrée doublement marquée de CrP^*O_4 + gélatine I-131. Nous enregistrons la courbe de disparition de la radioactivité dans le sang de l'animal et prélevons, à des temps différents (30, 60 et 90 mn) après l'injection, une petite quantité de sang veineux. Ce sang, coagulé, est centrifugé et les constituants du sérum séparés par EP. Le papier d'EP est coloré à l'Amidoschwarz dilué. Nous détectons enfin la radioactivité présente sur ces bandes d'électrophorèse (exp. 12, figure 6).

2° A un autre lapin, nous injectons une suspension C/10 de $CrPO_4$ + gélatine I-131. L'expérience se déroule comme d'habitude, et nous prélevons une certaine quantité de sang 30 minutes après l'injection. Le sérum est soumis à une EP et nous mesurons la radioactivité de l'I-131 (exp. 11, figure 6).

Les résultats obtenus dans la première expérience faite avec une suspension doublement marquée de gélatine I-131 + $CrPO_4$ marqué au P-32 (C/10) montrent que la vitesse de disparition de la radioactivité dans le sang est comparable à celle des autres suspensions colloïdales de radiophosphate de chrome dilué. La suspension est homogène, sa courbe de disparition suit la loi exponentielle.

Par ailleurs, après EP, nous détectons pour chacune des prises de sang effectuées 30, 60 et 90 minutes après l'injection trois zones de radioactivité, dont la plus forte se situe sur les β-globulines. Les deux autres, de faible intensité, se situent, l'une dans la portion inter-α-1-α-2-globulines, l'autre sur les albumines. Cette dernière zone radioactive est difficile à distinguer de la radioactivité ambiante.

En ce qui concerne la deuxième expérience (suspension colloïdale de $CrPO_4$ + gélatine I-131 mélangée au sérum de l'animal) nous décelons une seule zone radioactive de l'iode sur les β-globulines, électivement.

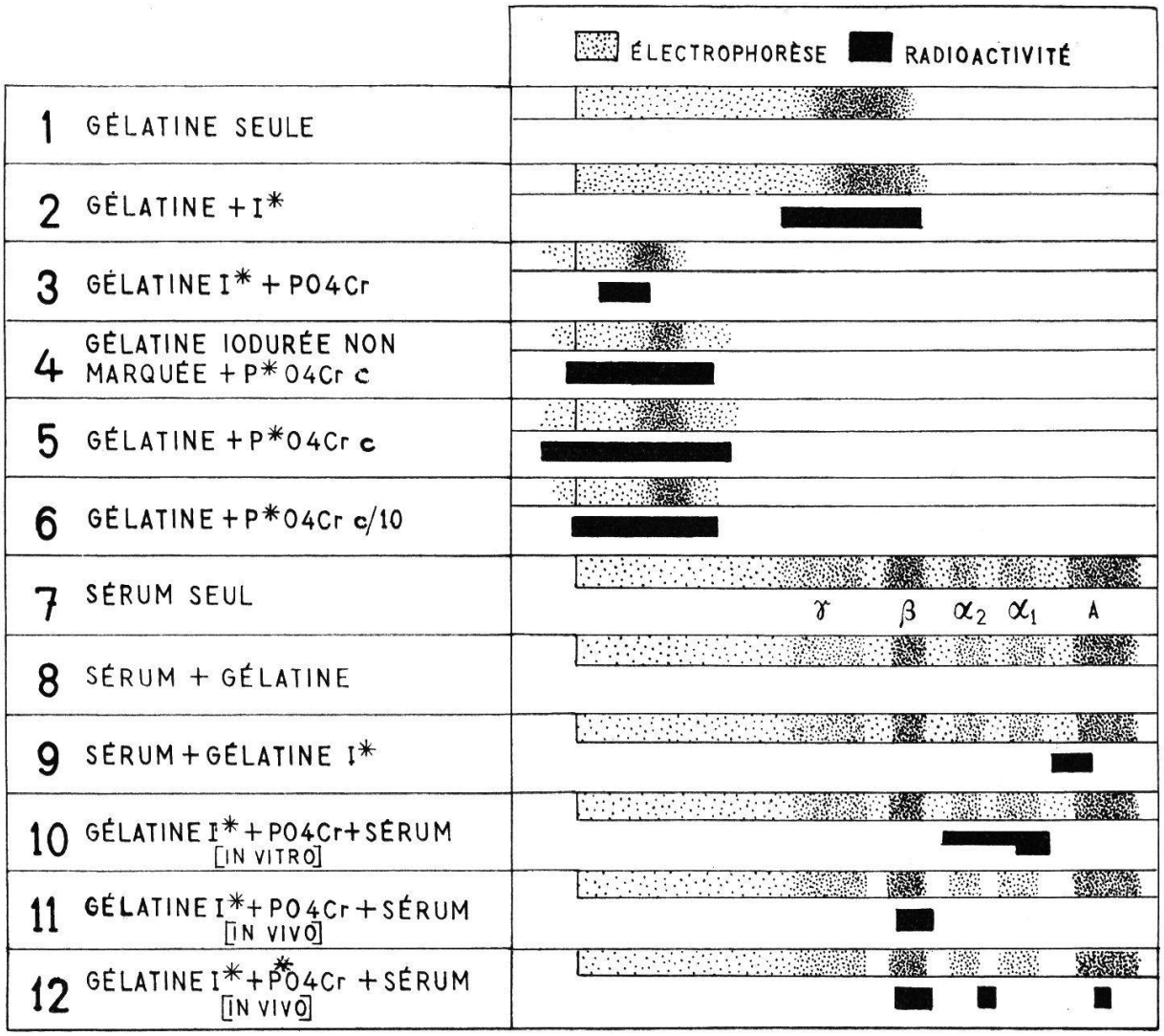

Fig. 6. — Comportement électrophorétique des principaux constituants des suspensions.

D) *Expérimentation « in vitro » avec les constituants de la suspension de phosphate de chrome gélatiné.*

En vue de compléter notre documentation sur les questions posées au début de notre travail, nous avons fait des EP avec les constituants dissociés de la suspension colloïdale de $CrPO_4$, en utilisant également le double marquage de la suspension colloïdale au P-32 pour le PO_4Cr et à l'I-131 pour la gélatine.

Nous avons réalisé ces expériences complémentaires de la façon suivante : nous soumettons à l'électrophorèse :

1. de la gélatine seule
2. de la gélatine marquée à I-131
3. de la gélatine I-131 + $CrPO_4$ (C)
4. de la gélatine iodurée non marquée + CrP^*O_4 (C)
5. de la gélatine + CrP^*O_4 (C)
6. de la gélatine + CrP^*O_4 (C/10)
7. du sérum de lapin
8. du sérum + de la gélatine
9. du sérum + de la gélatine I-131
10. du sérum + de la gélatine I-131 + $CrPO_4$

Les résultats obtenus (figure 6) appellent les quelques commentaires suivants :

1) Soumises à l'électrophorèse, les molécules de la gélatine pure migrent.

2) La migration est identique si cette gélatine est marquée à l'I-131. La radioactivité maximale de l'I-131 se situe dans la « zone arrière » de migration de la gélatine.

3) Lorsque la gélatine, marquée à l'I-131, est associée au phosphate de chrome, la migration est quasi nulle. Nous retrouvons la radioactivité de l'I-131 voisine de la ligne de pose de l'échantillon.

4) Il n'y a pas non plus de migration de la suspension de CrP^*O_4 en milieu de gélatine iodurée non marquée. La radioactivité du P-32 s'étale aussi à proximité de la ligne de pose de l'échantillon.

5) et 6) Que la suspension de P-32 soit concentrée ou non, il n'y a aucune migration à l'EP et la radioactivité du P-32 se retrouve à proximité de la ligne de pose.

7) La séparation des constituants du sérum s'opère très distinctement en albumine et globulines différentes.

8) L'EPgramme de la gélatine + sérum ne diffère pas de celui du sérum isolé. Il n'est pas possible de dire, par comparaison des intensités de coloration des bandes à l'Amidoschwarz, sur quelle portion de sérum migré se trouve la gélatine.

9) Si nous marquons à l'I-131 la gélatine dans l'expérience précédente, nous retrouvons la radioactivité de l'iode sur une portion inter-albumine-α-1-globuline.

10) Lorsque nous ajoutons à ce complexe sérum + gélatine I-131 du $CrPO_4$, nous mesurons un double pic de radioactivité, le pic à intensité maximale dans la portion inter-albumine-α-1-globuline et le pic à intensité moindre sur les α-2-globulines.

CHAPITRE IV

Causes d'erreurs et critique de la méthode

Dans les expériences précitées, un certain nombre de causes d'erreurs peuvent intervenir, dont quelques-unes retiendront ici notre attention :

1° La *préparation des suspensions colloïdales* n'est pas absolument régulière; on constate en effet que la fixation du phosphore ou du chrome fluctue passablement d'une préparation à l'autre. Dans le cas des solutions concentrées, les variations sont de l'ordre de $\pm$ 3 %. Pour les solutions C et C/10, le rendement en chrome reste sensiblement le même (en moyenne 88% $\pm$1%). Le rendement en phosphate est par contre affecté par la dilution dans la gélatine, il est toujours inférieur à celui du chrome (83 % pour la solution C et 54 % pour la solution C/10).

L'écart moyen entre les analyses chimiques et radiochimiques est de $\pm$ 0,5 %. Lors du marquage de la gélatine à l'I-131, le rendement moyen est de 54 %. Le rendement en gélatine des solutions en suspension dans de la gélatine marquée est égal à 90 % (23).

2° Les *suspensions colloïdales marquées* peuvent ne pas être homogènes. Nous éliminons l'erreur que nous ferait courir une suspension non-homogène en supprimant de notre expérience toute solution dont la courbe de vitesse de disparition dans le sang n'est pas exponentielle selon la définition donnée au chapitre I.

3° Dans la phase de séparation des fractions protéiques du sérum par EP, les variations du pH du tampon, de l'intensité du courant électrique d'entraînement, de la quantité d'échantillon déposé sur le papier d'EP, ne peuvent introduire d'erreur grave pour autant que les fractions protéiques migrées soient nettement séparées.

Par contre, deux facteurs jouent un rôle primordial dans la phase finale de nos expériences, lors de la détection de la radioactivité présente sur l'EPgramme. Ce sont, d'une part, les mesures de la radioactivité des substances séparées par EP, d'autre part la difficulté de superposer l'EPgramme et le diagramme de radioactivité détectée par l'EP.

4° *L'erreur sur les mesures de la radioactivité* détectée face aux fractions protéiques séparées par électrophorèse: en choisissant les constantes de fonctionnement de l'appareil détecteur-enregistreur

de radioactivité sur la bande d'EP, nous nous sommes basé sur une étude des constantes faites par LERCH et NEUKOMM (24). Eux-mêmes avaient pris comme base le travail de MULLER, WILLIAMS et coll. (*) qui amélioraient la technique de LISSITZKY (**) en imprimant un mouvement continu au chariot transporteur du papier d'EP (* et ** sont cités par LERCH et NEUKOMM (24). On trouvera dans le travail des premiers nommés les valeurs de l'erreur probable en fonction de l'intensité de l'activité détectée.

5° Les *difficultés d'interprétation concernant la superposition de l'EPgramme et de la courbe de l'activité radioactive* résultent du mouvement donné au papier d'EP porteur de sources radioactives voisines, dont les radiations sont détectées simultanément en raison de la largeur d'ouverture de la fenêtre du collimateur. Toutefois, on peut admettre que la courbe de radioactivité se superpose exactement à l'EPgramme au point d'inflexion des pics rencontrés, si bien que la localisation finale de la radioactivité se fait sans erreur notable.

Effets du marquage radioactif sur la migration électrophorétique.

Les expériences réalisées *in vivo* et *in vitro* avec des suspensions doublement marquées (lettres C et D, chapitre III) méritent que nous nous y arrêtions, car elles semblent comporter un certain nombre de contradictions; ainsi :

a) La gélatine pure ou marquée à l'I-131 migre sur environ 5 à 6 cm de papier dans nos conditions expérimentales (expériences 1 et 2). Mais dès que nous combinons le phosphate de chrome à la gélatine, que la gélatine soit marquée ou non, iodurée ou non, que le phosphate soit ou non radioactif, que la solution soit ou non concentrée, la migration est quasi nulle (expériences 3, 4, 5 et 6).

Les propriétés physiques de la micelle de gélatine ne semblent pas modifiées par l'ioduration. Par contre, dès que le phosphate de chrome se combine à la particule colloïdale, tout se passe comme si les propriétés physiques subissaient une importante modification, traduite par un ralentissement de la migration électrophorétique.

b) La gélatine, seule ou marquée à l'iode 131, migre à partir de la ligne de pose de l'échantillon à la même distance que les β-globulines du sérum pur (5 à 6 cm de papier). Nous en déduisons que gélatine pure ou marquée à l'I-131 et β-globulines sont des *molécules à nombre de charges électriques identique* (expériences 1, 2 et 7) (protéines « homologues » — voir plus loin).

Lorsque nous soumettons à l'électrophorèse une suspension de sérum + gélatine marquée, nous retrouvons la radioactivité de l'I-131 sur la portion inter-albumine-α-1-globulines (9,5 à 10 cm de papier) (expérience 9). MAURER et REICHENBACH (25) obtiennent, *in vivo,* un résultat identique chez le lapin. Ces auteurs citent encore GORDON et coll. (14) qui obtiennent, avec du sérum humain, une localisation maximale de l'I* proche des α-1-globulines.

c) Si nous soumettons à l'électrophorèse une suspension de $CrPO_4$ + gélatine marquée à l'iode 131 et mélangée *in vitro* à du sérum de lapin (expérience 10), nous ne retrouvons pas seulement la radioactivité de l'I* sur la fraction inter-albumine-α-1-globulines, comme dans l'expérience 9, mais deux pics radioactifs, l'un à intensité maximale sur la fraction inter-albumine-α-1-globulines et l'autre sur les α-2-globulines.

d) Si nous varions la provenance du sérum de l'expérience 10 en mélangeant *in vivo,* par injection au lapin, la suspension de $CrPO_4$ + gélatine I-131, nous constatons que l'activité décelée de l'iode 131 est en regard des β-globulines uniquement (expérience 11).

En marquant cette dernière suspension non seulement à l'I-131 mais aussi au P-32, nous détectons une répartition radioactive superposable (expérience 12) à celle obtenue par l'expérience 11 : pic d'intense radioactivité sur les seules β-globulines. Les radioactivités décelées sur les albumines et la fraction inter-α sont d'intensité si faible que la marge d'erreur de notre appareil à ces intensités-là ne nous permet pas de les dissocier de la radioactivité ambiante (figure 6).

Cette localisation de la radioactivité de l'iode 131 sur les β-globulines est inhabituelle. Ni MAURER et coll. (25) déjà cités, ni HORST et ROESSLER (18), ni GORDON et coll. (14), ni LARSON et coll. (22), ni MAURER et MULLER (26) ne trouvent, *in vivo,* pareille localisation.

En somme, nous établissons par l'électrophorèse que le comportement de la gélatine — support colloïdal de nos suspensions de CrP^*O_4 — est manifestement influencé par la combinaison *in vitro* du phosphate de chrome à la suspension; que le sérum du lapin est également, tant *in vitro* qu'*in vivo,* un facteur qui modifie le comportement de la gélatine. Nous discutons de l'emplacement qu'occupe la gélatine à l'EP du complexe « phosphate de chrome gélatiné - sérum » et nous constatons que l'emplacement sur les β-globulines de la radioactivité de l'I-131 marquant la gélatine de la suspension de phosphate de chrome C/10 n'a pas été décrit par les auteurs cités.

Dès lors, il nous paraît plausible que la détection en regard des β-globulines de la radioactivité de l'I-131 marquant la gélatine de la suspension de radiophosphate de chrome C/10 soit due à la présence, sur cette fraction protéique, de la gélatine dont la structure physique a été modifiée par l'introduction de cette gélatine dans le sang du lapin. En effet, lorsque nous injectons la suspension colloïdale de $CrPO_4$, la micelle de gélatine subit des modifications telles qu'elle pourrait évoluer en tant que gélatine pure, déchargée du CrP^*O_4. Dès lors, elle migrerait, comme le montrent les expériences 1 et 2, à la même distance que les β-globulines.

Courbes de disparition de la radioactivité dans le sang du lapin.

La discussion des courbes de disparition de la radioactivité dans le sang de nos animaux exige le rappel des conditions et des faits suivants :

1° La suspension est homogène si toutes les particules ont des dimensions du même ordre de grandeur et si la courbe est une exponentielle pure (2, 4, 8, 11, 13, 28, 29).

2° La pente de la courbe est d'autant plus faible que la quantité des particules injectées est plus considérable (4, 10, 29).

3° Dans le cas des courbes que nous discutons, nous administrons une quantité égale en millilitres des trois suspensions C ou C/10.

4° La courbe de disparition est d'autant plus rapide (T/2 plus bref) que les dimensions des particules sont plus grandes (19).

5° Le mode de préparation des deux séries d'injections C et C/10 est rigoureusement identique (30) et les particules de chacune des suspensions doivent avoir une dimension moyenne de 0,2 μ, des dimensions extrêmes comprises entre 0,17 et 0,42 μ et des volumes compris entre 0,0025 et 0,04 μ^3 après 30 minutes de centrifugation à 2000 t/mn (29, 30).

Comparons alors les résultats obtenus dans nos deux séries d'injections (tableau III).

TABLEAU III.

	Suspensions C				Suspensions C/10		
	Activité initiale par ml	T/2	Dose injectée		Activité initiale par ml	T/2	Dose injectée
I	20,0 μC	67 mn	7 ml	XI	15,8 μC	154 mn	9 ml
II	14,2 μC	51 mn	7 ml	XII	17,7 μC	94 mn	9 ml
III	15,0 μC	21 mn	7 ml	XIII	14,2 μC	34 mn	9 ml

On constate alors, en ce qui concerne les suspensions concentrées que, malgré leur préparation rigoureusement identique et leur administration à même dose en ml et en une seule injection, nous n'enregistrons pas des courbes de disparition rigoureusement comparables : si elles suivent toutes les trois la loi exponentielle qui définit les solutions homogènes, par contre la demi-période de leur disparition du sang est notoirement différente d'un cas à l'autre. Elle varie entre 21 et 67 minutes. *On est en droit de conclure que le diamètre moyen des particules est donc différent pour chacune des suspensions* (fig. 7).

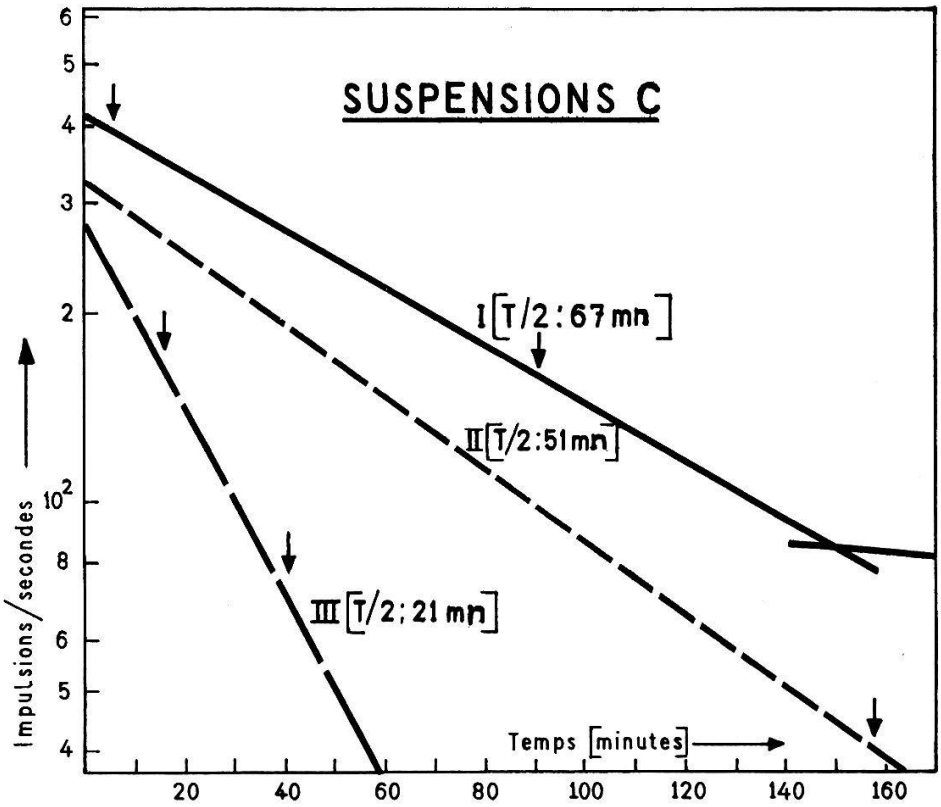

Fig. 7. — Courbe de disparition de la radioactivité de la suspension concentrée dans le sang.

Pour les suspensions diluées, les mêmes remarques s'imposent, à savoir : que ce sont des suspensions homogènes puisque leur courbe de disparition de la radioactivité s'exprime selon une loi exponentielle; que le diamètre des particules est différent d'un cas à l'autre, puisque la demi-période de disparition de la radioactivité est notoirement différente entre les trois suspensions (34 à 154 mn) pourtant injectées en quantité égale chaque fois (figure 8).

Ainsi, il semble bien que chaque préparation d'une nouvelle suspension colloïdale, dans les conditions qui ont été définies, fournit des particules dont le diamètre moyen fluctue sensiblement d'un cas à l'autre. Si le diamètre moyen des particules n'est pas identique pour chacune des suspensions, les diamètres extrêmes restent, au

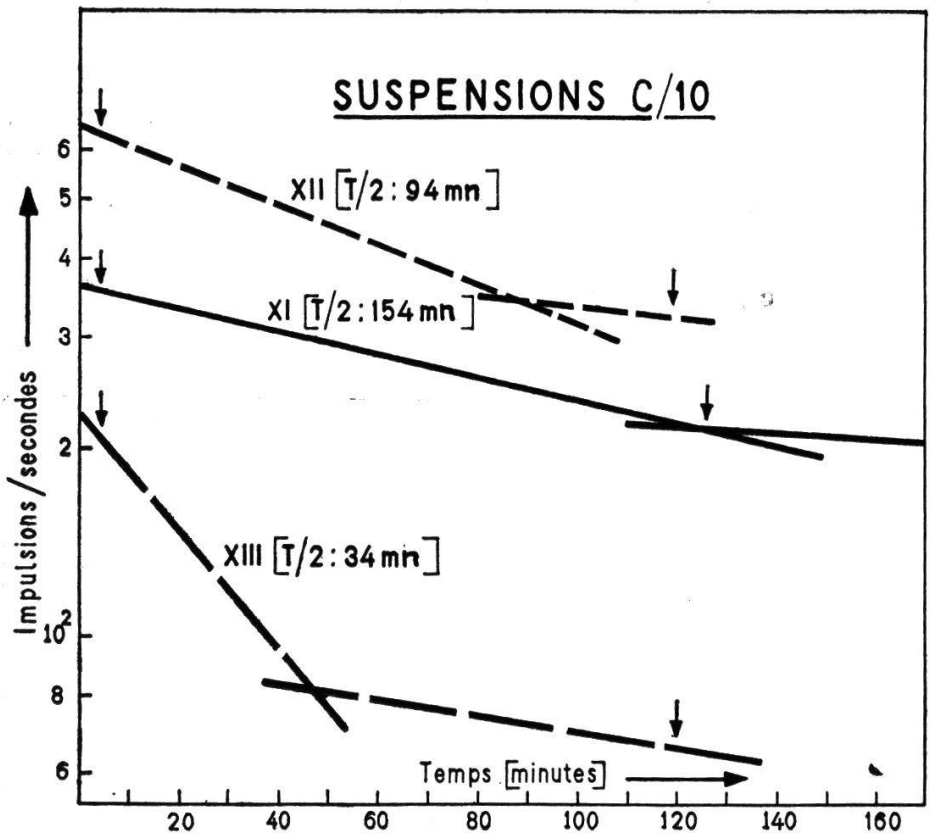

Fig. 8. — Courbe de disparition de la radioactivité de la suspension diluée dans le sang.

sein de chaque suspension, dans des limites telles que le colloïde peut être considéré comme homogène.

Le changement d'inclinaison que montre chacune des courbes de disparition à un temps variable après le moment de l'injection des suspensions a déjà été mis en évidence par Dobson (10), Neukomm et coll. (29) et Zilversmit et coll. (35). Ce phénomène, que Dobson nomme « une queue » (*tail*), ne signifie pas nécessairement que les suspensions sont hétérogènes. Il peut traduire l'existence, dans la suspension, de particules plus fines, qui ne sont pas prises en charge par le SRE. Elles continuent à circuler dans le sang jusqu'à leur élimination dans l'urine.

Electrophorèse et radioactivité détectée dans le sérum.

En comparant les résultats de la détection de la radioactivité sur EP pour les deux séries de suspensions, on est frappé par deux différences essentielles portant d'une part sur la localisation de la radioactivité sur l'EPgramme et d'autre part sur l'intensité relative de chaque localisation.

1° *Localisation de la radioactivité :* pour les solutions C, nous détectons deux pics de radioactivité se superposant à deux fractions protéiques et un seul pic face à une seule fraction protéique pour les solutions C/10.

Ces constatations nous conduisent à admettre que les suspensions C injectées contiennent très probablement deux groupes micellaires de dimensions et de propriétés physiques différentes. La distance de migration, c'est-à-dire aussi la séparation des groupes micellaires, sont fonction du nombre de charges électriques de chacun des groupes micellaires. Ainsi, plus les micelles sont chargées électriquement, plus leur migration est grande, et inversement. Dès lors, si nous soumettons à l'EP deux groupes de micelles à charges électriques différentes, le groupe possédant les micelles à nombreuses charges électriques migrera plus que l'autre dont les micelles sont moins chargées. Si ces groupes micellaires sont porteurs de radioactivité, nous détectons deux pics radioactifs à l'EP. Il suffit qu'un des groupes micellaires ait le même nombre de charges électriques que les γ-globulines, que l'autre groupe ait les mêmes charges que les β-globulines du sérum, pour que nous détections une zone radioactive sur les γ-globulines et une autre sur les β-globulines. C'est bien ce que nous constatons pour nos solutions concentrées.

On est donc finalement conduit à conclure que c'est probablement au cours de la préparation des solutions concentrées — lors de la précipitation du phosphate de chrome dans la gélatine — que se forment ces deux groupes micellaires.

Pour la suite de notre discussion, il nous paraît utile d'adopter la terminologie suivante :

a) La « *fraction protéique homologue* » est la fraction du sérum ou du plasma qui migre à la même distance qu'un groupe de micelles déterminées, parce que tous deux ont le même nombre de charges électriques. Ainsi, les γ-globulines sont fraction protéique homologue d'un groupe de micelles de la solution concentrée, et les β-globulines fraction protéique homologue de l'autre groupe de micelles. Le même raisonnement est valable pour les suspensions C/10.

b) Nous désignons par « *complexe* P* » cette forme du phosphore radioactif associé aux protéines sériques dont la composition chimique n'a pas été déterminée.

2° *Intensité de la radioactivité :* Nous constatons que l'intensité globale de la radioactivité décelée sur l'EP de la solution C/10 est plus forte que celle détectée à l'EP de la solution C. Par exemple, pour une durée identique de circulation de la solution injectée dans le sang, à activités globales du sang égales, l'intensité de la radioactivité de l'échantillon XIII/b (C/10) est 39 fois supérieure à celle de l'échantillon II/a (C) détectée sur l'EPgramme.

Pour pouvoir expliquer ce phénomène, nous avons été amené à formuler les hypothèses suivantes :

La radioactivité décelée en regard des fractions protéiques est effectivement *fixée sur* les fractions protéiques homologues grâce à un changement de support du P-32, lorsque la suspension colloïdale marquée est en présence des protéines du sérum. Le complexe P* quitterait donc la micelle de gélatine pour se fixer sur la protéine sérique homologue, en raison de la labilité des liaisons du P-32 avec la gélatine et simultanément de l'affinité des protéines sériques pour cet indicateur.

En conséquence, si les deux groupes de micelles de la solution C ont des charges électriques peu nombreuses, mais en nombre respectivement différents, ils échangeront le complexe P* avec deux globulines voisines, par exemple les γ-globulines et les β-globulines pour les solutions II et III, ou avec deux fractions protéiques des γ-globulines, pour la solution I. Pour la solution C/10, puisque nous n'avions qu'une sorte de micelles homogènes porteuses de radioactivité, l'échange du complexe P* ne se fait qu'avec une seule fraction protéique, les γ-globulines.

Concernant les résultats comparatifs relatifs à l'intensité de la radioactivité des fractions sériques, tout se passe donc finalement comme si *l'échange du complexe P* de la gélatine avec la fraction globulinique était aisé pour la suspension C/10, et au contraire difficile pour la suspension C.*

Si nous trouvons tout de même une certaine radioactivité sur l'EPgramme des suspensions C, c'est que toutes les liaisons P*-gélatine n'ont pas la même intensité. Nous supposons que dans le cas des solutions C, les liaisons fermes sont en grande majorité; une faible proportion seulement du P* aurait la possibilité de quitter le support gélatiné pour se porter sur la fraction protéique homologue. Les liaisons labiles du P* fixé à la gélatine seraient plus nombreuses que les liaisons fermes dans le cas des solutions C/10.

En résumé, si nous admettons cette différence de labilité des liaisons P*-gélatine, nous pouvons dire que :

Lorsque la liaison P-gélatine est intense, nous ne détectons sur les fractions protéiques homologues qu'une faible radioactivité ; lorsque la liaison est labile, nous détectons une intense radioactivité.*

Il semble que la concentration en phosphate de chrome des suspensions soit le facteur de différenciation entre les suspensions concentrée et diluée, car seule la concentration en $CrPO_4$ diffère lors de la préparation des solutions. La concentration serait responsable de la formation, pour la solution concentrée, de deux groupes micellaires à charges électriques différentes et fixant étroitement le complexe P*, alors que, pour la solution diluée, la dilution du phosphate

de chrome serait le facteur déterminant la formation d'un seul genre de micelles, toutes de charges électriques identiques et homologues aux γ-globulines, fixant le complexe P* de manière labile.

Comportement de la gélatine après l'échange du phosphore radioactif sur les protéines sériques.

Si nous admettons que la gélatine, en présence des fractions protéiques homologues, cède plus ou moins le complexe P*, qu'advient-il de cette gélatine après l'échange de radioactivité avec les protéines sériques? Pourquoi ne retrouvons-nous pas à l'EP la radioactivité résiduelle fixée étroitement au colloïde de la suspension concentrée?

Nous pouvons envisager deux possibilités :

a) nous avons éliminé cette gélatine lors de la centrifugation du sang total prélevé à l'animal; nous ne pouvons pas le prouver, car nous n'avons pas recherché la radioactivité probablement contenue dans le sédiment de globules sanguins ;

b) l'échange du complexe P* libère des charges électriques et le gel, devenu électriquement plus chargé, migre au delà des albumines sériques et échappe à notre détection.

L'étude de la phagocytose par le SRE des micelles des solutions injectées pourrait nous donner réponse. Nous renvoyons au travail de Capitaine (5), qui utilise les mêmes suspensions que nous. Retenons cependant ici que l'on détecte une forte radioactivité dans les organes ayant phagocyté les micelles des solutions concentrées C et une faible radioactivité dans les organes ayant phagocyté les micelles des solutions diluées, la phagocytose étant par ailleurs la plus intense dans des organes différents pour les suspensions C et C/10.

Les suspensions dont les micelles phagocytées apportent une intense radioactivité aux tissus sont celles qui correspondent, dans notre travail, à la présence sur l'EP du sérum d'une faible radioactivité, donc les solutions C, et inversement pour la série des solutions C/10, pour lesquelles nous détectons à l'EP une forte radioactivité, alors que les tissus ne fixent qu'une faible radioactivité.

Capitaine montre que l'intensité de la radioactivité fixée dans les tissus est 15 fois plus élevée pour la série des solutions C que pour celle des solutions C/10, alors que nous détectons une radioactivité sur EP 39 fois plus élevée pour les solutions C/10 que pour les solutions C.

Ces constatations confirment ce que nous supposions des échanges entre gélatine et fraction protéique homologue et étayent singulièrement nos hypothèses.

Dès lors, nous osons dire que :

a) la *gélatine des solutions C* fixe étroitement le complexe P*, n'échange qu'une faible quantité de ce complexe P* avec les protéines homologues et est phagocytée par le système réticulo-endothélial. Faible radioactivité sur les protéines sériques, forte intensité radioactive dans les tissus ;

b) la *gélatine des solutions C/10* fixe les complexes P* de manière labile, en échange la plus grande partie avec les protéines homologues et est phagocytée par le système réticulo-endothélial. Forte intensité radioactive sur les protéines sériques, faible intensité dans les tissus.

En résumé, après échange du complexe P*, la gélatine est entraînée par le courant sanguin et est phagocytée par le SRE.

Nous l'avons déjà dit, les recherches de Capitaine mettent en évidence une localisation de la radioactivité dans les tissus différente s'il s'agit de micelles des suspensions C ou C/10; on trouve en moyenne 78 % de la radioactivité des solutions C fixé dans la rate et 39,9 % de la radioactivité des solutions C/10 dans les reins. La différence existant entre les micelles des solutions C et C/10 se traduit donc non seulement par une répartition différente des charges électriques et par une affinité inégale de fixation du complexe P* sur le colloïde, mais aussi par un comportement différent du pouvoir phagocytaire du SRE.

Le pouvoir de phagocytose du SRE dépendant de la dimension des particules en circulation dans le sang (7, 20, 27), les micelles des solutions C et C/10 sont donc de dimensions moyennes différentes.

Cette constatation rejoint l'hypothèse que nous formulions concernant la charge électrique des micelles des deux séries de suspensions : la solution C est constituée de relativement grandes particules à charges électriques nombreuses et migre sur une assez longue distance à l'EP; la solution C/10, de relativement petites particules, à charges électriques peu nombreuses, ne migrant qu'à faible distance de la ligne de pose à l'EP.

Les particules de grandes dimensions fixent solidement le complexe P*; phagocytées, elles apportent une intense radioactivité aux tissus. La liaison du complexe P* avec les petites particules est labile; phagocytées, ces particules n'apportent qu'une faible radioactivité aux tissus.

Les particules de la solution C sont certainement phagocytées par le SRE avec localisation préférentielle et habituelle dans la rate et le foie (7); les petites particules de la suspension C/10 sont par contre apparemment concentrées dans les reins.

La présence dans les reins de la radioactivité résiduelle fixée aux petites particules pourrait ne traduire qu'un phénomène de simple *clearance* rénale à un moment déterminé, les reins filtrant les par-

ticules qui, en raison de leur faible dimension, ne sont pas phagocytées par le SRE. Cette manière de voir rejoint celle de GOFMAN (13) au sujet des petites particules sans effet Tyndall qui traversent aisément les membranes biologiques.

Notre hypothèse d'une fixation plus ou moins labile du phosphore radioactif sur la gélatine nous conduit encore à examiner le sort de la gélatine après l'échange de ses ions avec les « protéines sériques homologues », ce qui serait le cas des suspensions C/10. Celle-ci peut avoir été séparée du sérum lors de la centrifugation précédant l'EP ou avoir migré plus loin que les albumines du sérum.

Sur la base de nos expériences *in vitro,* nous devions retrouver la gélatine dans la zone des β-globulines. Cette supposition est étayée par le fait que la comparaison des statistiques établies par GEINITZ (12) sur un lot de 12 lapins avec celles de SCHEIFFARTH et BERG (32) sur une série de 16 lapins et les valeurs dans trois de nos cas (tableau IV) montre que le pourcentage de répartition des fractions protéiques du sérum pur de lapin est sensiblement différent de celui trouvé pour deux de nos trois cas.

La différence est sensible principalement pour la fraction des β-globulines.

TABLEAU IV

	BIEDERMANN			GEINITZ (12) *	SCHEIFFARTH et BERG (32) **		
	XI a	I a	II a	12 cas	16 cas		
A	46,2 %	49,1 %	57,1 %	57,6 - 69,3 : 63,2 %	62,2	72,6 %	
α'	8,0 %	10,3 %	12,0 %	4,8 - 7,5 : 6,5 %	5,8	10,1 %	
α^2	8,5 %	10,8 %	8,4 %	4,8 - 8,5 : 5,9 %	2,2	6,0 %	
β	20,7 %	16,0 %	12,0 %	9,3 - 13,9 : 10,7 %	4,3	10,5 %	β_1
					1,9	3,3 %	β_2
γ	11,8 %	12,5 %	9,6 %	9,5 - 19,7 : 13,7 %	6,1	12,7 %	

* et ** cités par RIVA G. (31).

Il est donc possible que l'augmentation de l'extinction lumineuse de la fraction des β-globulines soit due ici à la présence, sur cette fraction, de la gélatine pure, déchargée de sa radioactivité qui a passé sur les protéines homologues. L'augmentation maximale de l'extinction lumineuse de la fraction des β-globulines se trouve dans le cas de la suspension XI(C/10). Mais elle est également constatée pour le cas de la solution I qui est une suspension concentrée. Ce fait, apparemment paradoxal, confirme cependant encore l'hypothèse que nous émettons ci-dessus. En effet, quand même la solution I fait partie du groupe des solutions concentrées, elle possède les carac-

tères des suspensions diluées : T/2 lent signifiant la présence de fines particules, donc de faibles charges électriques ; intense radioactivité détectée à l'EP sur les seules γ-globulines, protéines homologues des fines particules, augmentation de la fraction des β-globulines. Le seul facteur qui rattache cette solution à la série des suspensions concentrées est la détection d'un double clocher radioactif sur les protéines attestant la présence de deux groupes de micelles de gélatine chargées. Les principaux éléments de notre raisonnement peuvent dès lors être schématisés de la manière suivante (figure 9).

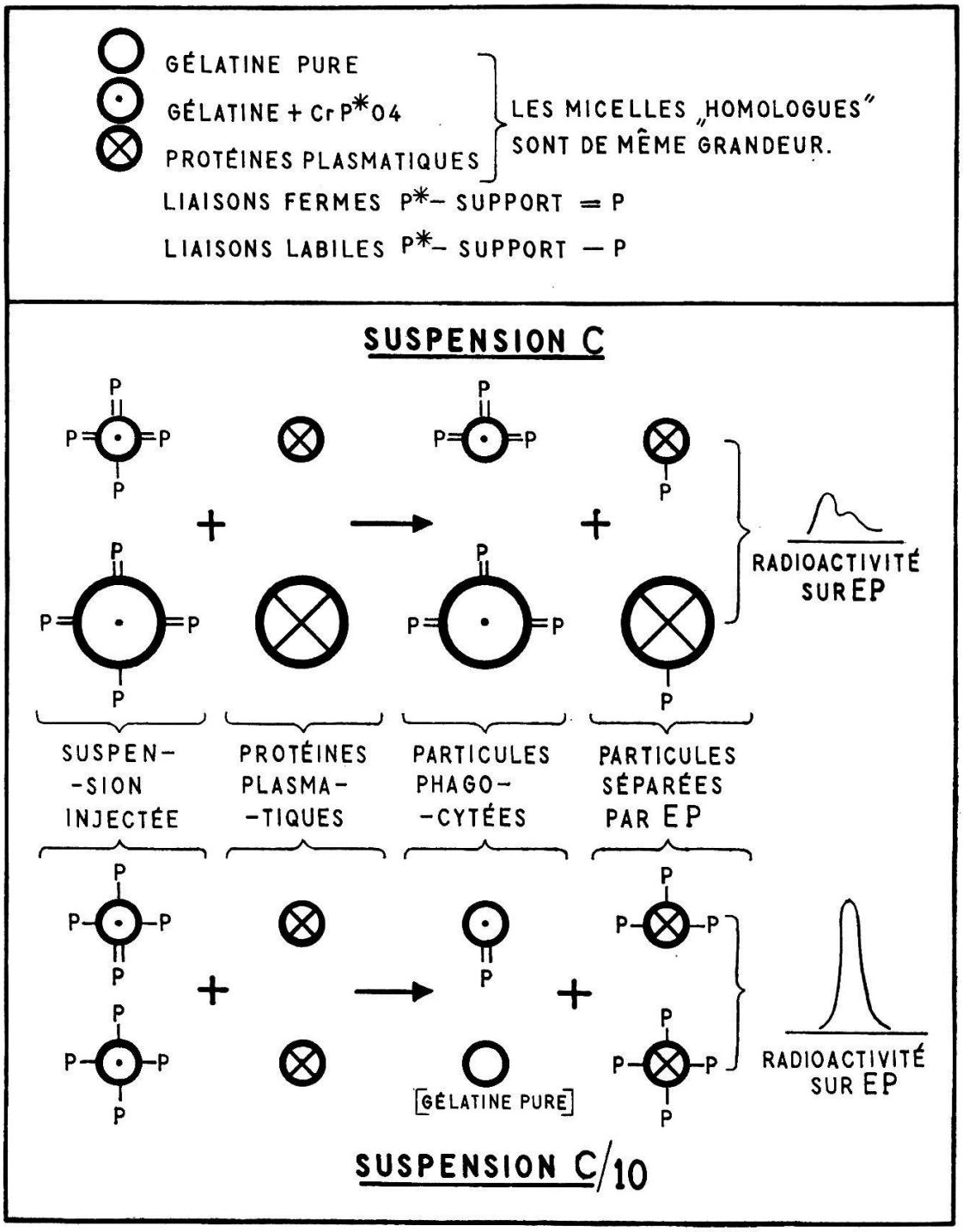

Fig. 9. — Schématisation du comportement des deux suspensions en fonction de la grandeur des micelles et de l'affinité de fixation du phosphore.

Interprétation générale.

De l'ensemble des faits et des considérations précités, nous pouvons imaginer l'interprétation générale suivante :

a) *Dans le cas des suspensions C :* en précipitant le phosphate trisodique dans la gélatine et le chlorure de chrome, il se formerait des micelles en moyenne de grande dimension. Cette formation dépendrait directement de la concentration du $CrPO_4$ précipité. En raison d'une importante densité du précipité en ions P^*O_4, la gélatine constituerait des groupes micellaires de grandes dimensions susceptibles de fixer la totalité des ions P^*O_4. Plus les micelles sont grandes, plus la possibilité de fixation du P* est grande.

Nous avons appelé cette possibilité de fixation « *affinité de fixation* ». Cette affinité est conditionnée par le nombre de « valences libres » sur la micelle de gélatine. Plus les micelles sont grandes, plus elles ont de « valences libres » et plus leur affinité pour le P* est grande.

Un certain nombre de micelles de relativement petites dimensions fixerait une partie des ions P^*O_4 en utilisant la totalité de ses liaisons libres. Le reste des ions P^*O_4 serait fixé sur un second groupe de micelles de dimensions plus grandes. C'est ainsi que se formerait un colloïde à *deux groupes de micelles.*

En admettant maintenant que la liaison des ions P^*O_4 avec la gélatine est plus ou moins forte, selon la grandeur des particules, on peut expliquer que ces deux groupes de micelles, en présence de sérum, échangent le complexe P* de liaison labile avec les « fractions protéiques homologues ». Ce serait la raison pour laquelle nous détectons sur l'EPgramme *deux pics radioactifs* d'intensité différente sur *deux fractions protéiques* différentes.

La suspension C comprenant davantage de grosses micelles à forte affinité pour les ions P^*O_4, on comprend que la radioactivité fixée sur les protéines est de faible intensité.

b) *Dans le cas des solutions C/10,* la quantité diluée au dixième des ions P^*O_4 introduits dans la suspension colloïdale ne nécessiterait que des micelles de dimensions moyennes petites pour s'y fixer. Toutes les micelles formées seraient de même dimension. Parce que de petite dimension, les micelles ne fixeraient le P* que de manière labile. En conséquence, la presque totalité des complexes P* passerait sur les « protéines sériques homologues » après l'injection intraveineuse de la suspension. A l'EP nous devrions détecter une *forte radioactivité* sur *une seule fraction protéique,* ce que l'expérience confirme.

L'analyse faite par NEUKOMM et coll. (23) du « rendement » en phosphate de chrome des solutions C et C/10 étaie notre interprétation de l'affinité de fixation des micelles de gélatine en relation avec la concentration : le rendement en phosphate des suspensions concentrées est de 83 %; pour les suspensions diluées, par contre, le rendement en phosphate n'est que de 54 %.

Nous obtenons donc bien la relation suivante : *à grande affinité de fixation des ions P^*O_4 grand rendement en phosphate ; à faible affinité de fixation, faible rendement en phosphate.*

En somme, en réponse à la première question posée au début de ce travail, *il y a « in vivo » modification des relations physico-chimiques entre le phosphate de chrome et la gélatine, composants élémentaires de la suspension de radiophosphate de chrome gélatinée.*

De l'interprétation que nous venons de faire de la composition des suspensions de radiophosphate de chrome, nous déduisons les réponses aux deux autres questions posées : *il n'y a pas « in vivo » formation d'une « nouvelle micelle » par combinaison de la particule de radiophosphate de chrome gélatiné avec les protéines du sérum.* Nous imaginons un phénomène de simple transfert de la radioactivité de la gélatine sur les protéines sériques, et ceci dans des proportions différentes selon l'affinité de fixation du P-32 sur la gélatine, c'est-à-dire aussi selon la grandeur de la matrice protéique. En conséquence aussi, après administration de la suspension de phosphate de chrome gélatiné, une partie de la gélatine est libérée et circule sous sa forme normale.

Nous ne pouvons pas dire si le « nouveau complexe P^*-globulines » se comporte comme une « nouvelle micelle » vis-à-vis du système réticulo-endothélial.

Quant à la question de la *spécificité de la protéine sérique tenant le rôle de transporteur de particule,* la réponse est, en conséquence de ce qui précède, également négative.

SYNTHESE DU RAISONNEMENT

En étudiant le comportement sanguin chez le lapin de deux suspensions homogènes de radiophosphate de chrome en milieu gélatiné, la suspension dite concentrée (C) et la suspension diluée (C/10), nous établissons les divers faits et constatations suivants :

La suspension concentrée diffère de la suspension diluée sur trois points :

1° La vitesse à laquelle elle disparaît du courant sanguin.

La demi-période de disparition de la radioactivité (T/2) contenue dans la solution C est plus brève que la demi-période de disparition de la solution C/10.

Nous attribuons cette différence à la dimension moyenne des particules constituant le colloïde des suspensions, un T/2 bref signant la présence de particules en majorité de grande dimension.

La suspension C est formée de molécules en moyenne de grande dimension, la suspension C/10 de molécules de dimension en moyenne petite.

2° La liaison du P-32 avec son support colloïdal dans la suspension.

Nous constatons que la radioactivité de P* de la solution C n'est reportée qu'en très faible intensité sur les fractions protéiques du sérum, au contraire de la solution C/10. Nous estimons que ce phénomène est dû à la force des liaisons unissant le phosphate de chrome à la gélatine. Nous émettons l'hypothèse que la force de liaison P*-gélatine est liée à la dimension des particules du colloïde. *A une grande dimension des particules correspond une forte liaison entre le phosphate de chrome et la gélatine, et inversement à de petites particules une liaison labile.*

3° L'affinité des protéines sanguines pour la radioactivité portée par le support colloïdal de la suspension.

Ce point est le corollaire du précédent. Lorsque la liaison P*-gélatine est labile, le P* en présence des protéines du sérum, change de support. Il se porte en quasi totalité sur les protéines. Lorsque la liaison est forte entre le P* et la gélatine, la radioactivité ne change pas de support en présence des protéines du sérum. *A liaisons fermes* du P* sur la gélatine dans la suspension, *faible radioactivité détectée sur les protéines sériques* et inversement, *à liaisons labiles, forte intensité radioactive détectée sur les protéines sériques.*

C'est apparemment la concentration en phosphate de chrome des suspensions qui est responsable des différences existant entre les suspensions C et C/10. Nous établissons qu'en raison de cette concentration les micelles de gélatine de la suspension C sont de grande dimension et que deux groupes micellaires de dimension différente constituent le colloïde de cette suspension, alors que les micelles de gélatine de la suspension C/10 sont toutes de petite et même dimension.

Nous avons été conduit à admettre que les grandes particules lient plus fortement la radioactivité. Les grandes micelles ayant de nombreuses charges électriques migrent à l'électrophorèse sur une relativement grande distance. Selon leur degré d'affinité de fixation du P*, elles échangent tout le phosphore radioactif dont les liaisons sont labiles avec les fractions protéiques homologues, c'est-à-dire des fractions qui ont migré à même distance sur l'EPgramme. C'est ainsi que nous détectons *deux zones peu radioactives sur deux protéines sériques.*

Les petites particules lient moins fortement la radioactivité. Toutes de même dimension et de mêmes charges électriques, les micelles des suspensions C/10 migrent toutes à même distance à l'EP, distance relativement courte. Le phosphore radioactif étant moins fortement lié à la gélatine, il s'échange en quasi totalité avec la fraction protéique de même charge électrique. C'est ainsi que nous détectons une *seule zone fortement radioactive sur une seule fraction protéique sérique.*

Résumé et conclusion

Nous étudions le comportement électrophorétique de deux suspensions colloïdales homogènes de radiophosphate de chrome dans le sang du lapin, l'une dite concentrée et l'autre diluée.

Nous constatons que, quoique homogènes, les suspensions diffèrent l'une de l'autre par la dimension de leurs particules de gélatine, ce qui entraîne une variation du degré d'affinité de fixation de la radioactivité du phosphore, d'abord sur le colloïde de la suspension, ensuite sur les protéines sériques.

Les modifications de la relation physico-chimique gélatine-CrP^*O_4 des suspensions colloïdales de radiophosphate de chrome dépendent probablement de la concentration en phosphate et en chrome au moment de la préparation des suspensions.

Il n'y a pas de protéines sanguines spécifiquement attachées au transport des particules injectées, mais probablement seulement une *analogie de certaines propriétés physiques de la gélatine et des protéines porteuses de la radioactivité* (charges électriques conditionnant la migration électrophorétique).

Zusammenfassung

Wir studieren, mittels der Elektrophorese, das Verhalten zweier homogenen, kolloidalen, radioaktiven Chromphosphat-Suspensionen im Kaninchenblut, d. h. eine konzentrierte und eine verdünnte Suspension.

Wir stellen fest, dass die Suspensionen, obwohl homogen, sich unterscheiden durch die Dimension ihrer Makromoleküle der Gelatine. Dies hat eine Variation des Grades der Fixationsaffinität der Phosphor-Radioaktivität zur Folge, zuerst auf das Kolloid der Suspension, dann auf das Serumeiweiss.

Wir nehmen an, dass es die Aenderung der Chrom- und Phosphatkonzentration bei der Herstellung der Suspension ist, welche die physiko-chemischen Unterschiede verursacht, die die beiden Suspensionen von einander differenzieren.

Für den Transport der Radioaktivität im Blut gibt es kein spezifisches Serumeiweiss. Wir nehmen an, dass der Uebergang der Phosphor-Radioaktivität von der Gelatine auf das Serumeiweiss einzig von einer Analogie gewisser physikalischer Eigenschaften dieser beiden Makromoleküle abhängt (die elektrophoretische Wanderung durch die elektrischen Ladungen bedingt).

Summary

This study concerns the electrophoretic behaviour of two homogenous, colloidal, radioactive $CrPO^4$-suspensions in the rabbit, a concentrated and a diluted one.

It shows that the suspensions- although homogenous- differ from one another by the dimension of their jelly particles.

This leads to a different degree of fixation-affinity of the P-radioactivity, first in the colloidal suspension, then in the serum proteins.

The modifications of the physical-chemical relation between jelly and CrP^*O^4 of the colloidal suspensions depend probably on the chromium and phosphate concentration during the preparation of the solutions.

There is no specific serum protein responsible for the transportation of radioactivity in the blood, but probably only an analogy of certain physical properties between the jelly and the proteins transporting the radioactivity (electrical charges conditioning the electrophoretic migration).

Bibliographie

1. Allen H., Hempelmann L. H. et Womack N. 1945. — *Cancer Res.* *5*, 239.
2. Benacerraf B., Biozzi G., Halpern B. N., Stiffel C. 1957. — Symposium sur la Physiopathologie du système réticulo-endothélial, Blackwell, Oxford, p. 52.
3. Biozzi G., Benacerraf B., Mene G. et Halpern B. N. 1951. — *Ann. Institut Pasteur 81,* 164.
4. — , Halpern B. N. et Benacerraf B. 1953. — *Brit. J. exp. Path. 34,* 426 et 441.
5. Capitaine Y. — Thèse « Etude sur la répartition différentielle dans le système réticulo-endothélial de deux suspensions homogènes de phosphate de chrome colloïdal ». Univ. Lausanne (1964).
6. Dobson E. L. 1946. — A method for measuring the liver circulation rate using colloidal chromic phosphate and the dye T 1824. Thèse, Univ. Columbia.
7. — , Gofman J. W., Jones H. B., Kelly L. S. et Walker L. A. 1949. — *J. Lab. Clin. Med. 34.*
8. — et Jones H. B. 1952. — *Acta med. Scand. 144* supp., 273.

9. — , WARNER G. F., FINNEY G. R. et JOHNSTON M. E. 1953. — *Circulation 1,* 690.
10. — 1957. — Symposium sur la Physiopathologie du système réticulo-endothélial, Blackwell, Oxford, p. 80.
11. GABRIELLI E. R. 1951. — *Acta physiol. Scand. 53,* 283.
12. GEINITZ W. 1954. — *Klin. Wschr. 32,* 1108.
13. GOFMAN J. W. 1949. — *J. Lab. Clin. Med. 34,* 297.
14. GORDON A. H., GROSS J., O'CONNOR D. et PITT-RIVERS R. 1952. — *Nature 19,* 437.
15. HALPERN B. N., BIOZZI G., MENE G. et BENACERRAF B., 1951. — *Ann. Inst. Pasteur 80,* 582.
16. HERVE A. et GOVAERTS J. 1950. — *Acta clin. Belg. 5,* 157.
17. — , — . 1951. — *Acta radiologica 35,* 257.
18. HORST W. et ROESSLER H. 1953. — *Klin. Wschr. 31,* 13.
19. JALLUT O., PEGUIRON L., FEISSLY R. et NEUKOMM S. 1954. — *J. suisse Méd. 39,* 1112.
20. — , — , LERCH P., NEUKOMM S. et FEISSLY R. 1955. — *RES Bull. 3,* 70.
21. JONES H. B., WROBEL C. N. et LYONS W. R. 1944. — *J. clin. invest. 23,* 783.
22. LARSON F., DIESS W. et ALBRIGHT E. 1952. — *Sciences 115,* 626.
23. LERCH P., NEUKOMM S. et VAUCHER D. 1959. — *Bull. Soc. vaud. Sc. nat. 67,* 139.
24. — et — . — Mesures de la radioactivité de substances séparées par électrophorèse, observations non publiées.
25. MAURER W. et REICHENBACH L. 1952. — *Naturwiss. 39,* 261.
26. — et MUELLER E. 1953. — *Biochem. Z. 324,* 255, 325.
27. MULLER J. H. et ROSSIER P. H. 1947. — *Experientia III,* 75.
28. NEUKOMM S., JALLUT O. et LERCH P. 1956. — Etude sur le comportement biologique de diverses suspensions homogènes de phosphate de chrome colloïdal, pp. 155-159, « Radioaktive Isotope », in Klinik und Forschung, Bd II. Ed. Urban et Schweizerberg, München-Berlin.
29. — , LERCH P. et JALLUT O. 1957. — Symposium sur la Physiopathologie du système réticulo-endothélial, Blackwell, Oxford, p. 115.
30. PEGUIRON L., JALLUT O., LERCH P. et NEUKOMM S. 1955. — *RES Bull 1,* 65.
31. RIVA G. 1957. — Das Serumeiweissbild I. Ed. H. Huber, Berne.
32. SCHEIFFARTH F. et BERG G. 1952. — *Z. ges. exp. Med. 119,* 550 (cités par RIVA G.).
33. SHEPPARD C. W., JORDAN G. et HAHN P. 1951. — *Amer. J. Physiol. 164,* 345.
34. WUNDERLY C. 1956. — Electrophorèse sur papier (trad. franç.), Vigot Fre., Paris.
35. ZILVERSMIT D. B., BOYD G. A. et BRUGER M. 1952. — *J. Lab. Clin. Med. 40,* 255.

Manuscrit reçu le 12 novembre 1964.

Rédaction : Mlle Suzanne Meylan, professeur, Treyblanc 6, 1000 Lausanne.
Publicité : M. Pierre Vindayer, av. de la Dôle 13, 1000 Lausanne.
Imprimerie Baud, place de la Riponne, 1000 Lausanne.