

Charge en fer d'une ferritine de cheval

1. Objectif du travail et quelques données concernant la structure de la ferritine.

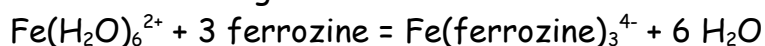
Les ferritines sont les protéines de stockage du fer. Le fer est stocké dans les ferritines à l'état Fe^{3+} . Le fer est indispensable à l'organisme (fer(II) de l'hémoglobine pour le transport de l'oxygène, fer des cytochromes). Fe^{3+} libre est un toxique puissant.

L'objectif est de mesurer la charge en fer d'une ferritine purifiée chez le cheval. Pour cela, le fer d'une quantité donnée de ferritine sera dosé et la charge moyenne en fer de la ferritine pourra être calculée à l'aide de données concernant sa structure (voir paragraphe 2.3 du document).

2. Mesure de la teneur en fer de la ferritine de cheval proposée

Stratégie : l'acide 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phényl)-sulfonique permet de doser le fer(II) par photométrie à 562 nm. Le fer (à l'état $Fe(III)$) de la ferritine sera dosé après libération de l'apoprotéine par dénaturation de celle-ci et réduction à l'état $Fe(II)$.

La ferrozine (acide 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phényl)-sulfonique) complexe le fer(II) et forme un composé rouge magenta permettant un dosage colorimétrique à 562 nm. La réaction du dosage est la suivante :



pH 4 à 8 ; réaction considérée comme totale.

2.1 Étalonage

Selon le tableau ci-dessous (à compléter et reprendre dans le compte-rendu).

Etalonnage	tube TR	tube 1	tube 2	tube 3	tube 4	tube 5
Etalon Fe^{2+} à 0,25 mmol/L (sel de Mohr) dans H_2SO_4 à 0,05 mol/L	0	0,080 mL	0,160 mL	0,240 mL	0,320 mL	0,400 mL
eau distillée	qsp 1 mL					
solution réductrice d'acide ascorbique à 80 mmol/L	0,3 mL					
Tampon pH 4,8 acétate de sodium/acide acétique 1mol/L	1 mL					
Ferrozine à 12,5 mmol/L	0,2 mL					
	Homogénéiser, boucher, lire l'absorbance à 562 nm contre un zéro eau distillée après 10 minutes de développement de la réaction (30 minutes de stabilité).					
Quantité de $Fe(II)$ en nmol	0					
Absorbances contre H_2O						
Absorbances contre le TR	0					

2.2 Essai fer dans la ferritine

L'essai « fer de la ferritine » est réalisé ainsi :

- 0,05 mL de ferritine (ferritine de rate de cheval Sigma à 0,5 mg/mL) à incuber avec 0,25 mL de H_2SO_4 2 mol/L pendant 40 minutes puis on ajoute 0,3 mL de solution réductrice et on incube 10 minutes . Attention : l'homogénéisation de petits volumes est délicate => bonne maîtrise technique (voir la démonstration) ;
- 1,7 mL d'acétate de sodium 0,8 mol/L sont ajoutés afin d'amener le pH vers 4,8 ;
- 0,2 mL de ferrozine à 12,5 mmol/L sont ensuite ajoutés ;
- la solution est mesurée à 562 nm contre de l'eau distillée après 10 minutes de développement de la réaction.

Tester aussi un témoin de compensation échantillon dont on donnera la composition exacte dans le compte-rendu.

On réalisera aussi un essai de dosage du fer de la ferritine sans le traitement de réduction (donc avec 0,3 mL d'eau au lieu de la solution réductrice à l'acide ascorbique).

Remarque : La ferrozine (poudre pure) est classée produit non dangereux. A éliminer en incinérateur chimique à postcombustion. Consulter cependant la fiche FDS (MSDS) pour réaliser le réactif à la ferrozine. Le réactif à 12,5 mmol/L est ainsi classé non dangereux.

2.3 Questions

- Justifier l'incubation de la ferritine en présence d' H_2SO_4 et d'acide ascorbique pour la réalisation du dosage de son fer.
- Calculer la quantité de fer(III) contenue dans $m = 1$ g de ferritine (teneur en fer en mol de fer par g de ferritine).
- Calculer le nombre d'atomes de fer par molécule de ferritine.
- Montrer que, dans le noyau minéral central de la ferritine, la teneur en fer(III) est 10^{15} fois plus concentrée que la concentration en Fe(III) soluble d'une solution aqueuse de pH 7.

Données :

L'enveloppe protéique apoprotéine est constituée par l'agencement de 24 sous-unités identiques. L'enveloppe a finalement une masse moléculaire relative de 474 000 Da. L'apoprotéine a la forme d'une enveloppe de 1 nm d'épaisseur délimitant un espace interne de 80 nm de diamètre lieu de stockage du fer. Cet espace interne est appelé noyau central . Le fer est stocké sous forme d'oxyhydroxyde et d'oxyphosphate de fer(III) de formule globale $[FeO(OH)]_8 [FeO(H_2PO_4)]$ et adopte une structure similaire au minéral appelé ferrihydrite. On a pu mesurer que le noyau central peut contenir jusqu'à 4500 atomes de fer.

Les masses atomiques relatives du fer, de l'oxygène, de l'hydrogène et du phosphore sont respectivement de 55,85 ; 15,999 ; 1,008 et 30,97. Ainsi, la masse moléculaire relative de $[\text{FeO}(\text{OH})]_8$ $[\text{FeO}(\text{H}_2\text{PO}_4)]$ est de 879,7 daltons pour 9 fer contenus. Pour chaque molécule de fer, la masse minérale de noyau central est donc de 97,7 daltons.

En solution aqueuse, le fer(III) forme des hydroxydes.
 $\text{Fe}^{3+} + 3 \text{OH}^- = \text{Fe}(\text{OH})_3$ Le pKs de l'hydroxyde est de 38.

Nombre d'Avogadro : $N = 6,02 \cdot 10^{23}$.

3. Justification expérimentale du choix de longueur d'onde 562 nm pour le dosage

En utilisant « des » tube(s) de la gamme d'étalonnage présentée au paragraphe précédent, effectuer un ou des spectre(s) justifiant le choix de longueur d'onde 562 nm pour le dosage.

4. Bibliographie

- M. J. Donlin, R. F. Frey, C. Putnam, J. K. Proctor, J. K. Bashkin ; Analysis of iron in ferritin, the iron-storage protein ; Journal of chemical education, (1998) :75, 437-441.
- Epreuve de techniques biochimiques, concours INA-ENSA-ENITA, option TB, session 2000.
- Cerriotti F., Cerriotti G., Improved direct specific determination of serum iron and total iron-binding capacity ; Clin. Chem. 1980 Fevr. 26(2):327-31
- Remerciements à J-F Le Flohic.