

50 376
1980
102

N° d'ordre : 477

50376
1980
102

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

T H E S E

présentée à l'Université de Lille I pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

OPTION BIOCHIMIE

par

Yves PLANCKE

L'HEMOPEXINE HUMAINE :

ETUDE DE SES INTERACTIONS AVEC L'HEME



Présentée le 29 Avril 1980



030 021469 8

JURY : *Président* : M. J. MONTREUIL
Rapporteurs : M. G. BISERTE
Mlle G. SPIK
M. R. ENGLER
M. C. LOMBART
Examineurs : M. J. MONTREUIL
M. M. DAUTREVAUX

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale

M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Sciences de la Terre
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Sciences de la Terre
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale

M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUBRULLE Alain	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. HOUDART René	Mathématiques
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEMAIRE Jean	Physique
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquée
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislav	Electronique
M. RICHARD Alain	Biologie

M. RIETSCH François
M. ROGALSKI Marc
M. ROUSSEAU Jean-Paul
M. ROY Jean-Claude
M. SALAMA Pierre
Mme SCHWARZBACH Yvette
M. SCHAMPS Joël
M. SIMON Michel
M. SLIWA Henri
M. SOMME Jean
Mlle SPIK Geneviève
M. STERBOUL François
M. TAILLIEZ Roger
M. THERY Pierre
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. VANDORPE Bernard
M. VILETTE Michel
M. WALLART Francis
M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Chimie
Analyse
Physiologie Animale
Psychophysiologie
Sciences Economiques
Mathématiques
Physique
Sociologie
Chimie Organique
Géographie
Biochimie
Informatique
Biologie
Electronique, Electrotechnique, Automatique
Automatique
Chimie Minérale
Résistance des Matériaux
Chimie
Géologie Générale
Informatique Fondamentale Appliquée
Algèbre

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le Professeur MONTREUIL d'avoir accepté la Présidence du Jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur BISERTE qui m'a confié ce thème de recherche auquel il était particulièrement attaché. Au cours de fréquentes réunions de travail il m'a suivi avec intérêt malgré ses nombreuses occupations.

Je remercie Mademoiselle le Professeur SPIK, ainsi que Monsieur le Professeur ENGLER et Monsieur LOMBARD, Maître de Recherches à l'INSERM, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.

Monsieur le Professeur DAUTREVAUX connaît les difficultés que j'ai rencontrées. Qu'il soit remercié pour son soutien constant et pour les conseils qu'il m'a prodigués.

Les spectres de dichroïsme circulaire reportés au chapitre V ont été obtenus dans le service commun de Biophysique Macromoléculaire de l'INSERM et du CNRS de LILLE dirigé par Madame LOUCHEUX, Maître de Recherches au CNRS à qui j'exprime toute ma gratitude. Je remercie aussi J.P. AUBERT et M.P. HILDEBRAND pour l'accueil qu'ils m'ont réservé.

Je remercie Monsieur le Professeur CHAMBON, mon parrain au CNRS, pour l'attention bienveillante avec laquelle il a toujours suivi mes travaux.

Je tiens à exprimer à Monsieur le Professeur Paul BOULANGER toute ma gratitude pour m'avoir accepté dans l'Ecole de Biochimie qu'il a créée.

L'HEMOPEXINE HUMAINE :

ETUDE DE SES INTERACTIONS AVEC L'HEME

TABLE DES MATIERES

	PAGES
AVANT-PROPOS	1
1ERE PARTIE	
CHAPITRE I : GENERALITES SUR L'HEMOPEXINE	6
I - L'HEMOPEXINE	
1.1 - INTRODUCTION	7
1.2 - ROLE	8
1.3 - CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE	9
1.4 - DETERMINATION DU SITE DE LIAISON à l'HEME	10
1.5 - ETUDES EN DICHROISME CIRCULAIRE	12
1.6 - PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES	15
II - LA COUPURE DE l'HEME	17
2EME PARTIE : CONTRIBUTION PERSONNELLE	24
CHAPITRE II : CHANGEMENT DE POINT ISOELECTRIQUE DE L'HEMOPEXINE HUMAINE LORS DE SA LIAISON A L'HEME	24
Premier article	27
Rappel des résultats	31
Discussion	32

CHAPITRE III : PREUVE DIRECTE DU CHANGEMENT
DU POINT ISOELECTRIQUE DE L'HEMOPEXINE
HUMAINE LORS DE SA LIAISON A L'HEME

UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT
DES PROTEINES DU SERUM

38

Description de la méthode

39

La chromatographie de déplacement

40

*La chromatographie de tamisage
moléculaire*

41

La chromatographie d'échange d'ion

42

Deuxième article

44

CONCLUSION : RAPPEL DES RESULTATS

49

CHAPITRE IV : COUPURE DE L'HEME CATALYSEE
PAR L'HEMOPEXINE HUMAINE

54

Article en préparation

I - INTRODUCTION

55

2 - MATERIEL ET METHODES

56

2.1 - Dosage de la bilirubine

Principe de la méthode

56

Spécificité

57

Appareillage

58

Réglage

58

2.2 - L'oxydation croisée au cours de la
chromatographie de déplacement

60

Protocole de co-oxydation

61

3 - RESULTATS	62
4 - DISCUSSION	71

CHAPITRE V : ETUDE DES SPECTRES D'ABSORPTION ET DES SPECTRES DICHROIQUES DE L'HEME

HEMOPEXINE HUMAINE	75
--------------------	----

1 - INTRODUCTION	76
2 - MATERIEL ET METHODES	78
3 - RESULTATS	80
3.1 - Spectres d'absorption	80
3.2 - Spectres dichroïques	84
3.3 - Comparaison des spectres dichroïques	86
4 - DISCUSSION	90
4.1 - Hypothèse concernant la nature du chromophore responsable de l'ellipticité négative à 435 nm	93
4.2 - Coupure oxydative	95
4.3 - Liaison de l'hème réduit ou ferro-hème	97
4.4 - Eventualité d'un deuxième site d'interaction de l'hémopexine avec l'hème	100
5 - CONCLUSION	103

CONCLUSION GENERALE	105
---------------------	-----

Bibliographie	108
---------------	-----

AVANT-PROPOS

L'hémopexine est une protéine du sérum sanguin connue pour son aptitude à fixer l'hème ; cette propriété caractéristique pourrait faire jouer un rôle physiologique particulier à l'hémopexine dans le transport de l'hème des chromoprotéides libérés accidentellement dans le sérum sanguin par hémolyse ou par écrasement des cellules musculaires ; elle pourrait également jouer un rôle spécifique dans son élimination par captation sélective par l'hépatocyte. Dans ce contexte, l'étude de la liaison de l'hème à l'hémopexine et surtout des changements de propriétés physicochimiques que cette liaison induit au niveau de l'hémopexine nous a semblé intéressante car elle nous permettrait peut-être de comprendre le mécanisme de reconnaissance spécifique du complexe hème-hémopexine.

Dans ce but, il nous fallait d'abord caractériser et isoler les différentes formes d'hémopexine du sérum sanguin humain, apohémopexine du sérum circulant, complexe hème-hémopexine du sérum sanguin additionné d'hème "in vitro". L'étude comparative des propriétés physicochimiques de l'apohémopexine et du complexe hème-hémopexine pouvait être réalisée en tenant compte

des méthodes et des résultats obtenus avec l'hémoglobine ou la myoglobine : changement du point isoélectrique, variations dans le spectre optique de l'hème, études en dichroïsme circulaire

D'un autre côté, un certain nombre de données recueillies dans la littérature nous incitaient à mettre en évidence un rôle plus spécifique de l'hémopexine dans la dégradation de l'hème au niveau de l'hépatocyte, rôle exercé grâce à une activité auto-catalytique du complexe hème-hémopexine qui permettrait un catabolisme hépatique de l'hème par un mécanisme de co-oxydation analogue à celui qui a été signalé comme pouvant se produire accidentellement au niveau de la plupart des hémoprotéides ; ici encore, nous avons repris pour cette étude les méthodologies déjà appliquées aux chromoprotéides, en particulier l'action des réducteurs de l'hématine en présence d'un agent d'oxydation comme l'oxygène moléculaire et l'étude de la production de bilirubine qui en résulte.

Une partie des résultats présentés dans ce mémoire ont déjà fait l'objet de deux publications :

PLANCKE, Y., DAUTREVAUX, M. et BISERTE, G. (1977)

Change of human hemopexin isoelectric point upon heme binding
FEBS Letters, 78, 291-294.

PLANCKE, Y., DAUTREVAUX, M. et BISERTE, G. (1978)

Human serum hemopexin : direct evidence for change of its
isoelectric point upon heme binding. A new serum protein
fractionation

Biochimie, 60, 171-175.

Justification de la terminologie utilisée en fonction
des principales références

Le terme "hème" a été utilisé pour désigner la fer-protoporphyrine IX. Ce terme dispense de faire la distinction entre la ferriprotoporphyrine IX et la ferroprotoporphyrine IX.

La ferriprotoporphyrine IX est encore appelée chlorhème ou chlorhydrate d'hématine. Elle cristallise en prismes allongés connus sous le nom de cristaux de Teichmann.

- MORGAN, W.T. et VICKERY, L.E. (1978) J. Biol. Chem., 253, 2940-2945.
Magnetic and natural circular dichroism of metalloporphyrin complexes of human and rabbit hemopexin.
 - (heme (iron-protoporphyrin IX) ...
 - ferriheme-hemopexin
 - other bisimidazole-coordinated heme derivatives
 - under aerobic conditions, heme-hemopexin is in the fully oxidized state. The ferroheme-hemopexins also exhibit MCD spectra similar to that of ferrocytochrome b_5 , consistent with a low spin state and histidyl side-chain coordination of the heme iron in the reduced as well as in the oxidized state.
 - The abbreviations used are : heme, iron-protoporphyrin IX.
- KODICEK, M., HRKAL, Z. and VODRAZKA, Z. (1977), Biochim. Biophys. Acta, 495, 268-278.
On the molecular conformation of human hemopexin. II. Analysis of circular dichroic spectra.
 - haem-hemopexin.

- HSU, M.C. et WOODY, R.W. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93 (14), 3515-3525.

The origin of the heme cotton effects in myoglobin and hemoglobin

SCHMID, R. et Mc DONAGH, A.F. (1975) Ann. N.Y. Acad. Sc., 244, 533-552.

- heme proteins
- heme ...
- hemoglobin-heme. ... heme ring.

- O'CARRA, P. et COLLERAN, E. (1969) FEBS Letters, 5 (4), 295-298.
Haem catabolism and coupled oxidation of haem-proteins.

- GRAY, C.H., NICHOLSON, D.C. and TIPTON, G. (1972) Nature, 239, 5-8.
Degradation of haem compounds to bile pigments.

- LEHTOVAARA, P. et PERTILA, U. (1978) Biochem. J., 176, 359-364.
Bile pigment formation from different leghaemoglobins. Methine-bridge specificity of coupled oxidation.

- The coupled oxidation of leghaemoglobins with O₂ and ascorbate yielded oxyleghaemoglobin in the first reaction step, and the second step was the degradation of haem characterized by an A₆₇₅ increase.
- the degradation of haem.

1ERE PARTIE

CHAPITRE I

GENERALITES SUR L'HEMOPEXINE

I - L'HEMOPEXINE

1.1 - INTRODUCTION

La présence de protéines liant les porphyrines dans le sérum des mammifères est bien connue. La première de ces protéines qui ait été décrite fut la sérumalbumine (FAIRLEY) (1938) (1)* ; (HEILMEYER) (1933) (2). Ses propriétés physico-chimiques tout comme son interaction avec l'hème et d'autres porphyrines ont été précisées (PETERS) (1970) (3). Cependant, l'interaction de la sérumalbumine avec d'autres ligands tels que les lipides (SPECTOR et al.) (1969) (4) et la bilirubine (JACOBSEN) (1969) (5) a été étudiée aussi de façon très précise. C'est en 1957 que l'hémopexine, une β -glycoprotéine du sérum fut découverte (ALLISON et REES) (1957) (6) ; (NEALE et al.) (1958) (7).

Par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium de liquide d'ascite cancéreuse et par séparation chromatographique sur DEAE-cellulose, BISERTE, HAVEZ, LATURAZE et HAYEM-LEVY (1960) (8) ont purifié une glycoprotéine perchlorosoluble (séromucoïde β_1) qui possède la même affinité pour l'hème et les mêmes caractères antigéniques que l'hémopexine : il s'agit de la même protéine sérique.

(*) Les numéros entre parenthèses correspondent à l'ordre d'apparition dans le texte (voir bibliographie à la fin du mémoire).

Du fait de l'introduction des articles, chaque chapitre possède sa propre numérotation des figures, reprise à chaque fois à partir du chiffre un.

Pour éviter toute confusion, la référence à une figure s'accompagne du numéro de la page correspondante.

Bien que d'autres protéines liant les porphyrines puissent exister (KOSAKI et al.) (1957) (9) ; (SUGITA) (1962) (10) ; (KOSKELO et al.) (1971) (11) ; (MORGAN) (1978) (12) ; TIPPING et al.) (1978) (13), on dispose de peu d'informations les concernant.

1.2 - ROLE

Les études actuelles suggèrent manifestement que l'hémopexine fonctionne comme une protéine de transport qui lie fortement l'hème dans la circulation sanguine et l'achemine sélectivement vers les cellules du parenchyme hépatique (HERSKO) (1975) (14) ; (LIEM) (1974) (15) ; (FOUCRIER et al.) (1979) (16) ; (MULLER-EBERHARD et al.) (1970) (17). Par exemple, le temps de demi-clairance plasmatique de l'hémopexine native chez le lapin est ramené de 30 heures à 6 heures à la suite d'injection intraveineuse d'hème (CONWAY et al.) (1975) (18) ; (LIEM et al.) (1975) (19) . Ceci implique non seulement que l'hémopexine peut concurrencer nettement la sérumalbumine (MULLER-EBERHARD et MORGAN) (1975) (20), mais aussi que la formation du complexe hème-hémopexine produit un changement conformationnel dans la protéine qui aboutit à sa reconnaissance par l'hépatocyte.

Bien que sa teneur dans le sérum chez la plupart des mammifères soit relativement importante, de l'ordre de 0,3 à 1,5 mg/ml (BRAUN) (1971) (21) ; (SCHULTZE et HEREMANS) (1966) (22), la protéine est très difficile à isoler (MULLER-EBERHARD et LIEM) (1974) (23). Ceci est probablement dû au grand nombre de β -protéines

sériques et aussi à la nature glycoprotéique de l'hémopexine. La concentration en hémopexine sérique peut être facilement déterminée par immunodiffusion radiale (BRAUN) (1971) (24).

1.3 - CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE

Les compositions en acides aminés et en sucre de l'hémopexine humaine sont présentées dans le Tableau I (HAVEZ et al.) (1967) (25) ; (HEIMBURGER et al.) (1964) (26) ; (HRKAL et MULLER-EBERHARD) (1971) (27) ; (HAYEM-LEVY et HAVEZ) (1973) (28). Il est difficile de comparer les résultats obtenus par différents auteurs pour la composition en acides aminés car les valeurs du poids moléculaire sont très différentes. La valeur admise actuellement est celle donnée par SEERY et al. (1972) (29), soit $57\ 000 \pm 3\ 000$.

HAYEM-LEVY et HAVEZ ont identifié, par la méthode de dinitrophénylation, l'acide aminé en position N-terminale : il s'agit de la thréonine. La cinétique d'hydrolyse par la carboxypeptidase a permis à ces auteurs, de caractériser l'histidine en position C-terminale, immédiatement suivie de l'acide aspartique en position subterminale (1973) (30). L'hémopexine est dépourvue de groupes sulfhydryles libres (HRKAL et MULLER-EBERHARD) (1971) (31).

L'interaction de l'hémopexine avec les porphyrines et les métalloporphyrines a été très étudiée. Dans une étude préliminaire, un rapport de liaison de 15 à 20 molécules d'hème par molécule

d'hémopexine a été proposé (SCHULTZE et al.) (1961) (32), mais dans une autre publication, le même groupe de chercheurs a trouvé un rapport de liaison 1/1 et a attribué son observation initiale à la tendance bien connue de l'hème à s'agréger en solution aqueuse (HEIDE et al.) (1964) (33).

La constante de dissociation (K_d) du complexe hème-hémopexine a été estimée à $10^{-13}M$, à partir d'échange d'hème avec la ferrihémoglobine (HRKAL et al.) (1974) (34). Il faut noter que, initialement, la mise en évidence de l'hémopexine dans le sérum et d'autres liquides biologiques avait été rendue possible par cette aptitude à lier divers chromoprotéides : hémoglobine, myoglobine, cytochrome c (BISERTE et al.) (1960-a)(35).

1.4 - DETERMINATION DU SITE DE LIAISON A L'HEME

HAYEM-LEVY et HAVEZ (1973) (36) ont montré que l'alkylation des résidus d'histidine de l'hémopexine abolissait sa faculté de liaison à l'hème. Ces auteurs ont montré que la combinaison de l'hémopexine à l'hème peut être comparée à la fixation de l'hème sur la globine dans l'hémoglobine ou la myoglobine. Ils se sont inspirés des travaux de WYMAN (1938) (37) montrant l'implication directe de certains résidus d'histidine dans cette liaison. Ces résidus ayant une activité particulière (protonisation d'un azote imidazolique) et pouvant être bloqués par l'action de l'acide monoiodoacétique à pH 5,5.

TABLEAU I

COMPOSITION CHIMIQUE DE LA MOLECULE
d'HEMOPEXINE HUMAINE

A - COMPOSITION DE LA COPULE PROTEIQUE

NOMBRE DE RESIDUS D'ACIDES AMINES PAR MOLECULE

	HAVEZ et al. (1967) (25)	HEIMBURGER et al. (1964) (26)	HRKAL et MULLER- EBERHARD (1971)(27)
Poids moléculaire	62.000	80.000	69.800
Asp	32	45	46
Thr	20	27	25
Ser	26	33	32
Glu	36	48	45
Pro	27	38	37
Gly	36	45	49
Ala	25	32	33
Cys	8	11	12
Val	22	28	28
Met	2	7	4
Ile	8	11	10
Leu	32	42	41
Tyr	13	18	16
Phe	15	21	22
Lys	20	26	26
His	16	19	20
Arg	16	23	23
Trp	N.D.	18	18
Total	354	492	487

B - COMPOSITION GLUCIDIQUE (g/100 g)

	HAYEM-LEVY et HAVEZ (1973)(28)	HEIMBURGER et al. (1964) (26)	HRKAL et MULLER- EBERHARD(1971)(27)
Hexoses (Gal/Man = 1)	8,5	9,00	6,92
Osamines	4,5	7,40	7,73
Acide sialique	4,0	5,00	6,92
Fucose	0,9	0,40	-



Après alkylation, il n'est plus possible de mettre en évidence la formation d'un complexe ; il n'y a plus de déplacement du maximum de 390 à 414 nm ni apparition des bandes mineures à 530 et 564 nm, et les spectres des solutions d'hème libre et du mélange hème et hémopexine-carboxyméthylée sont strictement superposables. La composition en acides aminés de l'hémopexine alkylée est inchangée, sauf en ce qui concerne la teneur en histidine : ils n'ont dosé en effet, après alkylation que 14 résidus d'histidine sur les 16 de la glycoprotéine native ; deux résidus d'histidine ont été retrouvés sous forme de carboxyméthyl histidine. Ces auteurs ajoutent que la liaison avec l'hème ne s'effectue pas par l'histidine située en position C-terminale.

Par des méthodes spectrométriques, AISEN et al. (1974) (38) ont apporté la confirmation des résultats originaux de HAYEM-LEVY et HAVEZ (1973) (39) concernant l'implication de 2 histidines dans la liaison de l'hémopexine à l'hème.

1.5 - ETUDES EN DICHROISME CIRCULAIRE

En dépit des difficultés rencontrées lors de leur interprétation, les spectres de dichroïsme constituent une source précieuse de renseignements concernant la conformation des protéines en solution ainsi que leur interaction, soit avec d'autres macromolécules biologiques, soit avec de petites molécules.

Rappelons que, pour qu'une molécule soit optiquement active, c'est-à-dire qu'elle présente un dichroïsme circulaire, elle doit comporter des chromophores soit intrinsèquement

dissymétriques (l'activité optique est, dans ce cas, inhérente à la géométrie du chromophore) soit intrinsèquement symétriques mais perturbés de façon dissymétrique (l'activité est dans ce cas induite par l'environnement du chromophore).

Suivant la position du signal dichroïque, on distingue trois zones d'analyse des spectres en fonction de la longueur d'onde :

- L'ultra-violet lointain, de 180 à 230 nm

On y trouve le chromophore peptidique pour lequel les calculs complets sont disponibles en vue de la définition du pourcentage d'hélice alpha d'une protéine ou d'un peptide en fonction de son activité optique.

- Le proche ultra-violet, de 230 à 350 nm

On y trouve les chromophores aromatiques, ainsi que les ponts disulfure ; leur analyse nous donne des renseignements concernant l'organisation spatiale de la molécule. En général, il n'y a pas de superposition des signaux dichroïques entre le domaine de l'ultra-violet lointain et celui du proche ultra-violet.

- Le visible, de 350 à 500 nm qui est le domaine de l'absorption de l'hème dans une zone de longueurs d'onde voisine de 400 nm appelée bande de Soret.

Cas particulier de l'hémopexine

On retrouve ces trois séries de bandes, mais du fait de la teneur très importante de l'hémopexine en tyrosine et en tryptophane (Tableau I), il existe une bande intense à 231 nm, suffisamment intense pour perturber les bandes de l'ultra-violet lointain. L'interprétation des bandes situées à 180-230 nm en terme de structure secondaire est donc délicate. Cette observation a été faite par KODICEK et al. (1977) (40).

Dans les spectres de dichroïsme circulaire, l'hème libre ne présente pas de signal dichroïque, du fait de sa symétrie (HSU et WOODY) (1971) (41). Les hémoprotéines, en revanche, présentent un signal dans cette zone de Soret : ceci traduit une asymétrie du chromophore hémique qui lui est conférée par son environnement protéique. L'étude du signal dichroïque dans cette zone apporte donc des informations concernant l'asymétrie imposée par le "solvant" polypeptidique, car ce signal est sensible à la structure protéique et il peut être différent selon l'hémoprotéine considérée, du point de vue de son interaction avec le chromophore.

Cependant, l'étude de l'origine de l'activité optique induite par les groupes prosthétiques est un domaine dont l'exploitation est extrêmement délicate. HSU et WOODY (1971) (42) ont étudié les effets Cotton associés aux transitions électroniques de l'hème pour un grand nombre d'hémoprotéines telles que la myoglobine, l'hémoglobine, le cytochrome c et la peroxydase du

raifort : leurs calculs ont démontré une interaction entre l'hème et les résidus aromatiques voisins dans la protéine.

En poursuivant ces études dans le cas de l'hémopexine, KODICEK et al. ont pu établir que les résidus aromatiques de tyrosine et de tryptophane viennent au voisinage immédiat de l'hème (1977) (43). De même, MORGAN et MULLER-EBERHARD (1972) (44) ont montré que l'interaction avec l'hème provoque une augmentation du signal dichroïque à 231 nm qui peut aller jusqu'à 50 p. 100 au cours de la liaison à l'hème.

Ces auteurs ont aussi allié les études en dichroïsme circulaire aux études de modifications chimiques d'acides aminés essentiels. La modification chimique spécifique des résidus de tryptophane a été réalisée par le N-bromosuccinimide (MORGAN et MULLER-EBERHARD) (1974) (45) et celle des résidus d'histidine par photo-oxydation d'un complexe rose bengale-hémopexine (SEERY et al.) (1975) (46). L'une ou l'autre de ces modifications chimiques supprime l'augmentation du signal dichroïque à 231 nm lors de l'interaction avec l'hème. Ces observations suggèrent que le tryptophane est nécessaire à la liaison de l'hème. Quant au résidu d'histidine, une nouvelle preuve est ainsi apportée de son implication dans le site actif de l'hémopexine comme l'avaient établi HAYEM-LEVY et HAVEZ (1973) (47).

1.6 - PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES

Un rôle coopératif de la sérumalbumine et de

l'hémopexine dans le transport de l'hème et dans la production de pigments biliaires a été proposé dès 1971 par DRABKIN (1971) (48). Dans la perfusion du foie isolé du rat le (^{14}C) hème et la (^{14}C) hème hémopexine se sont montrés d'excellents substrats pour la production de pigments biliaires. L'hémoglobine et l'hème-albumine non dénaturée, comme témoins, ne produisent pas d'augmentation significative de la formation de pigments biliaires. Par contre, dans un système microsomal hépatique, en présence d'hème-oxygénase, l'hème lié à l'hémopexine peut servir de substrat (TENHUNEN et al.) (1969) (49) pour la production de pigments biliaires.

Le taux rapide d'élimination de l'hème du plasma "in vivo" et le maintien de la formation à un taux constant de l'hémopexine après l'injection répétée d'hème suggère soit un renouvellement rapide de la protéine liant spécifiquement l'hème, soit sa réutilisation ou son recyclage, après qu'elle ait transporté l'hème qu'elle a lié, au foie. L'hémopexine permettrait donc le transport de l'hème et son passage à travers la barrière membranaire dans l'hépatocyte ou l'hème peut être dégradé en pigments biliaires (DRABKIN) (1971) (50).

Dans des expériences plus récentes SMITH et MORGAN (1979) (51) montrent que l'hémopexine transporte l'hème à un récepteur hépatique et retourne ensuite dans la circulation.

II - LA COUPURE DE L'HEME

Nous analyserons les systèmes biologiques et les analogues chimiques de la coupure de l'hème ainsi que les dérivés chimiques et biologiques des bilines obtenues à partir de l'hème.

Les composés héminiques sont particulièrement sensibles à l'attaque oxydative dans la position meso, c'est-à-dire aux ponts méthynes reliant les noyaux pyrroliques. Une telle oxydation conduit rapidement à la coupure ou à l'élimination du pont méthyne, provoquant une coupure du macrocycle porphyrinique et à la formation d'une chaîne ouverte de structure tétrapyrrolique (Schéma 1, page 18).

Le devenir du pont carboné éliminé oxydativement fut établi dans les années 1950 par SJOSTRAND (1951) (52) ; (SJOSTRAND) (1952) (53) ; (SJOSTRAND) (1970) (54). Cet auteur a montré que le catabolisme de l'hème chez les animaux se traduit par une formation stochiométrique de monoxide de carbone, métabolite très inhabituel qui n'apparaît s'associer qu'au clivage de l'hème, tout au moins chez les animaux.

D'autres études du clivage chimique de l'hème par des oxydations couplées "in vitro", ont démontré une formation similaire de monoxide de carbone à partir du pont carbone éliminé.

(LUDWIG et al.) (1957) (55) ; (ANAN et al.) (1961) (56). Ces études ont montré que les systèmes "in vitro" représentent des analogues proches du processus de clivage "in vivo".

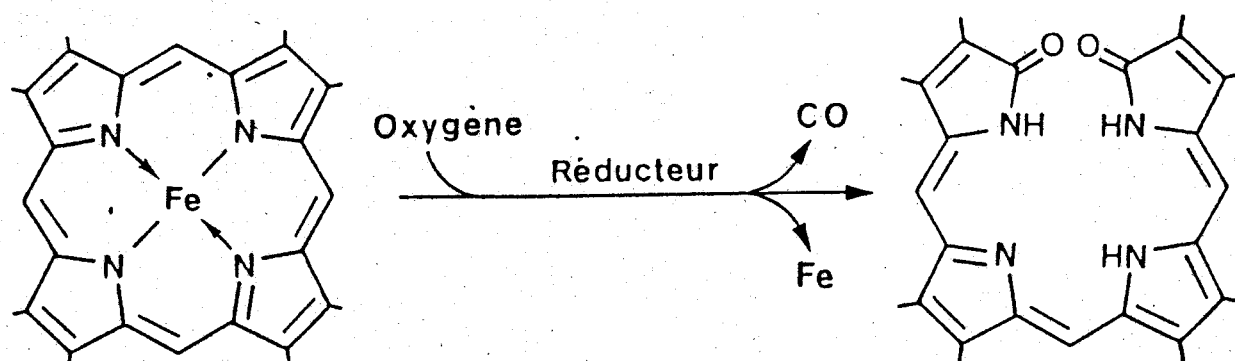


Schéma 1 : Coupure oxydative du cycle tétrapyrrolique de l'hème conduisant à une structure tétrapyrrolique en chaîne ouverte (biline).

Nous exposerons ici un type particulier de clivage oxydatif de l'hème qui survient en présence de certains réducteurs tels que l'ascorbate. La réaction procède par une oxydation concurrente du réducteur et du pont méthylène de la molécule d'hème par l'oxygène moléculaire. Celle-ci, habituellement et bien que à tort, est assimilée à une oxydation couplée de l'hème (c'est en fait une co-oxydation de l'hème et du réducteur), et elle est, ^{de} loin, la plus étudiée des méthodes de coupure chimique de l'hème. L'importance

particulière de ce type d'oxydation couplée provient du fait qu'elle a été longtemps considérée comme un modèle vraisemblable pour la formation des tétrapyrroles à chaîne ouverte naturels par un processus biologique analogue.

La probabilité de la filiation des bilirubines naturelles après clivage oxydatif des porphyrines ou des précurseurs de l'hème a pu être déduite des relations structurales révélées dans les années 1930 par l'Ecole de LEMBERG (FISCHER et ORTH) (1937) (1940) (55)

La découverte simultanée de l'oxydation couplée du protohème a démontré la possibilité d'une telle voie d'un point de vue chimique (WARBURG et NEGELEIN) (1930) (56) ; (LEMBERG) (1935) (57) et elle a suggéré que c'est le protohème plutôt que la proto-porphyrine-IX le précurseur immédiat le plus vraisemblable puisque les porphyrines, à la différence des hèmes, ne subissent pas facilement le clivage après oxydation couplée. Des études ultérieures par traceurs isotopiques ont confirmé la filiation des bilines animales à partir du protohème (GRAY) (1950) (58).

Les tétrapyrroles en chaîne ouverte sont souvent désignés collectivement sous le nom de pigments biliaires, terme dérivant du fait que les premiers de ces composés à être caractérisés le furent à partir des pigments de la bile des animaux : la biliverdine verte et son produit de réduction jaune, la bilirubine (Schéma 2, page 20). Les termes en relation mais plus adaptés de biline ou de bilinoïdes sont préférés en tant que termes généraux des tétrapyrroles en chaîne ouverte, puisque quelques uns de ces

composés sont incolores, et puisque des tétrapyrroles en chaîne ouverte ont été isolés à partir d'une grande variété de sources naturelles sans aucune relation avec la bile.

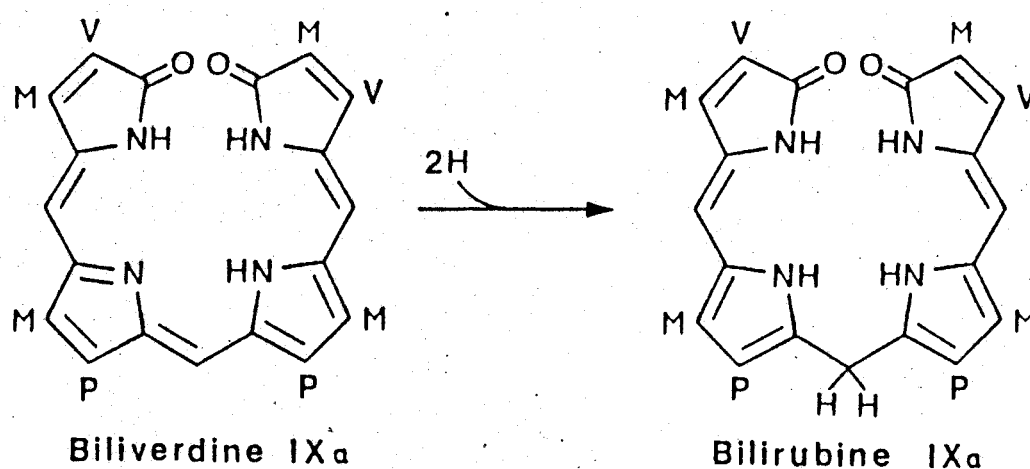
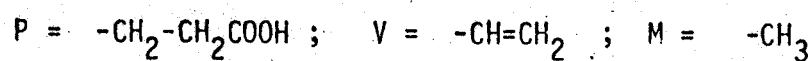


Schéma 2 : Les bilines naturelles les plus répandues



La disposition asymétrique des chaînes latérales dans le protohème-IX, isomère naturel, implique que les quatre ponts méthyne (α, β, γ , et δ) ne sont pas équivalents (Schéma 3, page 22).

Quatre isomères différents des biliverdines peuvent de ce fait apparaître par coupure du protohème-IX à ces différentes positions des ponts méthyne. Les quatre isomères possibles sont désignés par les suffixes IX α , IX β , IX γ et IX δ qui indiquent l'hème d'origine et les ponts éliminés (Schéma 3, page 22). Le même système de suffixes est utilisé pour désigner la nature isomérique des bilines dérivées, d'une manière formelle ou réelle, de ces isomères de biliverdines par des processus qui n'impliquent aucune modification dans l'ordre des chaînes latérales (par exemple, la bilirubine IX α , la deutérobiliverdine IX α etc.). La grande majorité des bilirubines biliaires correspond à l'isomère IX α , et la plupart des autres bilines naturelles, comprenant les bilines des algues par exemple, sont également du type IX α .

Il est, par conséquent évident, que la formation de la plupart des bilines naturelles implique la coupure du protohème exclusivement ou presque exclusivement, à la position α du pont méthyne. Cette spécificité a été invoquée au premier chef dans l'explication du mécanisme et des causes du métabolisme de l'hème chez les mammifères. C'est un phénomène qui doit être pris en considération dans toute proposition d'un mécanisme de coupure de l'hème. En fait, de nombreux auteurs ont tenu la spécificité α pour le phénomène clé dont l'explication satisfaisante résoudrait automatiquement la question plus large du mécanisme de la coupure.

D'une manière générale, deux théories opposées concernant les facteurs provoquant la coupure biologique de l'hème et l'origine de la spécificité α ont été invoqués régulièrement pendant des années. Le premier type de théorie fut émis par LEMBERG (1949) (59) qui proposa que le mécanisme de clivage "in vivo" est un

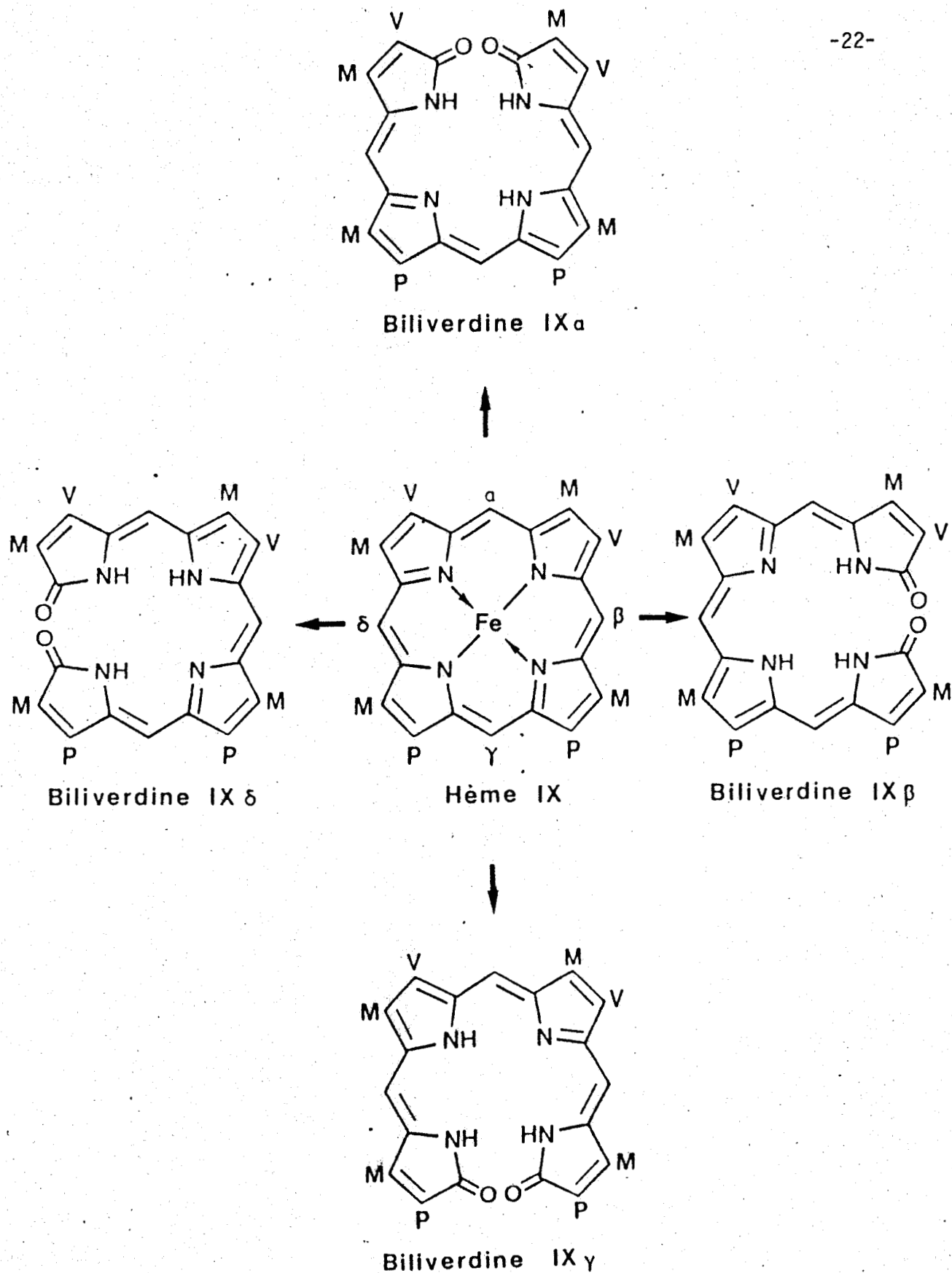


Schéma 3 : Filiation des quatre isomères de la biliverdine par coupure du protohème IX aux quatre positions du pont méthyle.

processus purement chimique très semblable à l'oxydation couplée de l'hème réalisée "in vitro" ; sur cette base, la spécificité α fut, à l'origine, attribuée à une labilité intrinsèque du pont méthyne α de la molécule d'hème le rendant plus sensible que les autres ponts au clivage oxydatif. L'autre type de théorie, invoqué plus principalement par WISE et DRABKIN (1965) (60), NAKAJIMA et GRAY (1967) (61) et TENHUNEN et al. (1972) (62) invoque un processus métabolique catalysé par un enzyme, l'hème α méthényle oxygénase, dans lequel la spécificité α est imposée par le ou les enzymes dont le rôle fonctionnel est la coupure de l'hème.

Un troisième point de vue, qui peut être considéré comme intermédiaire entre les deux précédents, a été avancé par O'CARRA et COLLERAN (1969) (63) qui suggèrent que le clivage biologique de l'hème peut être le résultat d'évènements chimiques, très analogues à l'oxydation couplée "in vitro" conduisant à la coupure accidentelle ou subsidiaire du groupe héminique à l'intérieur du site de liaison à l'hème de certaines hémoprotéines activant l'oxygène. Selon ce point de vue, ce serait la position de l'hème dans le site de liaison de ces hémoprotéines qui imposerait la spécificité α , bien que la fonction exacte des hémoprotéines soit certainement sans aucune relation avec le clivage de l'hème. C'est ainsi que BROWN et THOMAS (1978) (64) ont montré par des études cinétiques, la formation d'un complexe intermédiaire entre l'oxygène et le fer héminique, puisque la réaction de clivage de l'hème en fonction de la quantité d'oxygène consommée suit la loi de Michaelis-Menten.

DEUXIEME PARTIE

CONTRIBUTION PERSONNELLE

CHAPITRE II

CHANGEMENT DE POINT ISO-ELECTRIQUE DE
L'HEMOPEXINE HUMAINE LORS DE SA LIAISON
A L'HEME

Les conditions dans lesquelles l'hémopexine fixe l'hème n'ont pas encore été décrites dans la littérature, non plus que les conditions d'incubation "in vitro" pour que cette liaison soit optimale.

Lorsque l'hémopexine a fixé l'hème, elle forme avec son ligand un complexe qui, jusqu'ici, n'a pu être dissocié.

La haute affinité de l'hémopexine pour l'hème implique que toute préparation d'hémopexine contient à la fois de l'apo-hémopexine et de l'hème-hémopexine. Ce phénomène a été ignoré jusqu'ici, et les auteurs préparaient soit un mélange des deux formes avec un bon rendement, soit l'une des deux formes seulement, avec un rendement qui, de ce fait, était faible.

De même, les études physico-chimiques qui ont pu être réalisées traitaient, la plupart du temps, d'un mélange des deux formes. En effet, si les changements conformationnels induits par la captation du ligand ont entraîné de nombreux travaux reposant sur les techniques physico-chimiques, aucun de ces travaux n'implique l'étude exclusive de l'hème-hémopexine : les études ont été réalisées sur un mélange de l'apo-hémopexine et de l'hème-hémopexine.

Nous avons donc été amené, dans un premier temps, à montrer que l'hémopexine, lors de la capture de l'hème change de point isoélectrique.

Les arguments que nous présentons constituent une preuve expérimentale quant à l'existence dans le sérum de trois

formes d'hémopexine, c'est-à-dire : l'apo-hémopexine, l'hème-hémopexine, les polymères d'hémopexine.

Nous démontrerons que lorsqu'on ajoute de l'hème on peut faire disparaître ces polymères d'hémopexine en laissant subsister l'apo-hémopexine et en provoquant la formation importante de l'hème-hémopexine.

CHANGE OF HUMAN HEMOPEXIN ISOELECTRIC POINT UPON HEME BINDING

Y. PLANCKE, M. DAUTREVAUX and G. BISERTE

Equipe de Recherche Associée au CNRS No. 32, Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

Received 14 March 1977

1. Introduction

Hemopexin is the serum β -glycoprotein with a high affinity for heme [1] and its biological and physico-chemical properties have been reviewed by Muller-Eberhard and Liem [2]. The detailed characterization of the protein is hampered by the complexity and low yields of the isolation procedures, specially for human hemopexin [3–5].

In an attempt to explain differences in purification procedures of human hemopexin, we present here experimental evidence for a change in its isoelectric point upon heme-binding. It provides information on the change in the conformation of hemopexin induced by its interaction with heme and thus may contribute for understanding the means by which hemopexin fulfills its physiological function in heme transport.

2. Experimental

2.1. Isolation of a crude hemopexin fraction

The human serum fractionation technique by rivanol and ammonium sulfate was that of Hayem-Levy and Havez [3], with slight modifications. Ammonium sulfate concentrations were lower. Transferrin elimination was checked by radial immuno-diffusion using partigen Behring.

All operations were carried out at 4°C. The serum came from a pool saved after clinical analysis and was dialysed against NaCl 1.17%. One liter was diluted with one liter of 0.8% NaCl. Successive precipitates

obtained under the following conditions were discarded after 90 min centrifugation at 3000 X g:

(i) One liter of 2.50% rivanol solution in 0.05 M, pH 8.0, phosphate buffer was added dropwise, under stirring, overnight.

(ii) NaCl to a 5% final concentration, citric acid to adjust pH at 7.0 and ammonium sulfate, to a 0.96 M final concentration, were added.

(iii) Citric acid lowered pH to 3.8.

(iv) Ammonium sulfate was added to 1.31 M final concentration.

Finally a 2.91 M ammonium sulfate precipitate was dialysed against 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, in a Biorad '50' biofiber beaker. Protein concentration was adjusted between 10 mg/ml and 20 mg/ml. The resulting fraction was named Fraction A.

2.2. Displacement chromatography

Tris-HCl buffer 10 mM, pH 7.0, was used for equilibration and for elution of the column (3.5 X 10 cm) of DEAE-Sephadex A-50 at 4°C. Experimental conditions are given in the legend to fig. 1. Elution was followed by absorbance measurements at 280 nm and 414 nm, by the rocket technique of Svendsen and Carsten [6] and by radial immuno-diffusion with partigen Behring for hemopexin. Immuno-electrophoresis was performed using whole human serum protein antiserum, specific anti-human haptoglobin antiserum and specific anti-human hemopexin antiserum (fig. 2). Haptoglobin concentration was determined by the Hyland method used in clinical analysis. Crossed immuno-electrophoresis was then realised according to Laurell [7]. After analysis, hemopexin containing fractions of displacement chromatography were pooled and named Fraction B.

Abbreviation: Heme, Ferriprotoporpyrin IX

A rabbit antiserum raised against this Fraction B was prepared and used in Laurell technique with a fresh normal, non-hemolysed human serum as antigen. Absence of hemolysis was ascertained by potassium measurement with flame spectrophotometry.

3. Results

After precipitation steps, Fraction A consisted of 10% hemopexin with a yield of 33%.

Figure 1 shows the elution profile of displacement chromatography. Pooled fractions or Fraction B consisted of less retained proteins, whose interactions with the exchanger were weak. The exchanger was not over-saturated since the composition of the plateau was constant. As shown in fig.2 the only contaminant found was haptoglobin, its level was 5% of the whole proteins. The final recovery was 16% of serum hemopexin. Purification was not carried out any further for haptoglobin elimination by a gel-filtration step as described by Hayem-Levy and Havez [3], but haptoglobin was kept as an internal marker for electrophoretic study. Its position in crossed immuno-electrophoresis was ascertained using specific anti-haptoglobin antiserum as control for each of the following plates. It migrated in the medium of the plates, and could be distinguished from hemopexin by a weaker precipitation line.

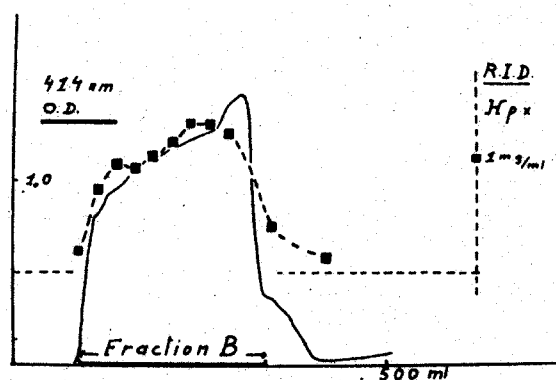


Fig. 1. Displacement chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of Fraction A. Buffer: Tris-HCl, 50 mM, pH 7.0. Fraction A obtained from 2 liters of serum at a protein concentration of 10–20 mg/ml (i.e., about 300 ml) was deposited. Flow rate: 36 ml/h. Column: 3.5 × 10 cm. Fraction volume: 7.5 ml. (—) Optical density at 414 nm. (---■---) Hemopexin determination by radial immuno-diffusion. Pooled fractions were named Fraction B.

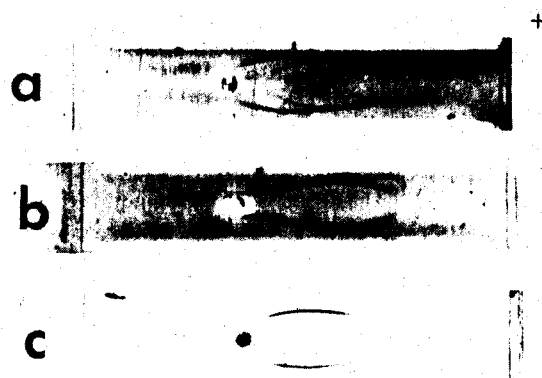


Fig. 2. Immunoelectrophoresis of Fraction B. (a) Anti-whole human serum protein antiserum. (b) Specific anti-human haptoglobin antiserum. (c) Specific anti-human hemopexin antiserum.

Figure 3 shows Laurell plates of Fraction B as antigen against anti-whole human serum protein antiserum (fig.3A). The major protein fraction split into two peaks, the one noted 1, faster, and the other one noted 2, slower than haptoglobin after the first dimension electrophoresis.

In order to study this splitting after electrophoretic migration, normal non-hemolysed human serum was used as antigen in the first dimension, with antiserum

Fig.3A

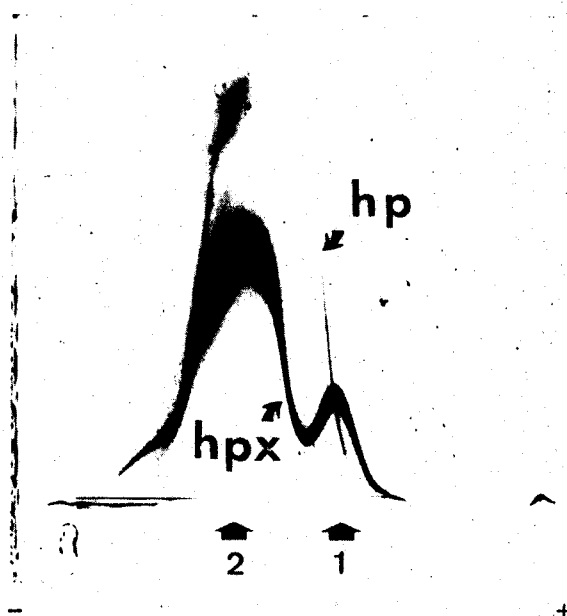


Fig.3B

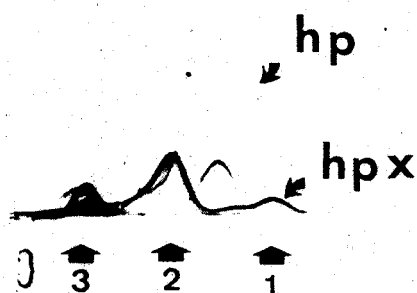


Fig.3C

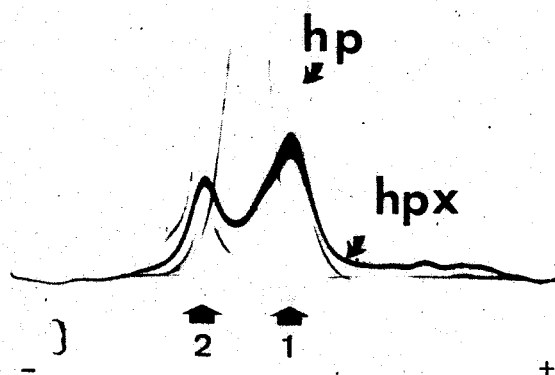


Fig.3. Laurell plates of Fraction B. (Hp) Haptoglobin. (Hpx) Hemopexin. (3A) Antigen: Fraction B. Antiserum: anti-whole human serum protein. (3B) Antigen: Normal, fresh, non-hemolyzed human serum. Antiserum: Antiserum raised against fraction B. (3C) Antigen: Normal, fresh, non-hemolyzed human serum. Heme in equimolecular amount to Hpx was added in the well. Antiserum: Antiserum raised against Fraction B.

raised against Fraction B in the second dimension. Figure 3B shows a major peak noted 2, slower than haptoglobin. Moreover, there is a less important bow still slower and noted 3 on fig.3B, this bow seems to enclose several precipitation lines, one of them is the same for both peak 2 and peak 1. It may be polymers whose high molecular weight hindered migration through gelose.

Finally, in fig.3C, heme was dissolved in the electrophoresis buffer and added in equimolecular amounts with hemopexin to the same serum in the well. It caused firstly, the appraisal of peak 1 of fig.3A, secondly, it abolished peak 3 of fig.3B. In order to keep heme-saturated and heme-depleted hemopexin in the same plate, optimal incubation was not achieved, the only equimolecular heme addition just before migration suffice to show the two forms together.

Thus peak 1 seems to be heme-hemopexin, peak 2 apo-hemopexin and peak 3 polymers.

4. Discussion

These results may provide a means for improving preparation procedure, moreover, they confirm available physico-chemical data.

The isolation method reported by Hayem-Levy and Havez [3] involves the use of precipitation of human serum with rivanol and ammonium sulfate, followed by gel-filtration. Heme-hemopexin and apo-hemopexin are then isolated together. Heme is reported a polymerising agent, and therefore may diminish hemopexin monomer recovery after the gel-filtration step.

In the method of Aisen et al. [4], Cohn fraction IV-7 is submitted to ion-exchange chromatography and then to gel-filtration. These authors obtained monomeric apo-hemopexin; heme-hemopexin was lost.

Hrkal et al. [5] added heme in the course of the fractionation procedure, elution of ion-exchange chromatography was followed by $A_{414 \text{ nm}}$ and provided heme-hemopexin and its aggregated form.

Suttner et al. [8] employed affinity chromatography for human hemopexin, although hemopexin was eluted in three peaks no differences in the purity of the three fractions were found on acrylamide gel electrophoresis, and immunoelectrophoresis.

In each procedure hitherto reported in literature either apo-hemopexin, heme-hemopexin or polymerised

hemopexin was lost and contribute to diminish yield. Data presented here furnish experimental evidence for preexisting of these three states of the molecule in native serum.

Heme is known to facilitate hemopexin aggregation [3]. The present experiments provide evidence that in the presence of a sufficient amount of heme, such aggregates will disappear, if hemopexin has kept its binding properties.

The chief difficulty is to know what exact proportion of heme may be bound by hemopexin in serum after bleeding. Dissociation of the complex was never achieved in the literature. In Hrkál et al. work [1], the affinity constant value for the binding of heme to the single binding center of hemopexin molecule was estimated as $1.9 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$. It would be of interest to obtain heme-hemopexin on a preparative scale. Although affinity is high, all hemopexin failed to convert into heme-hemopexin in our study. Perhaps it would be necessary to find adequate incubation conditions for such a binding, and to dispose of a non-denaturing technique for preparing human hemopexin as did Bernard et al. for rat hemopexin [9].

This serum β -glycoprotein binds circulating heme and transports it to the liver parenchymal cells [10]. The interaction of heme with hemopexin produces changes in the tertiary structure of the protein [11] which possibly lead to recognition of the heme-hemopexin complex by hepatocytes.

Data reported here may give arguments for two different interactions of hemopexin with heme. The site of interaction of polymers is not necessarily the same as in hemopexin-heme. This could explain why heme seems to be relatively accessible in Morgan et al. work on rabbit hemopexin.

For polymer formation, heme remains on the outside of the molecule, equally accessible to each protein molecule of the complex. This may correspond to the sterically unhindered heme-binding site found by Morgan et al. [12]. For these authors, a relatively open heme-binding site perhaps helps either the recognition of the heme-hemopexin complex by hepatocytes or the degradation of heme once the heme-hemopexin complex has entered the cell.

Polymerization mechanism remains to be explained. It is different from a single aggregation after denaturation, since it is encountered in native serum. It would be a competition mechanism of several hemopexin molecules for one molecule of its ligand. This first site could be responsible for myoglobin and cytochrome *c* binding as shown by Biserte et al. [13].

The second site on the inside of the molecule may correspond to a strong binding, responsible for transfer of heme from ferri-myoglobin and ferri-hemoglobin isolated chains to hemopexin [1].

The intimate mechanism of such a strong binding is not clearly understood yet. It may be important, however, for heme-hemopexin complex not to be contaminated either by apo-hemopexin or by polymers for interpreting physico-chemical data. The relative importance of the three states of hemopexin may provide a tool for metabolic studies and is easy to determine with Laurell technique as reported here.

References

- [1] Hrkál, Z., Vodrazka, Z. and Kalouzek, I. (1974) *Eur. J. Biochem.* 43, 73–78.
- [2] Müller-Eberhard, U. and Liem, H. H. (1974) in: *Structure and Function of Plasma Proteins* (Allison, A. C. ed) Vol. 1, pp. 35–53, Plenum Press, London.
- [3] Hayem-Levy, A. and Havez, R. (1973) *Clin. Chim. Acta* 47, 113–122.
- [4] Aisen, P., Leibmann, A. and Harris, D. C. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 6824–6827.
- [5] Hrkál, Z., Vodrazka, Z. and Rejnkova, J. (1972) *J. Chromatog.* 72, 198–201.
- [6] Svendsen, P. J. and Carsten, R. (1970) *Sci. Tools* 13–17.
- [7] Laurell, C. B. (1965) *Anal. Biochem.* 10, 358–361.
- [8] Suttner, J., Hrkál, Z. and Vodrazka, Z. (1977) *J. Chromatog.* 131, 453–457.
- [9] Bernard, N., Lombard, C. and Jayle, M. F. (1976) *Biochimie* 58, 1429–1431.
- [10] Müller-Eberhard, U., Bosmon, C. and Liem, H. H. (1970) *J. Lab. Clin. Med.* 76, 426–431.
- [11] Morgan, W. T. and Müller-Eberhard, U. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7181–7187.
- [12] Morgan, W. T., Sutor, R. P. and Müller-Eberhard, U. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 434, 311–323.
- [13] Biserte, G., Havez, R. and Laturaze, J. (1960) *C. R. Soc. Biol.* 64, 2061.

RAPPEL DES RESULTATS

Dans ce chapitre, une fraction enrichie en hémopexine, appelée Fraction A, a été obtenue à partir du protocole de relargage de HAYEM-LEVY et HAVEZ (1973) (65) puis soumise à une chromatographie de déplacement conduisant à la Fraction B. Analysée par immunoélectrophorèse contre un antisérum de lapin anti-protéines sériques humaines totales, la fraction B ne révèle la présence que de deux antigènes identifiés à l'haptoglobine et à l'hémopexine par utilisation d'antisérums spécifiques (Figure 2, page 28).

En immunoélectrophorèse bidimensionnelle selon la méthode de LAURELL, avec utilisation d'un antisérum anti-protéines totales, la fraction B révèle la présence d'un pic d'haptoglobine, superposé à deux pics, dont un pic 2 majeur de migration plus lente (Figure 3A, page 28) correspondant à l'hémopexine ; ces résultats sont confirmés par l'utilisation d'antisérums spécifiques.

Pour étudier ce dédoublement électrophorétique de l'hémopexine de la Fraction B, un sérum humain normal non hémolysé a été employé comme antigène dans la première dimension, avec un antisérum produit chez le lapin contre la fraction B (*) dans la seconde dimension.

(*) Préparation de l'antisérum de lapin anti-fraction B:

La fraction B, dialysée, lyophilisée a été dissoute à raison de 30 mg dans 3 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2.

Pour obtenir l'immunisation, cet antigène est émulsionné avec l'adjuvant de Freund (1 ml d'antigène pour 1,5 ml d'adjuvant). L'immunisation se fait par inoculation de 0,1 à 0,2 ml de l'émulsion sur le dos rasé du lapin. Celui-ci est ainsi inoculé une fois par semaine, quatre semaines de suite. Après un mois de repos, un rappel par voie veineuse avec l'antigène seul (2 ml) est effectué.

L'animal est alors saigné les 5ème et 7ème jours suivants.

Le diagramme obtenu (Figure 3B, page 29) est qualitativement identique à celui de la Figure 3A, page 28 , dont il ne diffère que par la hauteur des pics ; cependant, on note sur la ligne de précipitation de l'hémopexine l'apparition d'un nouveau pic (noté 3), plus lent et semblant inclure plusieurs lignes de précipitation. Il pourrait s'agir de polymères dont la migration dans la gélose est freinée du fait de leur haut poids moléculaire.

Enfin, le sérum additionné d'hème en quantité équimoléculaire par rapport à son contenu en hémopexine a été étudié selon la même technique avec l'antisérum dirigé contre la fraction B (Figure 3C, page 29) : on constate que par rapport au diagramme de la figure 3B, page 29 , le pic 3 a disparu et inversement le pic 1 a considérablement augmenté.

Afin de montrer la présence simultanée de l'hème-hémopexine et de l'apohémopexine sur la même plaque, aucune incubation n'a été réalisée avant l'électrophorèse. Ceci nous permet d'identifier le pic 1, le plus acide, à l'hème-hémopexine, le pic 2 à l'apohémopexine et le pic 3 pourrait correspondre à des polymères.

DISCUSSION

Les résultats obtenus sont intéressants à considérer sous deux aspects.

1) Sur le plan de la préparation de l'hémopexine et de ses différentes formes, on peut espérer pouvoir préparer par gel-filtration de la fraction B obtenue à partir d'un sérum non hémolysé, soit l'apohémopexine correspondant au pic 1 et les polymères du pic 3, soit après

saturation par l'hème, le complexe hème-hémopexine.

Ces résultats constituent un moyen pour améliorer la préparation de l'hémopexine, de plus, ils confirment les données physico-chimiques actuellement disponibles.

La méthode d'isolement de HAYEM-LEVY et HAVEZ (1973) (66) implique l'emploi d'étapes de précipitation du sérum humain avec le rivanol et le sulfate d'ammonium, suivi par un tamisage moléculaire. L'hème-hémopexine et l'apohémopexine sont ainsi obtenues ensemble. L'hème est signalé comme un facteur de polymérisation et c'est ainsi qu'il peut diminuer le rendement en hémopexine monomère après l'étape finale de tamisage moléculaire.

Dans la méthode de AISEN et al. (1974) (67), la fraction IV-7 de COHN est soumise à la chromatographie d'échange d'ion et ensuite à une gel-filtration. Les auteurs obtiennent l'apo-hémopexine monomère, ils perdent l'hème-hémopexine.

HRKAL et al. (1972) (68) additionnent de l'hème au cours du protocole de fractionnement. L'élution d'une chromatographie d'échange d'ion est suivie par l'absorbance à 414 nm et procure l'hème-hémopexine ainsi que sa forme agrégée.

SUTTNAR et al. (1977) (69) ont employé la chromatographie d'affinité. Bien que l'hémopexine s'élue en trois pics, aucune différence dans la pureté des trois fractions n'a été trouvée tant en électrophorèse en gel d'acrylamide qu'en immunoélectrophorèse.

Dans chaque procédé publié jusqu'alors, soit l'apo-hémopexine, l'hémehémopexine ou l'hémopexine polymérisée était perdue,

ce qui contribuait à abaisser le rendement.

Les faits présentés ici fournissent une preuve expérimentale quant à la préexistence de ces trois états de la molécule dans le sérum natif.

2) Sur le plan de l'étude de la liaison de l'hème à l'hémopexine, ils mettent en évidence la transformation par l'hème des polymères en hème-hémopexine.

Le problème de la polymérisation de l'hémopexine n'est certes pas encore éclairci, mais l'hème semble participer à cette polymérisation (HAYEM-LEVY et HAVEZ) (1973) (70). Selon MORGAN et al. (1976b) (71), il existerait sur l'hémopexine de lapin un site d'interaction superficiel avec l'hème : l'hème ainsi fixé pourrait être encore accessible à une deuxième molécule d'apohémopexine.

Il est d'autre part curieux de constater que par addition d'hème, la production du complexe hème-hémopexine semble s'effectuer uniquement aux dépens des polymères. La comparaison des Figures 3B et 3C, page 29 montre en effet que le pic 2 d'apohémopexine change peu d'aspect après addition d'hème, comme si celui-ci ne montrait que peu d'affinité pour cette forme par rapport à celle qu'il manifeste pour la forme polymère ; ceci semble en contradiction avec la forte constante d'affinité ($1,9.10^{-14} \text{ M}^{-1}$) mesurée par HRKAL et al. (1974) (72). On peut envisager soit que l'hème doive se trouver sous forme de ferro-hème pour pouvoir pénétrer directement

dans le site à forte affinité de l'apohémopexine, soit que le polymère lui-même catalyse la fixation de l'hème dans le site à forte affinité de ses sous-unités par une réaction plus rapide que le mécanisme de la polymérisation elle-même.

HAYEM-LEVY et HAVEZ (1973) (73) ont montré que l'hème facilite l'agrégation de l'hémopexine. Nos expériences fournissent la preuve qu'en présence d'une quantité suffisante d'hème de tels agrégats disparaissent si l'hémopexine a conservé ses propriétés de liaison.

Les faits que nous rapportons ici peuvent constituer des arguments pour deux interactions différentes de l'hémopexine avec l'hème. Le site d'interaction des polymères n'est pas nécessairement le même que dans l'hémopexine-hème. Ceci expliquerait pourquoi dans un travail de MORGAN et al. (1976b) (74) sur l'hémopexine de lapin, l'hème semblait relativement accessible. Pour ces auteurs, un site de liaison à l'hème relativement ouvert, favorise peut-être la reconnaissance du complexe hème-hémopexine par l'hépatocyte, ou bien favorise la dégradation de l'hème dès lors que le complexe hème-hémopexine a pénétré dans la cellule.

Le mécanisme de la polymérisation reste à expliquer ; il diffère d'une simple agrégation après dénaturation puisqu'on le rencontre dans le sérum natif. Il pourrait être un mécanisme de compétition de plusieurs molécules d'hémopexine pour une molécule de son ligand. Ce premier site serait responsable de la liaison à la

myoglobine et au cytochrome c comme l'ont montré BISERTE et al.
(1960a)(75).

Le second site, à l'intérieur de la molécule, peut correspondre à une forte liaison, responsable du transfert de l'hème de la ferri-myoglobine et des chaînes isolées de la ferri-myoglobine à l'hémopexine.

Le mécanisme détaillé d'une aussi forte liaison n'est pas encore clairement expliqué. Il est important, cependant, pour le complexe hème-hémopexine de ne pas être contaminé soit par l'apo-hémopexine, soit par les polymères pour l'interprétation des données physico-chimiques. L'importance relative de ces trois états de l'hémopexine peut constituer un moyen d'études métaboliques et elle est aisée à déterminer par la technique de LAURELL, telle que nous venons de l'exposer.

La principale difficulté est de connaître l'exacte proportion d'hème susceptible d'être liée par l'hémopexine dans le sérum lors du prélèvement du sang. La dissociation du complexe n'a jamais été réalisée dans la littérature. Dans le travail de HRKAL et al. (1974)(76) la constante d'affinité de l'hémopexine pour l'hème a été estimée à $1,9 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$.

Il nous apparaissait dès lors important d'obtenir l'hème-hémopexine à une échelle préparative.

Bien que l'affinité soit élevée, toute l'hémopexine ne se convertit pas en hème-hémopexine dans notre étude. Il semblait donc nécessaire de trouver les conditions adéquates d'incubation pour une telle liaison, et de disposer d'une technique de préparation

de l'hémopexine humaine non dénaturante comme celle de BERNARD,
LOMBARD et JAYLE (1976) (77) pour l'hémopexine de rat.

CHAPITRE III

PREUVE DIRECTE DU CHANGEMENT DU POINT
ISOELECTRIQUE DE L'HEMOPEXINE HUMAINE
LORS DE SA LIAISON A L'HEME

UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT DES
PROTEINES DU SERUM

La technique de préparation de l'hémopexine reportée dans le chapitre II repose sur des étapes de relargage. Ces étapes sont longues et le rendement final est faible.

C'est pourquoi nous avons été amené à décrire un protocole plus simple et non dénaturant, qui conduise à l'hème-hémopexine avec un rendement plus élevé. La méthode utilise trois étapes successives de fractionnement :

- Une chromatographie de déplacement sur DEAE-Sephadex A50 en présence de ferri-hème qui élimine la sérumalbumine et conduit à une fraction enrichie en hème-hémopexine.

- Une gel-filtration qui élimine les immunoglobulines et qui conduit à une fraction constituée de transferrine et d'hème-hémopexine.

- Enfin une chromatographie d'élution sur DEAE-Sephadex A50 qui permet l'isolement de l'hème-hémopexine et éventuellement de l'apohémopexine.

Description de la méthode

Avant chaque chromatographie, l'échantillon de protéine a été centrifugé à 3000 g pendant 30 minutes à 0°C, et le précipité formé, s'il y en avait un, a été éliminé. L'ultrafiltration avec le système "Amicon CEC1" et les membranes "PM 10" a été utilisée pour dialyser et pour concentrer quand cela était nécessaire. Des déterminations quantitatives d'hémopexine ont été réalisées par immunodiffusion radiale en utilisant les "M-partigen Behring".

L'électrophorèse et l'immunoélectrophorèse ont été mises en oeuvre pour établir le diagramme d'élution de l'hémopexine au cours des trois étapes du protocole de purification.

La chromatographie de déplacement

Le DEAE-Sephadex A50 a été équilibré dans le tampon Tris/HCl pH 7,0 ; 200 mM. Nous avons évité une trop grande hauteur du lit de l'échangeur du fait de l'augmentation de viscosité due au sérum. Nous avons aussi évité, pour cette raison, d'éluer la colonne avec un débit constant. Nous avons préféré l'emploi d'une pression hydrostatique constante. Des fractions de volume constant ont été recueillies : environ 1/50 du volume d'échangeur utilisé au moyen d'un compteur de gouttes (Collecteur "Gilson" du type "MTDC").

L'expérience est arrêtée quand la colonne ne provoque plus aucune différence dans la distribution électrophorétique des protéines entre le sérum qui entre dans la colonne et le sérum qui sort de la colonne.

Lorsque nous sommes partis d'un mélange de sérums récupérés après analyse clinique, disponibles en quantités relativement importantes, une colonne Kontes de 4 cm x 50 cm a été employée avec le DEAE-Sephadex A50. Les fractions avec un taux d'hémopexine plus élevé que celui du sérum ont été rassemblées et soumises à l'étape suivante de chromatographie de tamisage moléculaire.

Lorsque nous sommes partis d'un mélange de plasmas héparinés récupérés après détermination de leur ionogramme, disponibles en petites quantités et non hémolysés, une colonne Kontes de 2 cm x 25 cm avec un réservoir de 250 ml a été employée, avec

1e DEAE-Sephadex A50-hème.

Pour obtenir le DEAE-Sephadex A50-hème, le tampon contenant l'échangeur gonflé est ajusté à une concentration 1 mM avec de l'hème ("hemin chloride" - Sigma) dissous auparavant dans une quantité minimale de pyridine (quelques ml). L'échangeur dans le tampon avec l'hème a été versé dans la colonne par l'intermédiaire du réservoir supérieur. L'hème en excès, non adsorbé sur l'échangeur, a été élué avec un tampon Tris/HCl 1 M, pH 7,0, jusqu'à ce que l'éluat soit incolore. La colonne est ensuite soumise à un flux d'eau distillée circulant du bas vers le haut de manière à détasser l'échangeur et à le rassembler dans le réservoir supérieur. Après avoir laissé l'échangeur décanter, l'excès de liquide est éliminé et l'échangeur est équilibré par passage d'un tampon Tris/HCl 200 mM à pH 7,0.

La chromatographie de tamisage moléculaire

L'ultrogel AcA 34 (LKB) a été versé dans trois colonnes de type "Pharmacia" (4 cm x 100 cm) utilisées l'une derrière l'autre en série, à la température de la pièce. Du Biogel P2 (200 ml) (Biorad) a été versé au fond de la première colonne après gonflement dans le tampon Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M, NaCl 0,2 M contenant de l'azide de sodium à 0,2 p. 100 ; à la place du Biogel P2, des billes de verre de 3 mm de diamètre ont parfois été déposées au fond de la première colonne pour assurer un étalement homogène de l'échantillon dans la section transversale du gel d'AcA 34. L'équilibre et l'élution ont été réalisés en ascendant, à un débit

de 60 ml/heure, avec le tampon Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M, NaCl 0,2 M, azide de sodium 0,2 p. 100. A 40 ml de la fraction enrichie en hème-hémopexine ayant un taux d'hémopexine de 130 p. 100 par rapport à celui du sérum, ont été ajoutés 10 ml du tampon Tris/HCl, pH 8,0, 0,5 M, NaCl M ; le tout a été déposé à l'aide d'une pompe péristaltique. Dans le but d'éviter des trainées, 50 ml de ce tampon ont été déposés à la suite de l'échantillon protéique avant de réaliser l'élution.

L'absorption U.V. de l'effluent a été enregistrée. Le pic situé entre les flèches de la Figure 3 page 46, obtenu après détection par immunodiffusion radiale de l'hémopexine, a été soumis à une concentration et à une dialyse contre le tampon Tris/HCl pH 7,0, 50 mM pour obtenir un volume final de 50 ml. Cette fraction a été analysée par immunoélectrophorèse contre un sérum anti-protéines sériques totales afin de s'assurer de l'élimination de la sérum-albumine (Figure 5, partie supérieure page 47).

La chromatographie d'échange d'ion

L'échangeur est le DEAE-Sephadex A50 équilibré dans le tampon Tris/HCl pH 7,0, 50 mM. Il est coulé dans une colonne de 3 cm de diamètre et d'une hauteur de 40 cm. Des fractions d'un volume de 7 ml sont collectées à un débit de 30 ml/heure. La densité optique de l'éluat est lue aux longueurs d'onde de 280, 470 et 405 nm.

L'échantillon est élué d'abord avec le tampon d'équilibre jusqu'à ce qu'aucun matériel protéique ne soit plus élué. Ensuite, un gradient de force ionique croissante en Tris de 50 à 100 mM est appliqué.

Le pic contenant l'hème-hémopexine, détecté par immunodiffusion radiale est soumis à l'immunoélectrophorèse contre un sérum antiprotéines sériques totales (Figure 5, page 47).

Human serum hemopexin : direct evidence for change of its isoelectric point upon heme binding. A new serum protein fractionation.

Y. PLANCKE, M. DAUTREVAUX
and G. BISERTE ◇.

(9-2-1978).

*Laboratoire de Biochimie Structurale,
Faculté de Médecine,
Place de Verdun, 59045 Lille, France.*

Résumé.

Le sérum humain est soumis à une étape unique de chromatographie de déplacement et d'échange de ligand. La chromatographie de déplacement élimine la sérum albumine et une partie des immunoglobulines. L'échange de ligand procure une fraction enrichie en hème-hémopexine. Une préparation originale et non dénaturante de l'hème-hémopexine est proposée.

Summary.

Human serum was submitted to a one step displacement-ligand exchange chromatography. Displacement removed serum albumin and part of γ -globulins. Ligand exchange furnished an enriched heme-hemopexin fraction. An original, non denaturing human heme-hemopexin preparation is proposed.

Introduction.

In serum, heme-hemopexin is a transient molecule whose immediate fate is to be recognized by hepatocyte and to enter this cell [1]. Question arises is whether or not hemopexin recycles or functions as a suicidal protein like haptoglobin [2]. Dissociation of the complex was never achieved in the literature. Most authors deal, as final purification product, with monomeric apo-hemopexin [3, 4, 5, 6], but heme-hemopexin is very important from a physiological point of view, as well as to achieve physico-chemical studies. The chief difficulty encountered in its preparation is that it is often in a polymeric state [3, 5]. We showed, in a previous paper [7], that polymers can be dissociated with a sufficient amount of heme providing hemopexin has kept its binding properties, i.e. is not denatured.

We report here a new first step for serum proteins preparation procedure. Moreover, we show that chromatographic behavior of hemopexin fits its electrophoretic mobility regarding to change of its isoelectric point upon heme binding. Preci-

pitation steps are avoided, and therefore, the serum fractionation technique is original and provides a protein molecule close from its native state. This method involves a till here non described displacement chromatography of human serum or plasma on DEAE-Sephadex A-50. It allows us to discard serum albumin and in the same step it leads us to an enriched heme-hemopexin fraction.

Materials and Methods.

Before each chromatography, protein sample was centrifuged at 3000 g for 30 min at 0°C, and the precipitate, if any, was discarded. Ultrafiltration with Amicon GECI device and PM10 membranes was used to dialyse and/or concentrate when necessary. Quantitative hemopexin determinations were performed by Radial Immunodiffusion using M-Partigen Behring. Standard immuno-electrophoresis and electrophoresis were also performed in order to establish hemopexin elution pattern in the course of the three chromatographic steps of the isolation procedure.

Displacement chromatography. DEAE-Sephadex A-50 was used according to manufacturer's instructions (Pharmacia), at 0°C. Equilibrating buffer was Tris/

◇ To whom all correspondence should be addressed.

HCl pH 7.0, 200 mM. A too high gel bed of exchanger must be avoided because of the increasing viscosity due to serum, if working at constant flow rate. Thus, alternatively to a constant flow rate given by a pump, a constant hydrostatic pressure drop may be applied. Constant fraction volumes (about 1/50 the swollen exchanger bed volume used) are collected with a drop counter (Gilson, MTDC type collector). Experiment was stopped when column caused no more difference in electrophoretic pattern between serum outlet and serum inlet.

When dealing with a pool of sera saved after clinical analysis, available in rather large quantities and hemolyzed, column Kontes 4 cm $\times$ 50 cm was used with DEAE-Sephadex A-50. Fractions with hemopexin level higher than serum hemopexin level were pooled and submitted to next step molecular sieve chromatography.

When dealing with a pool of heparinized plasma saved after ionogram determination, available in little quantities and non hemolyzed, column Kontes 2 cm $\times$ 25 cm with a 250 ml reservoir was used, with DEAE-Sephadex A-50-heme.

For obtaining DEAE-Sephadex A-50-heme, buffer containing swollen exchanger was made 1 mM in heme previously dissolved in a minimal amount of pyridine (a few ml). Exchanger in heme buffer was poured into the column. Unadsorbed excess heme upon exchanger was eluted by a Tris/HCl buffer pH 7.0, 1 M, till eluate was colourless. Exchanger remained green coloured. Column was then flushed upward with distilled water in order to unpack exchanger through the reservoir. After allowing exchanger to settle, excess liquid was discarded and equilibrium was performed with Tris/HCl 200 mM pH 7.0 buffer.

Molecular sieve chromatography. Ultrogel AcA 34 (LKB) was poured into three columns (Pharmacia 4 cm $\times$ 100 cm) used after each other, at room temperature. Biogel P2 (200 ml) (Biorad) was poured at the bottom of the first column after swelling in Tris/HCl pH 8.0, 0.1 M, NaCl 0.2 M, sodium azide 0.2 per cent buffer; alternatively to Biogel P2, glass beads 3 mm in diameter have been layered at the bottom of the first column to ensure an even spreading of the sample over the cross section of the AcA 34 gel. Equilibrium and elution were carried out upward at a flow rate of 60 ml/hr with Tris/HCl pH 8.0, 0.1 M, NaCl 0.2 M, sodium azide 0.2 per cent buffer. To a 40 ml volume of enriched heme-hemopexin fraction with 130 per cent of serum hemopexin concentration were added 10 ml of Tris/HCl pH 8.0, 0.5 M, NaCl M buffer and applied with a peristaltic pump. In order to avoid tailing, 50 ml of this buffer were applied following protein sample. U.V. absorption of the effluent was monitored. Peak between arrows of figure 3, obtained after radial immunodiffusion detection for hemopexin was submitted to concentrating and dialyzing with Tris/HCl pH 7.0, 50 mM buffer to get a final volume of 50 ml. This fraction was checked by immuno-electrophoresis against antiwhole human serum protein antiserum for serum albumin removal (figure 3, upper part).

Ion-exchange chromatography. This step was performed according to Aisen et al. [4] at 4°C. Sample was applied at the flow rate of elution but the Tris gradient was allowed to start only once no protein material was eluted at 50 mM in Tris/HCl pH 7.0 buffer. Hemopexin containing peak, as detected by radial

immunodiffusion was submitted to immunoelectrophoresis against antiwhole human serum protein antiserum.

Results and Discussion.

Non hemolyzed heparinized plasma gave a plateau after displacement chromatography, whereas heme, either in hemolyzed serum or adsorbed onto DEAE-Sephadex A-50, led to an enriched heme-hemopexin fraction (figures 1 and 2). This brings direct evidence for change of human hemopexin

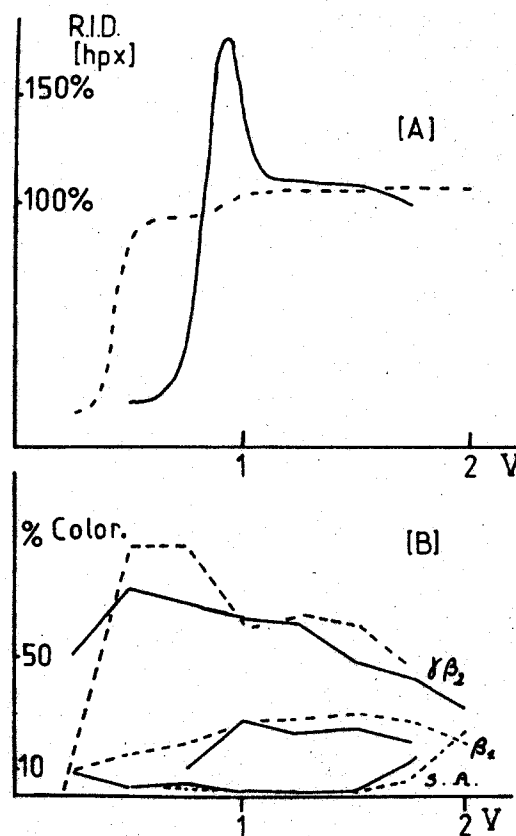


FIG. 1. — Displacement-ligand exchange chromatography of non hemolyzed heparinized plasma. Column 2 cm $\times$ 25 cm. V : exchanger bed volume. Elution volumes are expressed taking V as unit. Flow rate given by a constant hydrostatic pressure drop of 40 cm H₂O. Fraction collector (Gilson) upon drop counter mode. Fractions volume : 2 ml. R.I.D. : Radial Immunodiffusion determinations; hpx : hemopexin. Per cent Color : dye uptake in standard diagnostic electrophoresis. ----- : DEAE-Sephadex A-50. — : DEAE-Sephadex A-50 - heme. In B upper curves : γ and β_2 -globulins ; middle curves : β_1 -globulins ; lower curves : serum albumin, expressed as percentage of whole protein electrophoregram.

Change of hemopexin isoelectric point upon heme binding.

173

isoelectric point upon heme binding. DEAE-Sephadex A-50-heme allows to obtain an enriched versus serum, reactive with heme and thus non denatured heme-hemopexin fraction.

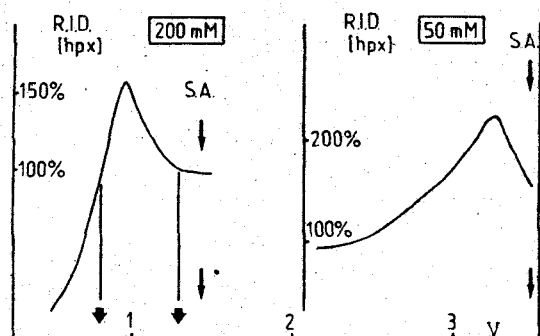


FIG. 2. — Effect of ionic strength upon displacement chromatography. Pooled hemolyzed sera were submitted to dialyze either against NaCl 200 mM or NaCl 50 mM before displacement chromatography. R.I.D. (Hpx) : Radial Immuno Diffusion determination of hemopexin, expressed as percentage of serum level. S.A. : beginning of sharp increase in serum albumin concentration. V : volume of exchanger bed used. Peak between arrows was submitted to next step molecular sieve chromatography. Upon obtaining an enriched heme-hemopexin fraction depleted from serum albumin and with low level of immunoglobulins, capacity of exchanger is greater when ionic strength of applied protein material is lowered. Inorganic ions compete with proteins for exchanger charged groups.

In every cases displacement chromatography gave an albumin depleted hemopexin preparation. Slight amounts of serum albumin were found in some experiments when serum was not freshly harvested.

Although charge density was lower in 50 mM packed exchanger because of electrostatic repulsing forces, capacity for heme-hemopexin was greater than in 200 mM dialyzed serum. Inorganic ions compete with proteins for exchanger charges upon displacement. Thus hemopexin contained in 3 columns volume of serum is retained in 50 mM instead of hemopexin contained in 1.5 column volume of serum in 200 mM before serum albumin appearance.

After eliminating serum albumin, the second class of major serum proteins, immunoglobulins, are completely removed by molecular sieve chromatography. Green colored hemopexin was eluted slightly after pink colored transferrin, on the trailing edge of the peak (figure 3). Since no serum albumin was shown by immunoelectrophoresis against anti-whole human serum protein anti-

serum (figure 5, upper part), this means it was removed by first step displacement chromatography

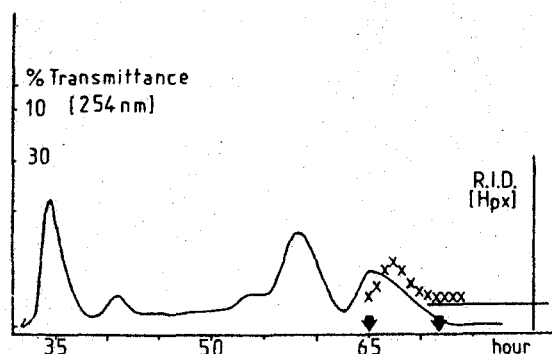


FIG. 3. — Molecular sieve chromatography of enriched heme-hemopexin fraction from displacement chromatography (Peak between arrows of figure 2). Flow rate : 60 ml/hr, 3 columns (4 cm $\times$ 90 cm) in serie, were poured with AcA 34 gel. — : Transmittance at 254 nm. $\times \times \times$: radial immunodiffusion quantitation for hemopexin. Heme-hemopexin, green colored, was eluted slightly after transferrin, pink colored, on the trailing edge of the peak. Peak between arrows was concentrated and analyzed by immunoelectrophoresis against anti-whole human serum proteins antiserum (figure 5, upper part : no serum albumin was found).

Apo-hemopexin, if present in a sufficient amount in starting serum was eluted as described by Aisen *et al.* [4] ; but, as in our case, pooled sera were hemolyzed, heme-hemopexin was the

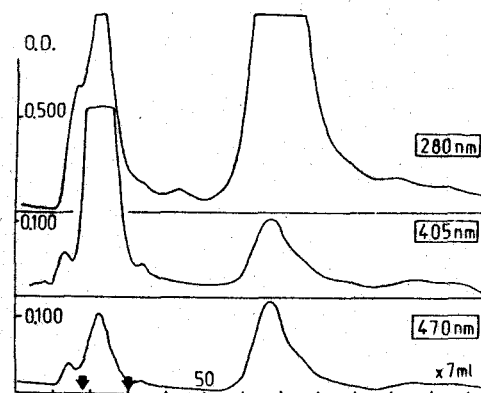


FIG. 4. — DEAE-Sephadex A-50 ion exchange elution chromatography of peak between arrows of figure 3 from molecular sieve chromatography. 7 ml fraction volume were collected at a flow rate of 30 ml/hr. The column was developed firstly with Tris/HCl pH 7.0, 50 mM buffer until no protein material was eluted. The remainder of the experimental conditions was the same as in Aisen *et al.* [4] procedure.

Peak between arrows was submitted to immunoelectrophoresis against anti-whole human protein antiserum (figure 5, lower part).

predominant form. It was therefore eluted prior to the application of the Tris gradient. Heme-hemopexin was eluted well separate from transferrin (figure 4) and it was immunologically pure (figure 5, lower part). In some cases, it contained traces of polymers, probably when all hemopexin was not bound to heme as shown in our previous work [7].

displacement chromatography. Thus, it is easy to obtain 50 per cent yield in the overall isolation procedure.

Hemopexin became more retained upon exchanger either by the intermediary of heme or by conformational changes produced by its interaction with heme. Since heme was not covalently nor

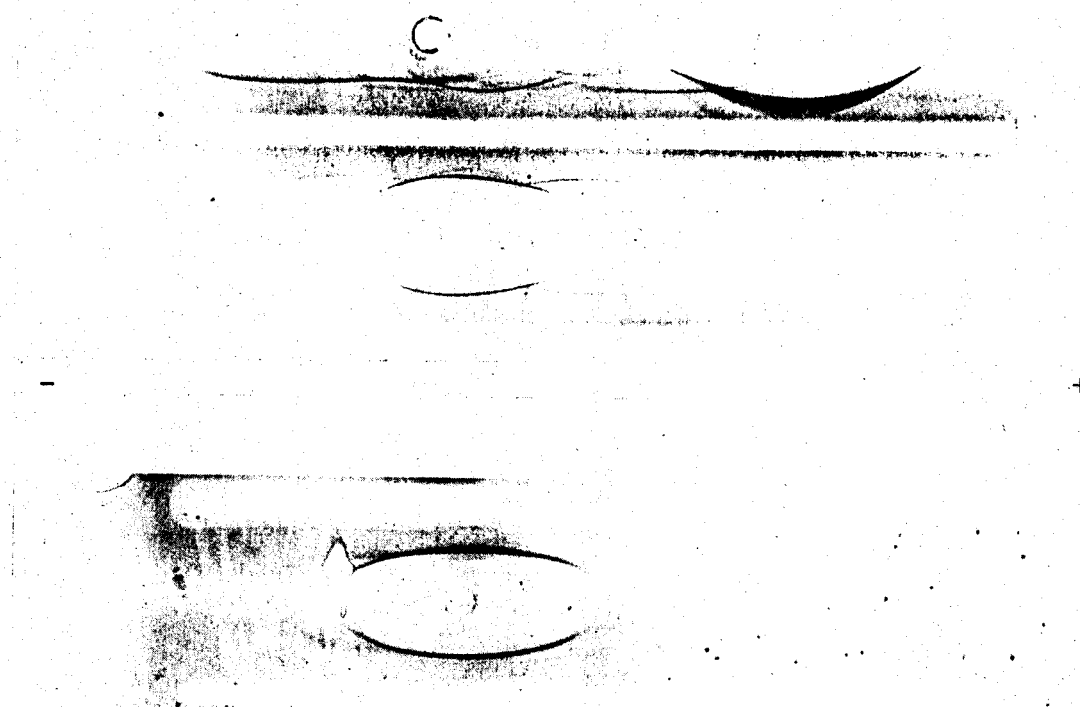


FIG. 5. — Immunoelectrophoresis against antiwhole human serum protein antiserum.

Upper part : peak between arrows from molecular sieve chromatography (figure 3) as antigen ; no serum albumin was found.

Lower part : peak between arrows of ion-exchange chromatography (figure 4) as antigen ; heme-hemopexin is immunologically pure.

Displacement removed serum albumin. Heme-hemopexin obtained after the third step of our isolation procedure was immunologically pure.

Yields were estimated using radial immunodiffusion compared to pooled hemolyzed starting sera as standard in the same plate. When pooling fractions with hemopexin level higher than hemopexin level in serum, yield was 50 per cent after displacement and molecular sieve chromatography. For third step ion exchange chromatography yield was 75 per cent. Yield may be much higher if pooling all hemopexin containing fractions after

electrostatically bound to exchanger, and since hemopexin has a high affinity for heme [8], we must conclude to a change of its pHi. Change of electrostatically charged groups exposure enhanced protein interaction with exchanger. The more a protein is retained, i.e. the more its pHi is low, the more it becomes enriched versus serum. Thus, enrichment of hemopexin versus serum reached 150 per cent of serum level.

Unlike salt fractionation procedures, our fractionation method can be carried out using small columns if little samples are available. In order to show minor proteins we worked at a preparative scale. Displacement chromatography gave higher yields as our preceding method of rivanol and ammonium sulfate fractionation derived from Hayem-Levy and Havez [3] which was reported by Aisen *et al.* [4] as giving high yields and which was recently employed by Hrkál *et al.* [9]. If the same yield in heme-hemopexin is wanted, the method proposed here is more easy to perform as that of Vrethblad and Hjorth [10].

Heme-hemopexin is easy to obtain when binding to heme is achieved in serum at the first step either because of hemolysis or with A-50 - heme displacement-ligand exchange chromatography. As a result of the role of buffer ions in separating hemopexin from serum albumin, one may expect amphoteric ions of given pHi could separate proteins from each other during displacement chromatography, if their pHi is well determined as it is the case for ampholine (LKB).

Acknowledgment.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique : Laboratoire Associé N° 04 0268, Lille, Directeur Professeur G. Biserte, and by UER III Faculté de Médecine de Lille. Y.P. is Attaché de Recherche at the CNRS.

REFERENCES.

1. Morgan, W. T., Sutor, R. P. & Muller-Eberhard, U. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **434**, 311-323.
2. Muller-Eberhard, U. & Liem, H. H. (1974) in « *Structure and Function of Plasma Proteins* » (Allison, A. C. ed) Vol. 1, pp. 35-53, Plenum Press, New York and London.
3. Hayem-Levy, A. & Havez, R. (1973) *Clin. chim. Acta*, **47**, 113-122.
4. Aisen, P., Leibmann, A. & Harris, D. C. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 6824-6827.
5. Bernard, N., Lombard, G. & Jayle, M. F. (1976) *Biochimie*, **58**, 1429-1431.
6. Suttner, J., Hrkál, Z. & Vodrazka, Z. (1977) *J. Chromatog.*, **131**, 453-457.
7. Plancke, Y., Dautrevaux, M. & Biserte, G. (1977) *FEBS Letters*, **78**, 291-294.
8. Hrkál, Z., Vodrazka, Z. & Kalousek, I. (1974) *Europ. J. Biochem.*, **43**, 73-78.
9. Hrkál, Z., Suttner, J. & Vodrazka, Z. (1977) *Stud. Biophys.*, **63**, 55-58.
10. Vrethblad, P. & Hjorth, R. (1977) *Biochem. J.*, **167**, 759-764.

CONCLUSION

RAPPEL DES RESULTATS

Nous avons décrit dans ce chapitre une nouvelle première étape pour les protocoles de préparation des protéines du sérum.

Cette méthode évite les étapes de relargage et permet l'obtention de l'hémopexine sous un état proche de l'état natif : elle consiste essentiellement en une chromatographie de déplacement réalisée sur une colonne de DEAE-Sephadex A50-hème permettant l'élution des protéines sériques dans l'ordre de leur pH décroissant et l'obtention d'une fraction protéique enrichie en β_1 -globulines.

Durant la chromatographie de déplacement sur DEAE-Sephadex, chaque protéine du sérum utilisé joue un rôle de compétiteur des autres protéines vis-à-vis des sites cationiques de l'échangeur : au fur et à mesure du passage du sérum sur la colonne, ces sites seront progressivement saturés par des protéines ayant un caractère plus acide que celles qui y étaient fixées auparavant ; ainsi le groupe des β_1 -globulines n'apparaîtra dans l'éluat qu'après saturation de tous les sites de l'échangeur occupés jusqu'alors par le groupe β_2 : à ce moment on peut caractériser dans l'éluat le mélange des β_2 et des β_1 -globulines à des concentrations correspondant à celle du sérum sanguin ; progressivement, les sites occupés par les β_1 seront occupés par les α et la sérumalbumine : l'apparition de la sérumalbumine dans l'éluat traduira la saturation complète de l'échangeur par cette protéine et les autres protéines acides du sérum.

Du fait de la faible affinité de l'apohémopexine et des β_2 ou β_1 -globulines en général pour le DEAE-Sephadex dans les conditions utilisées, l'élution de ces protéines se fera à la concentration qu'elles ont dans le sérum, sans pic d'élution décelable (Figure 1, page 45).

Dans le cas de la chromatographie du sérum sur DEAE-Sephadex-hème (Figure 1, page 45), ou du sérum hémolysé sur DEAE-Sephadex (Figure 2, page 46), l'hème-hémopexine est plus fortement retenue et sera donc élue sous forme d'un plateau de concentration supérieure à celle du sérum et de hauteur correspondant en fait à sa concentration sur l'échangeur (en fait, les diffusions donnent à ce plateau la forme d'un pic) ; après élution de ce pic, tous les sites de l'échangeur étant occupés par des protéines plus acides, l'hémopexine est élue à sa concentration sérique.

Ces expériences nous apportent donc une preuve directe du changement de point isoélectrique de l'hémopexine humaine lors de la liaison à l'hème. Le DEAE-Sephadex A50-hème nous permet d'autre part d'obtenir une fraction d'hème-hémopexine enrichie par rapport au sérum, réagissant avec l'hème et donc non dénaturée.

Dans tous les cas, la chromatographie de déplacement donne une préparation d'hémopexine dépourvue de sérumbumine.

La Figure 2 page 46, montre l'effet de la force ionique sur la chromatographie de déplacement sur DEAE-Sephadex et confirme que la hauteur du pic d'élution de l'hémopexine est d'autant plus grande qu'elle est plus fortement retenue par l'échangeur :

cette augmentation de hauteur du pic va en effet de pair avec l'augmentation du volume de rétention de cette protéine, traduisant ainsi une augmentation de la quantité d'hémopexine fixée à faible force ionique.

Bien que la densité des charges soit plus faible dans l'échangeur tassé en NaCl 50 mM, du fait de son gonflement plus fort, sa capacité pour l'hémopexine est plus grande dans le sérum dialysé contre le NaCl 200 mM. Les ions du tampon entrent en compétition avec les protéines vis-à-vis des charges de l'échangeur au cours du déplacement : c'est ainsi que, avant l'apparition de la sérumalbumine à une concentration de 50 mM on retient l'hémopexine contenue dans un volume de sérum équivalent à 3,5 fois le volume de l'échangeur. A 200 mM par contre, on retient l'hémopexine retenue seulement dans un volume de sérum équivalent à 1,5 fois le volume de l'échangeur, avant l'apparition de la sérumalbumine.

Après avoir éliminé la sérumalbumine on se débarrasse complètement des immunoglobulines, seconde classe des protéines du sérum par leur quantité, en réalisant une chromatographie de tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA 34. L'hémopexine, colorée en vert, s'élue légèrement après la transferrine, qui, elle, est colorée en rose. L'hémopexine s'élue sur le versant descendant du pic (Figure 3, page 46).

L'immunoélectrophorèse contre un sérum anti-protéines sériques humaines totales ne révèle pas de sérumalbumine (Figure 5, en haut, page 47), ce qui montre que la sérumalbumine a bien été

éliminée lors de l'étape précédente.

L'étape finale est une chromatographie d'élution sur une colonne de DEAE-Sephadex A50 au moyen d'un tampon Tris/HCl 50 mM de pH 7,0 jusqu'à élution de l'hémopexine : un gradient de force ionique 50 à 100 mM permet l'élution de la transferrine.

L'apo-hémopexine, quand elle est présente en quantité suffisante dans le sérum de départ, s'élue comme l'ont indiqué AISEN et al. (1974) (78) à 80-85 mM en Tris. Mais, comme dans notre étude les sérums étaient le plus souvent hémolysés, l'hème-hémopexine est la forme prédominante. Elle est de ce fait élue avant l'application du gradient, bien avant la transferrine, et elle est immunologiquement pure, comme le montre la Figure 5, page 47.

L'hème-hémopexine est plus fortement retenue sur l'échangeur parce que son point isoélectrique s'est abaissé, soit du fait des carboxyles apportés par l'hème, soit par des changements conformationnels produits par son interaction avec l'hème. A la différence des procédés de relargage, notre méthode de fractionnement peut être réalisée sur des petites colonnes si les échantillons disponibles sont de faible volume. Cependant, dans le but de mettre en évidence des contaminants protéiques mineurs éventuels, nous avons travaillé à une échelle préparative.

Les rendements ont été estimés par immunodiffusion radiale en utilisant les sérums de départ comme standard sur la même plaque. Lorsque l'on rassemble les fractions avec une teneur en hémopexine plus élevée que celle du sérum, le rendement est de 50 p. 100 après les deux étapes de chromatographie de déplacement et de

tamissage moléculaire.

Pour la troisième et dernière étape de chromatographie d'échange d'ions par élution, le rendement est de 75 p. 100. Le rendement global peut être amélioré si l'on rassemble toutes les fractions contenant de l'hémopexine après élimination de la sérumalbumine par chromatographie de déplacement. Il est alors facile d'obtenir un rendement de 50 p. 100 pour l'ensemble de la purification.

La chromatographie de déplacement donne des rendements meilleurs que notre méthode précédente de relargage par le rivanol et le sulfate d'ammonium (Chapitre II). Cette méthode basée sur le relargage est proche de celle de HAYEM-LEVY et HAVEZ (1973) (79) dont AISEN et al. (1974) (80) ont estimé qu'elle procurait de bons rendements ; elle a été employée également par HRKAL et al. (1977) (81).

Si un rendement en hème-hémopexine de 50 p. 100 est recherché, la méthode que nous proposons est plus facile à réaliser que celle de VRETBAD et HJORTH (1977) (82), basée sur l'utilisation des lectines immobilisées.

L'hème-hémopexine est facile à obtenir lorsque la liaison à l'hème est réalisée dans le sérum lors de la première étape soit du fait de l'hémolyse, soit avec un échange de ligand associé au déplacement. La méthode générale pourrait être améliorée dans l'étape de déplacement par association d'ions transporteurs ; ceux-ci, des ions amphotères de pHi bien choisis, pourraient ainsi s'éluer de part et d'autre de l'hémopexine et de cette manière isoler le pic d'hémopexine de ceux des autres protéines du sérum : des ampholines (LKB) pourraient jouer ce rôle.

CHAPITRE IV

COUPURE DE L'HEME CATALYSEE PAR
L'HEMOPEXINE HUMAINE

I - INTRODUCTION

Nous avons montré dans les chapitres précédents que le point isoélectrique de l'hémopexine varie lors de sa liaison à l'hème (PLANCKE et al.) (1977) (83), (PLANCKE et al.) (1978) (84).

Selon MORGAN (1976) (85), la formation du complexe hème-hémopexine provoque un changement conformationnel dans la protéine qui conduit à sa reconnaissance par les hépatocytes.

SMITH et MORGAN (1979) (86), ont de plus, trouvé que l'hémopexine cède son hème au foie par l'intermédiaire d'interactions avec un nombre déterminé de récepteurs et qu'ensuite elle passe à nouveau dans la circulation.

Pour la formation du complexe hème-hémopexine, HRKAL et al. (1974) (87) ont réalisé "in vitro" des expériences de transfert de l'hème à partir de la ferrihémoglobine et à partir des chaînes isolées de la ferrihémoglobine vers l'hémopexine. Ces derniers auteurs ont montré, par ailleurs, que le fer de l'hème est plus facilement oxydé dans l'hémopexine que dans l'hémoglobine (HRKAL et al.) (1977) (88). Le complexe ferrohème-hémopexine s'autoxyde facilement puisque des variations significatives du spectre d'absorption sont provoquées par la conservation de l'hémopexine de lapin avec le deutérohème, le mésohème ou l'hème dans le dithionite à 0,006 p. 100 à 4°C pendant 48 heures. Des

échantillons réduits s'autoxydent pendant la conservation et montrent une bande de Soret amoindrie et un spectre modifié dans l'ultraviolet, comme l'ont observé MORGAN et MULLER-EBERHARD (1972) (89).

Nous nous sommes demandé si l'autoxydation ne pouvait pas en fait, représenter un exemple d'oxydation couplée, comme l'envisagent SCHMID et McDONAGH (1975) (90) pour l'ensemble des hémoprotéines et qui conduit à la formation de bilirubine. L'oxydation couplée des hémoprotéines, selon ces auteurs, peut être considérée comme une réaction enzymatique dans laquelle la globine ou l'apo-protéine agit comme un enzyme qui catalyserait la destruction de son propre groupe prosthétique. O'CARRA et COLLERAN (1969) (91) ont apporté des arguments expérimentaux concernant la coupure de l'hème par la myoglobine et la formation de la bilirubine.

Dans ce chapitre, nous montrons que l'hémopexine humaine peut dégrader l'hème en tant que substrat initial et que de la bilirubine est produite. Au cours de cette réaction, le point isoélectrique de l'hémopexine change. Quand la réaction est réalisée "in vitro" sur du sérum, la bilirubine formée est captée par la sérumalbumine.

2 - MATERIEL et METHODES

2.1 - Dosage de la bilirubine

Principe de la méthode

ROTH (1967) (92) a présenté une méthode simple et sensible de dosage de la bilirubine totale dans le sérum, dans laquelle 50 μ l de sérum sont mélangés à 0,6 ml d' H_3PO_4 à 85 p. 100,

3 ml d'eau sont ajoutés après une minute ou davantage et la fluorescence est mesurée avec un fluorimètre à filtre. Les longueurs d'onde des maxima d'excitation et de fluorescence sont 435 et 500 nm respectivement.

Spécificité

Cette méthode donne une bonne corrélation avec la méthode usuelle de diazo-conjugaison, mais à la différence de celle-ci, la présence de protéines dans la solution est déterminante pour la production d'une fluorescence. La formation de cette fluorescence est par ailleurs relativement spécifique de la bilirubine. Cet auteur n'a obtenu, avec la biliverdine, que 6 p. 100 de la fluorescence obtenue avec la bilirubine, tandis que le cholestérol et l'hémoglobine n'en donnaient pratiquement aucune. Il a montré aussi que la bilirubine conjuguée réagit comme la bilirubine libre, de sorte que la méthode fournit une mesure de la bilirubine totale. La réaction de fluorescence subsiste même après photo-oxydation de la bilirubine dans un sérum riche en bilirubine exposé à la lumière alors que la réactivité à l'égard de l'acide sulfanilique diazoté est perdue.

La réaction de fluorescence s'applique tant à la bilirubine libre qu'à ses glucuronoconjugués.

La reproductibilité pour un sérum normal est meilleure que ± 2 p. 100.

Appareillage

Nous avons automatisé le dosage de la bilirubine suivant la méthode de ROTH (1967) (93) à l'aide d'une chaîne autoanalyseur "Technicon" comprenant un manifold, une pompe proportionnante, un fluorimètre "type III" et un enregistreur. Un préleveur d'échantillons "Gilson" a été utilisé.

Réglage

Les filtres de fluorimètre "Technicon autoanalyseur type III" ont été contrôlés par l'enregistrement de leur spectre avec le spectrophotomètre "Varian 635D". Le filtre primaire sélectionne la lumière avec un maximum à 430 nm. Le filtre secondaire absorbe la lumière au-dessous de 500-550 nm. Le diaphragme "sample aperture" a été fixé à la position 2, le diaphragme "reference aperture" a été fixé à la position 1. Le potentiomètre "base line" a été fixé à la graduation 75, le potentiomètre "standard calibration" à la position 100. Ce dernier potentiomètre conditionne l'amplitude du signal obtenu sur l'axe des ordonnées du papier d'enregistrement.

L'échantillon est prélevé pendant un temps de 90 secondes, séparé par un temps de repos de 15 secondes, correspondant à l'injection d'air, et par un temps de rinçage à l'eau de 120 secondes.

Pompe proportionante : Débit des tubes (ml/mn)

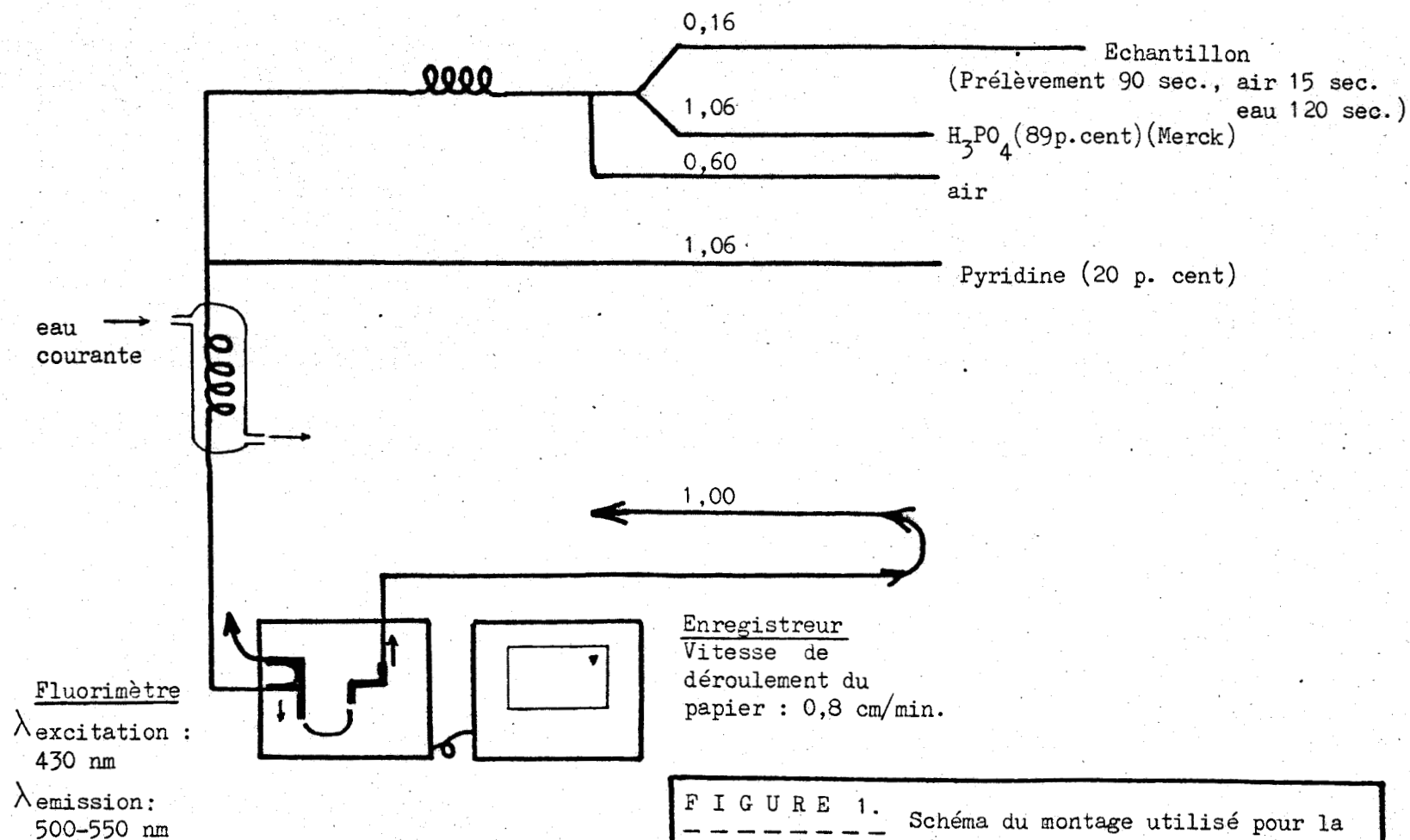


FIGURE 1. Schéma du montage utilisé pour la détermination de la bilirubine provenant de la dégradation de l'hème au cours de la chromatographie de déplacement.

2.2 - L'oxydation croisée au cours de la chromatographie de déplacement

Dans la chromatographie d'échange d'ion par déplacement les protéines fortement retenues par l'échangeur déplacent les protéines faiblement retenues. Les protéines se déplacent les unes les autres par ordre croissant d'affinité pour l'échangeur. Plus une protéine est retenue sur le DEAE-Sephadex A50 (Pharmacia), c'est-à-dire plus son point isoélectrique est bas, plus sa concentration est augmentée après déplacement hors de la colonne. Le dépôt du sérum sur la colonne est arrêté lorsque la sérumalbumine occupe toutes les charges de l'échangeur.

La chromatographie de déplacement a été réalisée sur du sérum humain provenant d'un sang fortement hémolysé, avec le DEAE-Sephadex A50 (Pharmacia) selon un procédé que nous avons déjà décrit (PLANCKE et al.) (1978) (94). Pour chaque expérience, on utilise un volume de sérum équivalent à deux fois le volume de l'échangeur dans la colonne, soit 2 litres de sérum pour 1 litre d'échangeur tassé dans le tampon Tris/HCl 200 mM, pH 7,0.

Des fractions de volume constant sont recueillies : environ 1/100 du volume d'échangeur, soit 10 ml.

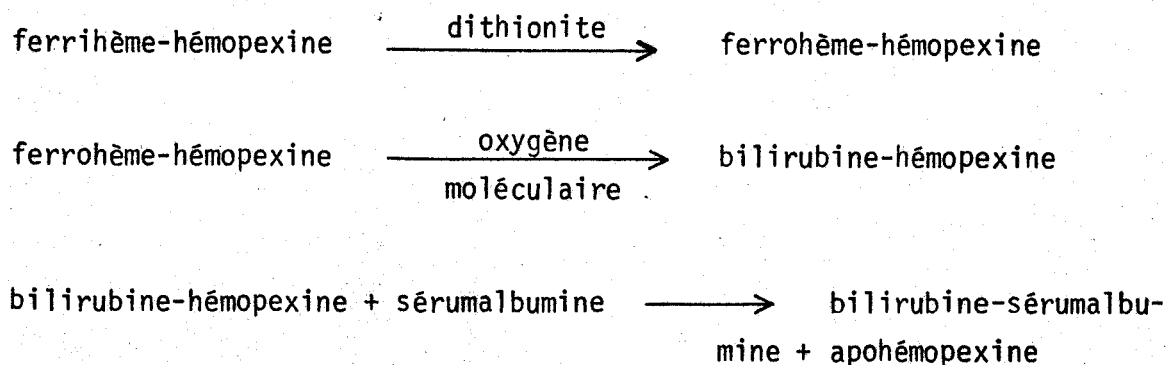
La détermination quantitative de l'hémopexine est réalisée par immunodiffusion radiale avec les "M-Partigen Behring". Le profil d'élution global des protéines du sérum, et en particulier le commencement de l'élution de la sérumalbumine est établi par électrophorèse standard sur acétate de cellulose (Sébia), en tampon véronal pH 8,6 et coloration au rouge ponceau.

Immunodiffusion radiale et électrophorèse sont réalisées toutes les 5 fractions.

Dans la détermination de l'hémopexine (Figure 2, page 64) 100 p. 100 représente la concentration moyenne du sérum humain de départ, où lorsque l'échangeur étant saturé, la composition de l'éluat rejoint celle du sérum de départ ; cette composition du sérum de départ est obtenue dès l'apparition de la sérumalbumine dans l'éluat.

Protocole de co-oxydation

La réaction de co-oxydation peut se schématiser de la manière suivante :



Le sérum contenant un excès d'hème par rapport à l'hémopexine est d'abord réduit par addition de dithionite de sodium cristallisé pour obtenir une concentration finale de 20 à 50 mM. La dissolution est réalisée sous agitation magnétique pendant une minute. La solution est, soit déposée immédiatement sur la colonne,

soit laissée sous agitation à l'air pendant un temps variable de façon à permettre la réoxydation.

Lors du dosage de la bilirubine, une fraction sur 10 de la chromatographie est d'abord soumise au dosage. La valeur maximale de bilirubine obtenue est alors affichée sur toute l'échelle disponible en faisant varier le réglage du potentiomètre "standard calibration" au voisinage de la position 100.

3 - RESULTATS

Comme nous l'avons montré (PLANCKE et al.) (1978) (95), la forme apo-hémopexine peut être distinguée de la forme hème-hémopexine par chromatographie d'échange d'ions par déplacement sur DEAE-Sephadex A50.

L'hémopexine est plus fortement retenue sur l'échangeur consécutivement au changement de pHi provoqué par son interaction avec l'hème. Des variations dans l'exposition des groupes chargés électrostatiquement à sa périphérie augmentent l'interaction de la protéine avec l'échangeur. Plus une protéine est retenue - c'est-à-dire plus son pHi est bas - plus elle se trouve enrichie par comparaison au sérum après son déplacement hors de l'échangeur. L'élution de l'apo-hémopexine se fait sous forme d'un plateau, puisqu'elle est faiblement retenue, tandis que l'hème-hémopexine est éluée plus tardivement sous forme d'un pic car elle est plus fortement retenue par l'échangeur.

L'oxydation couplée de l'hème-hémopexine avec le dithionite de sodium intervient au cours de l'agitation en présence d'air, effectuée avant la chromatographie de déplacement. Si la chromatographie de déplacement est commencée immédiatement dès la dissolution du dithionite, l'étape de réduction du milieu tout autant que sa réoxydation à l'air sont limitées : le sérum est en effet débarrassé de l'agent réducteur tout au début de la chromatographie puisque l'échangeur d'anions retient fortement les ions $S_2O_4^{--}$, ce qui limite ainsi l'étape de réduction. Une réoxydation est aussi réalisée sur l'échangeur, mais de façon limitée, car seul l'oxygène de l'air dissous dans le sérum peut intervenir dans cette réoxydation. De plus, la production de bilirubine au cours de la chromatographie de déplacement intervient dans un compartiment du sérum privé de l'albumine et elle est éluée en même temps que l'hémopexine au fur et à mesure de sa formation.

Si avant la chromatographie, on ménage un temps d'agitation à l'air, la production de bilirubine dépend de la durée de la réoxydation et comme celle-ci s'effectue en présence de sérumalbumine, la bilirubine est éluée sous forme de bilirubine-albumine.

Les figures 2A, 2B, 2C et 2D, pages 64, 65, 66 et 68 montrent dans diverses conditions de réoxydation de l'hème-hémopexine, le dosage de l'hémopexine et de la bilirubine au cours de la chromatographie de déplacement.

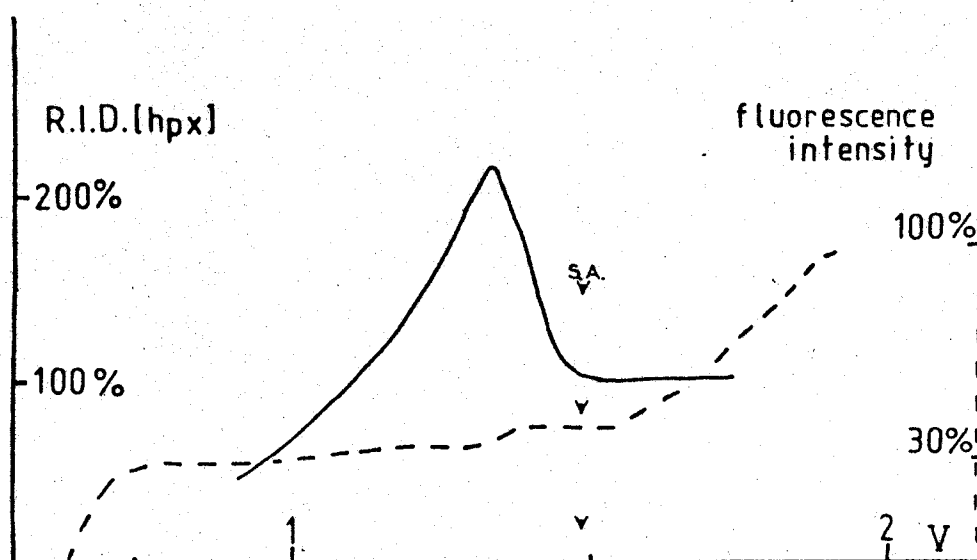


FIGURE 2.

Changement du point iso-électrique de l'hémopexine
au cours de la production de bilirubine.

Courbes témoins réalisées sur le sérum hémolysé:

FIGURE 2 - A.

- : Hémopexine dosée par immuno-diffusion radiale (R.I.D.)
(100 % : Taux d'hémopexine dans le sérum)
- - - - - : Bilirubine dosée par la méthode de ROTH (100 % :
Taux de bilirubine au niveau de la sérum albumine)
- S. A. : Début de l'élution de la sérum albumine.
- V : Volume de sérum utilisé par volume d'échangeur.



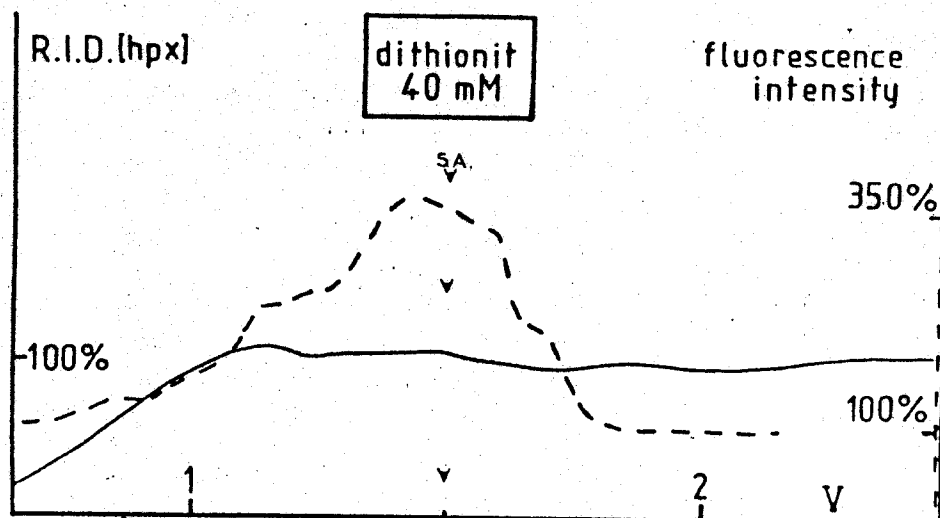


FIGURE 2.

Changement du point iso-électrique de l'hémopexine
au cours de la production de bilirubine.

Production de bilirubine non encore captée par la
sérum albumine. :

FIGURE 2 - B.

- : Hémopexine dosée par immuno-diffusion radiale (R.I.D.)
(100 % : Taux d'hémopexine dans le sérum)
- - - - - : Bilirubine dosée par la méthode de ROTH (100 % :
Taux de bilirubine au niveau de la sérum albumine).
- S.A. : Début de l'élution de la sérum albumine. .
- V : Volume de sérum utilisé par volume d'échangeur.

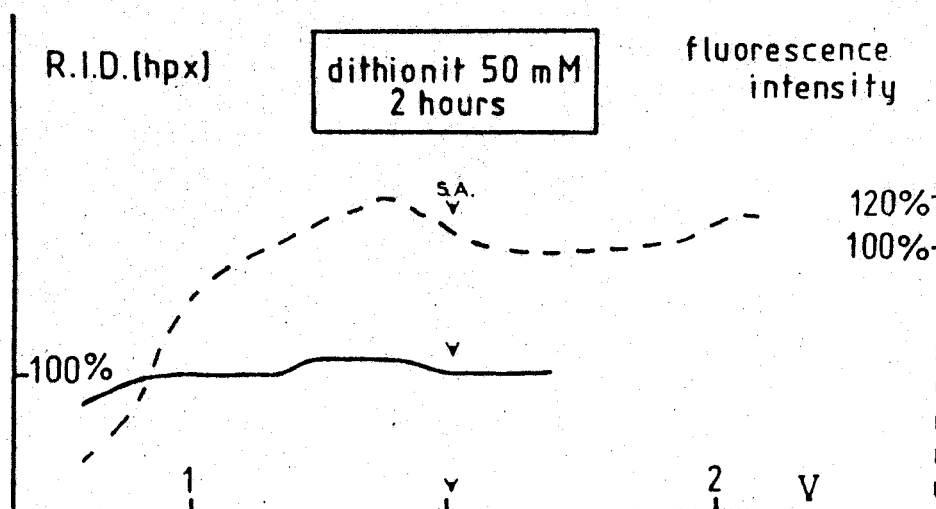


FIGURE 2.

Changement du point iso-électrique de l'hémopexine
au cours de la production de bilirubine.

Production de bilirubine, début de sa capture par la
sérum albumine:

FIGURE 2 - C.

- : Hémopexine dosée par immuno-diffusion radiale (R.I.D.)
(100 % : Taux d'hémopexine dans le sérum).
- - - - - : Bilirubine dosée par la méthode de ROTH (100 % :
Taux de bilirubine au niveau de la sérum albumine).
- S. A. : Début de l'élution de la sérum albumine.
- V : Volume de sérum utilisé par volume d'échangeur.

La figure 2A, page 64 montre la chromatographie de déplacement d'un sérum hémolysé sans réaction de co-oxydation. L'hémopexine s'élue sous forme d'un pic caractéristique de l'hème-hémopexine sans plateau d'apohémopexine, ce qui traduit l'excès d'hème par rapport à l'hémopexine, tandis que la bilirubine s'élue en deux plateaux, le plus élevé (le 2ème) correspondant à l'élution de la bilirubine liée à la sérumalbumine. Le premier plateau correspond peut-être à de la bilirubine adsorbée sur des protéines éluées avant la sérumalbumine (immunoglobuline et β -globuline).

Dans la figure 2B page 65, après l'addition de dithionite au sérum, immédiatement avant la chromatographie de déplacement, sans réoxydation à l'air par agitation, l'élution de l'hémopexine se fait en plateau caractéristique de la forme apohémopexine. Sa concentration atteint rapidement une valeur constante. A l'inverse, la bilirubine s'élue sous la forme d'un pic avant le commencement de l'élution de la sérumalbumine et en plateau au niveau de l'élution de la sérumalbumine ; le pic de bilirubine correspond donc à la formation, "in situ" sur la colonne, de la bilirubine par oxydation couplée de l'hème lié à l'hémopexine : cette réaction s'effectue en absence de sérumalbumine, plus fortement retenue par l'échangeur, ce qui explique qu'aucun transfert de la bilirubine vers la sérumalbumine n'a pu se produire.

Le pic de bilirubine s'affaiblit si on ménage un temps de réoxydation par agitation dans un bécher aéré comme le montrent les figures 2C et 2D pages 66 et 68. Après une agitation de 2 heures avec l'oxygène de l'air avant la chromatographie de

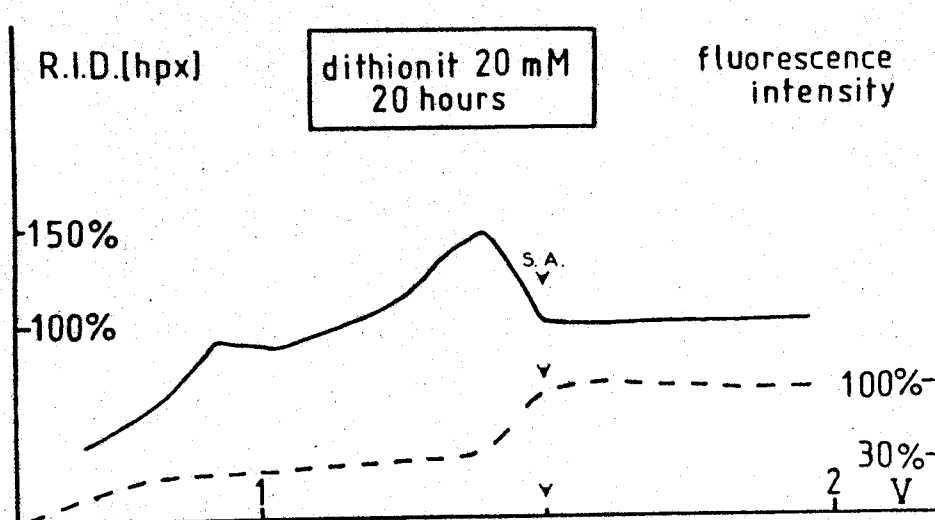


FIGURE 2.

Changement du point iso-électrique de l'hémopexine au cours de la production de bilirubine.

La bilirubine formée est captée par la sérum albumine :

FIGURE 2 - D.

— : Hémopexine dosée par immuno-diffusion radiale (R.I.D.)
(100 % : Taux d'hémopexine dans le sérum)
- - - - - : Bilirubine dosée par la méthode de ROTH (100 % :
Taux de bilirubine au niveau de la sérum albumine).
S. A. : Début de l'élution de la sérum albumine.
V : Volume de sérum utilisé par volume d'échangeur.

déplacement (Figure 2C, page 66), la bilirubine se trouve répartie d'une manière équivalente avant et après l'élution de la sérumalbumine : ceci traduit la formation de bilirubine par oxydation couplée et son transfert à la sérumalbumine avant l'étape de chromatographie ; cette oxydation n'est cependant pas encore totale puisque de la bilirubine est encore produite durant la chromatographie comme en témoigne le pic de bilirubine élué avant la sérumalbumine.

Dans la figure 2D, page 68, un temps de 20 heures pour la réoxydation sous agitation détermine un profil d'élution pour la bilirubine qui ressemble à celui de la figure 2A, page 64 obtenu sans oxydation couplée : on observe deux plateaux successifs de la bilirubine avant et après l'élution de la sérumalbumine. Si la bilirubine libre ou sous forme de bilirubine-hémopexine ou liée à d'autres protéines reste à un taux constant, la bilirubine-albumine augmente d'un facteur 1,5 par rapport au taux de la figure 2A page 64 ; au cours des 20 heures de réoxydation à l'air, le dithionite a été complètement oxydé. Comme d'autre part la bilirubine a été captée par la sérumalbumine, l'hème en excès peut à nouveau se complexer à l'hémopexine : ceci se traduit sur la courbe d'élution de l'hémopexine par la superposition d'un plateau correspondant à l'apohémopexine et d'un pic d'hème-hémopexine résultant de la fixation de l'excès d'hème par l'apohémopexine libérée par le départ de la bilirubine.

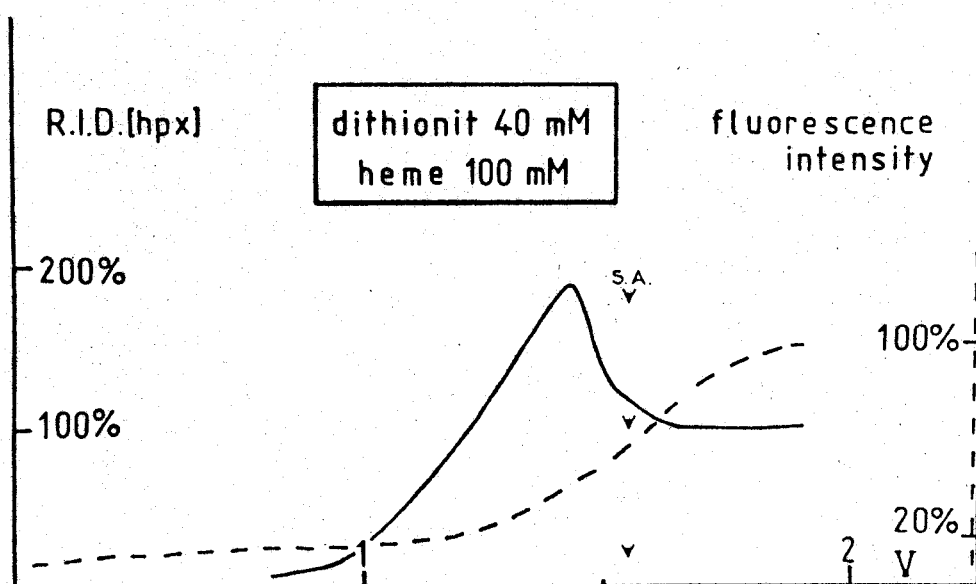


FIGURE 2.

Changement de point iso-électrique de l'hémopexine
au cours de la production de bilirubine.

FIGURE 2 - E.

- : Hémopexine dosée par immuno-diffusion radiale (R.I.D.)
(100 % : Taux d'hémopexine dans le sérum)
- - - - - : Bilirubine dosée par la méthode de ROTH (100 % :
Taux de bilirubine au niveau de la sérum albumine).
- S. A. : Début de l'élution de la sérum albumine.
- V : Volume de sérum utilisé par volume d'échangeur.

Dans la figure 2E page 70, nous avons repris les conditions expérimentales de la figure 2B, page 65 (dithionite 40 mM et chromatographie immédiate) mais avec addition d'hématine à la concentration de 100 mM. Le diagramme d'élution de l'hémopexine et de la bilirubine est identique à celui de la figure 2A page 64 servant de référence (pas de dithionite) : la bilirubine sort sous forme de bilirubine-albumine et l'hémopexine est entièrement sous forme d'hème-hémopexine ; rien ne s'est donc apparemment passé au cours de cet essai. Comme la concentration en réducteur est nettement inférieure à celle du ferrihème (ferrihème-hémopexine, hématine libre du sérum et hématine ajoutée avant la chromatographie) il est vraisemblable que le dithionite a réduit une partie de l'hématine libre en excès par rapport au dithionite et à l'hémopexine sans réduire la ferrihème-hémopexine, en raison de l'accessibilité plus difficile du fer dans ce complexe ; au cours de la chromatographie, l'oxygène du milieu s'est révélé inactif sur la ferrihème-hémopexine (pas de pic de bilirubine au niveau de l'hémopexine) et n'a vraisemblablement eu que le seul effet de réoxyder l'hème libre en hématine libre sans production de bilirubine.

4 - DISCUSSION

La série d'expériences rapportée dans la figure 2, pages 64, 65, 66, 68, 70 montre que l'hémopexine peut jouer un rôle direct dans la dégradation de l'hème.

Au cours de cette réaction, le dithionite réduit la ferrihème-hémopexine en ferrohème-hémopexine : le ferrohème peut alors être oxydé en bilirubine et ceci exige que l'hème soit fixé par l'hémopexine : ceci semble donc faire jouer à l'hémopexine un rôle particulier dans la catalyse de cette oxydation.

Certes, le mécanisme invoqué pour expliquer les résultats est assez peu physiologique : cependant, il offre l'avantage de montrer que le mécanisme chimique peut exister dans l'organisme en faisant intervenir un système de réduction enzymatique qui reste à découvrir.

La réduction de l'hémehémopexine par un réactif chimique et la possibilité de cette même réduction par un mécanisme enzymatique présente des analogies avec la réduction purement chimique de la méthémoglobine en hémoglobine et la réduction enzymatique par un système oxydo-réducteur de l'hématie.

HRKAL et al. (1974) (96) ont estimé à $1,9 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, la valeur de la constante d'affinité de l'hémopexine pour l'hème.

La bilirubine peut être aussi liée par l'hémopexine : MORGAN et al. (1978) (97) ont donné la valeur de $7,5 \times 10^7$ pour la constante d'affinité de l'hémopexine pour la bilirubine, et ces auteurs ont montré aussi que la bilirubine était liée au même site de fixation que l'hème.

La sérumalbumine lie à la fois l'hème et la bilirubine mais elle lie plus fortement la bilirubine que ne le fait l'hémopexine. Elle joue par conséquent un rôle important en ce sens qu'elle

déplace la bilirubine de l'hémopexine et permet ainsi la régénération de l'apohémopexine qui est alors capable de fixer une nouvelle molécule d'hème. Ici encore, la signification physiologique de cette réaction doit être envisagée. En effet, SMITH et MORGAN (1978) (98), (1979) (99), ont montré que l'hémopexine transportait l'hème au foie. Ils ont apporté des preuves concernant l'existence d'un récepteur hépatique et la réutilisation de l'hémopexine pour la capture d'une nouvelle molécule d'hème dans le sérum.

DAVIES et al. (1979) (100) ont examiné la distribution subcellulaire et le devenir métabolique de la [^{59}Fe] -hème - [^{125}I] -hémopexine marquée après l'interaction avec un récepteur hépatique. Pour ces auteurs, le fer héminique, se retrouve lié à la ferritine. Ces auteurs suggèrent ainsi que le processus de transport cellulaire achemine l'hème de la membrane plasmique vers l'hème oxygénase par le réticulum endoplasmique. Cet enzyme est connu pour dégrader l'hème provenant d'une source telle que l'hémoglobine, conduisant à l'excrétion de bilirubine, tandis que le fer est emmagasiné sur la ferritine, à partir de laquelle il est réutilisé.

La réduction de l'hème-hémopexine dans le sérum est peu vraisemblable car, comme l'ont montré HRKAL et al. (1977) (101) c'est la forme ferrihème-hémopexine que l'on rencontre dans le sérum.

Cependant, cette équipe (HRKAL et al.) (1974) (102) a montré que l'hémopexine pouvait capter l'hème de la ferri-hémoglobine

On peut se demander si après hémolyse intravasculaire et dénaturation de l'hémoglobine, l'hémopexine ne peut pas capter le ferrohème et se réoxyder ensuite dans le sérum en produisant de la bilirubine alors que la ferrihème-hémopexine, captée spécifiquement par l'hépatocyte y trouverait un système réducteur permettant sa dégradation en bilirubine.

CHAPITRE V

ETUDE DES SPECTRES D'ABSORPTION
ET DES SPECTRES DICHROIQUES DE
L'HEME HEMOPEXINE HUMAINE

I - INTRODUCTION

DRABKIN (1971) (103) a montré que l'hémopexine, β_1 -globuline du plasma et la sérumalbumine ont des rôles coopératifs, physiologiquement fonctionnels dans le transport de l'hème et dans la production des pigments biliaires.

L'hémopexine provoque une production de pigment biliaire dans le foie isolé de rat à partir de l'injection d'hémoglobine comme l'a démontré DRABKIN (1971) (104). Les mécanismes variés, enzymatiques et non enzymatiques, proposés pour la dégradation de l'hème en pigments biliaires ont été analysés de façon critique par GRAY et al. (1972) (105) comme nous l'avons rappelé dans le chapitre I. Un autre aspect de l'étude de l'hémopexine consiste à envisager son interaction avec l'hème : celle-ci provoquerait, d'après MORGAN et al. (1976b) (106) une réorganisation conformationnelle dans l'hémopexine qui lui permettrait alors d'interagir avec un récepteur, probablement une protéine, sur l'hépatocyte.

L'interaction hème-hémopexine est donc intéressante à étudier, et le dichroïsme circulaire est une technique particulièrement adaptée dans ce cas. En effet, du fait de sa symétrie, l'hème seul est optiquement inactif ; donc il ne présente pas, en solution, d'activité optique décelable. Par contre, quand il est

lié à une protéine, un effet Cotton peut être induit dans sa bande d'absorption du fait de son interaction avec la protéine. Bien que le traitement théorique complet du signal dichroïque correspondant n'ait pu être réalisé, HSU et WOODY (1971) (107) ont pu émettre une hypothèse concernant son origine : il serait dû essentiellement à un mécanisme d'interaction par oscillateur couplé entre le chromophore hémique et le nombre important de groupes aromatiques qui entourent l'hème. Une telle hypothèse est tout à fait en accord avec les précédents travaux de HAYEM-LEVY et HAVEZ (1973) (108) qui pensent que deux résidus d'histidine seraient impliqués dans le site actif de l'hémopexine. De même, KODICEK et al. (1977) (109) et MORGAN et MULLER-EBERHARD (1976) (110) ont montré, qu'en plus de l'histidine, des résidus de tyrosine et surtout de tryptophane étaient responsables de la haute affinité de l'hème pour l'hémopexine.

En d'autres termes, la forme et l'amplitude de la bande dichroïque dans la zone de Soret dépendra donc de l'organisation de certains résidus d'acides aminés au voisinage immédiat de la molécule. Des changements importants dans la forme de cette bande pourront intervenir quand cet environnement sera lui-même modifié, sans que soit forcément impliqués de changements conformationnels importants dans la protéine tout entière.

L'interaction de l'hème avec l'hémopexine peut aussi se traduire par une susceptibilité de l'hème dans l'hémopexine à l'auto-oxydation, comme l'ont déjà souligné MORGAN et MULLER-EBERHARD (1972) (111) et aussi par une diminution de la bande de Soret sur

les spectres d'absorption après réduction de l'hème-hémopexine. Cette réduction peut être réalisée par le dithionite de sodium, par exemple, nous avons pu mettre en évidence un effet de destruction de l'hème, lors de la réoxydation à l'air de l'hémopexine préalablement mise en contact avec du dithionite.

Dans ce Chapitre, nous avons soumis l'hème-hémopexine à une réduction par le dithionite, puis à une réoxydation par l'air.

L'utilisation simultanée de spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire nous ont permis de suivre non seulement la quantité d'hème lié à l'hémopexine, mais les variations conformationnelles du site de fixation à l'hème. Nous verrons comment il nous a été possible, à partir de ces mesures, d'émettre une hypothèse concernant l'existence de deux sites d'interaction de l'hémopexine avec l'hème comme nous l'avons déjà suggéré sur la base d'arguments immunologiques rapportés dans le Chapitre II.

2 - MATERIEL et METHODES

L'hémopexine du sérum humain a été obtenue comme nous l'avons déjà décrit (voir Chapitre III), par un protocole en trois étapes impliquant la chromatographie d'échange d'ion par déplacement du sérum humain total, la chromatographie de tamisage moléculaire et la chromatographie d'échange d'ion par élution (PLANCKE et al.) (1978) (112). Cependant, pour le présent travail, avant la seconde étape, la fraction enrichie en hème hémopexine a été additionnée de dithionite de sodium (20 mM). Les sels sont éliminés systématiquement pendant la chromatographie de tamisage moléculaire. De plus, dans le même temps, tout ligand non lié tel que l'hème ou un produit de

dégradation de l'hème, a été éliminé. Tout chromophore restant est donc lié à la protéine.

Les spectres d'absorption sont enregistrés sur un spectrophotomètre "CARRY 118" et ceux de dichroïsme circulaire sur un dichrographe "JOBIN-YVON R.J. MARCK III" à température ambiante (24°C), sous un courant d'azote, avec une cuve de trajet optique 1 cm et de volume intérieur 2,8 ml. La sensibilité est de 10^{-6} .

Les ellipticités molaires $[\theta]$ sont exprimées en degré $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$; elles sont calculées sur la base d'un poids moléculaire de 57 000 pour l'hémopexine. La concentration en protéine est évaluée à partir du spectre d'absorption pour un coefficient d'extinction millimolaire à 280 nm de 110 pour l'hémopexine, selon SEERY et al. (1972) (113). La concentration en hémopexine employée est de 12,5 μM .

De même, la concentration en hème est déduite de son coefficient d'extinction millimolaire dans le diméthylsulfoxyde à 404 nm de 170 d'après BROWN et LANTZKE (1969) (114). On réalise d'abord une solution concentrée d'hème dans le diméthylsulfoxyde ; on prélève des aliquots de 5 μl que l'on ajoute à la solution aqueuse d'hémopexine. On ne fait pas de correction de volume. En ajoutant 5 μl de cette solution mère, on réalise dans la cuve du dichrographe, une concentration en hème libre de 1,9 μM .

Les spectres d'absorption et ceux de dichroïsme ont été réalisés sur une même solution maintenue dans une même cuve.

La réduction a été faite par addition de dithionite en poudre : 5 mg sont ajoutés directement dans la cuve du dichrographe. A ces concentrations, le dithionite est tout à fait soluble, et, mis en solution dans le tampon seul, il ne provoque pas de signal dichroïque. La réoxydation par l'oxygène de l'air est effectuée dans cette cuve par aspiration et reflux répétés à l'aide d'une pipette Pasteur.

La solution tampon employée est celle du tamisage moléculaire du protocole de préparation : Tampon Tris/HCl 0,1 M, NaCl 0,2 M à pH 8,0.

3 - RESULTATS

3.1 - Spectres d'absorption (Figure 1, page 81)

Pour s'assurer d'une réduction puis d'une réoxydation effective de l'hème hémopexine de départ ($12,5\mu\text{M}$), les spectres d'absorption ont été enregistrés (Figure 1, page 81)

Les spectres au niveau de la bande de Soret pour l'hème hémopexine humaine oxydée et réduite, n'ont, jusqu'à présent, pas été publiés dans la littérature. Ceci tient probablement à la difficulté de préparation de cette glycoprotéine.

Nous pouvons donner la valeur de 407 nm pour la ferrihème hémopexine au maximum de la bande de Soret.

Dans la forme réduite, le dithionite seul possède une forte absorption qui commence au-dessous de 400 nm ; il n'altère

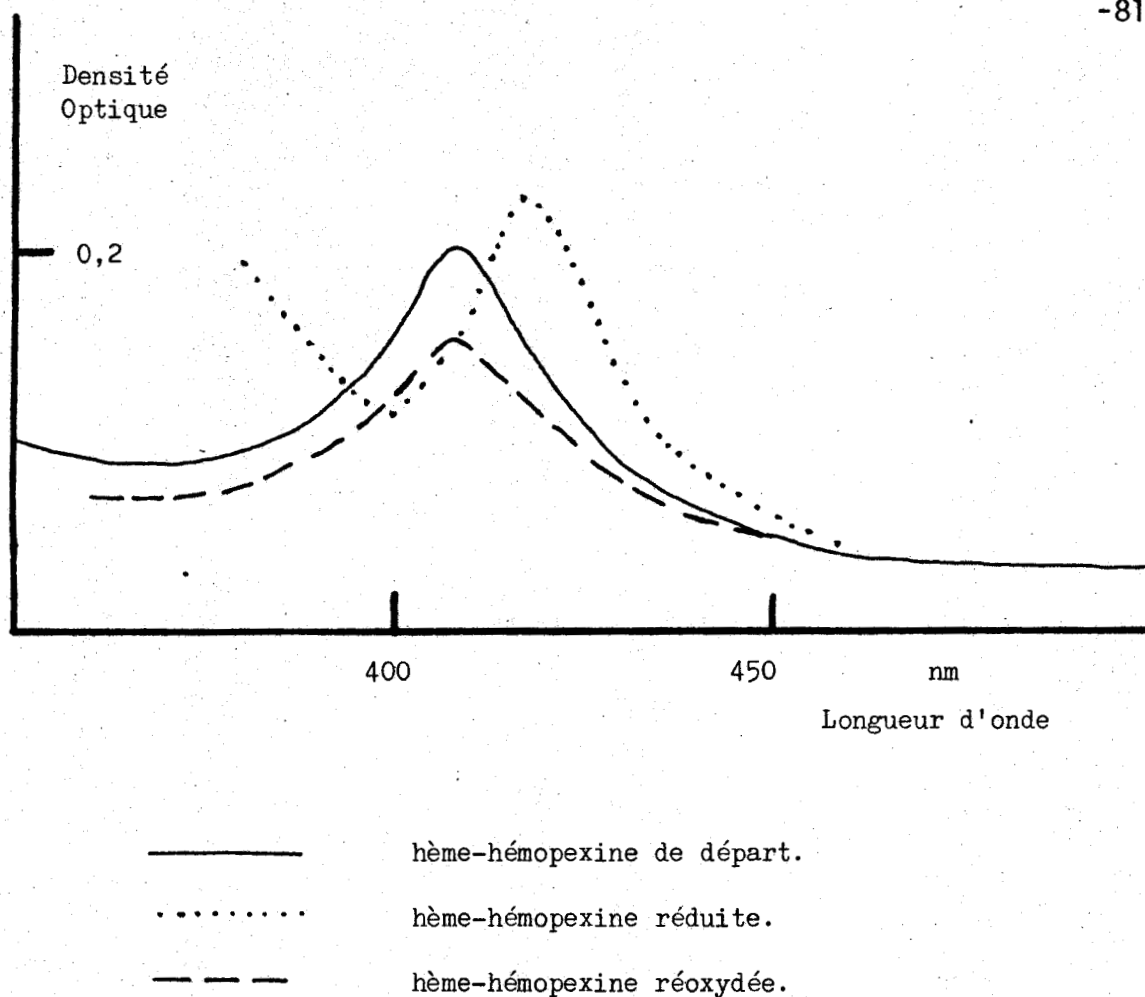


FIGURE 1

Spectres d'absorption de l'hème-hémopexine humaine

La forme réduite se caractérise par une augmentation de la longueur d'onde du maximum d'absorption ou bande de Soret.

Le retour à l'état oxydé s'accompagne d'une diminution de l'intensité de la bande de Soret.

pas le signal au niveau maximum situé à 418 nm. Une diminution de l'intensité de la bande de Soret est observée après réoxydation. Pour les trois spectres, les pics sont symétriques.

Examinons ce qui se passe lorsqu'on ajoute de l'hème libre : la Figure 2 page 83 , montre ce que l'on obtient quand l'hème libre est ajouté à l'hème hémopexine dans un rapport molaire de 1/7. Le spectre obtenu montre une superposition du spectre d'hème et du spectre d'hème hémopexine. On remarque, en particulier, la présence d'une absorption due à l'hème dans le domaine 350-400 nm, qui disparaît par addition de dithionite ; le spectre de la solution après réduction redevient symétrique. De plus, comme dans la Figure 1, le maximum est déplacé vers les grandes longueurs d'onde et l'on observe une augmentation de l'intensité de ce pic : cela montre que la réduction est nécessaire à la capture de l'hème par l'hémopexine.

Le retour à l'état oxydé s'accompagne d'une diminution de l'intensité de la bande de Soret qui retourne à un niveau proche de celui de l'hème hémopexine de départ (D.O. environ 0,2), ce qui semblerait montrer que seule la quantité d'hème libre qui a été ajoutée a été détruite lors de la réoxydation, mais que la quantité d'hème qui était fixée dès le départ sur l'hémopexine se retrouve presque intégralement.

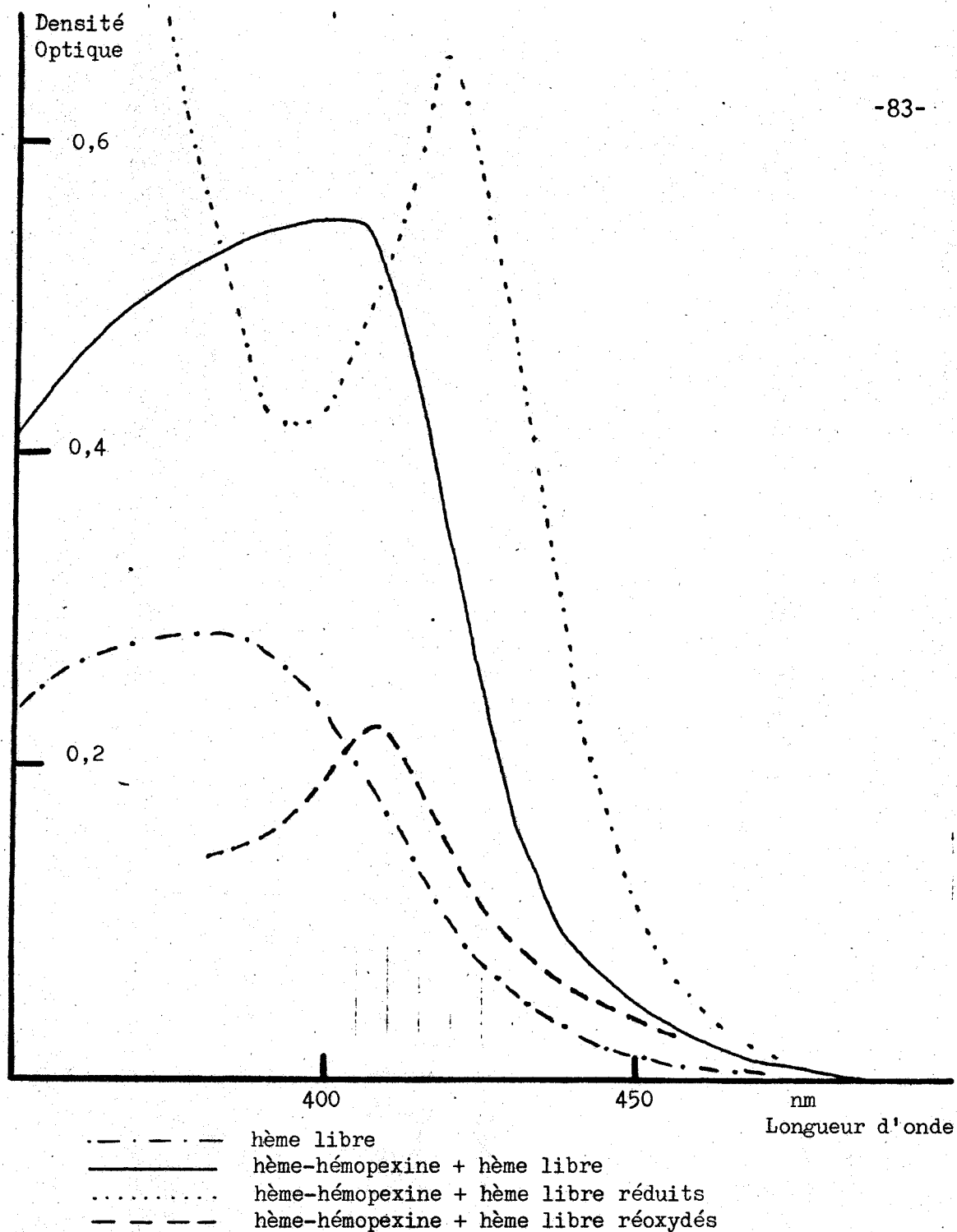


FIGURE 2 Spectres d'absorption de l'hème-hémopexine humaine additionnée d'hème libre.

Par réduction le pic d'absorption correspondant à la bande de Soret devient symétrique. Le retour à l'état oxydé s'accompagne d'une diminution d'intensité de la bande de Soret.



3.2 - Spectres dichroïques (Figure 3, page 85)

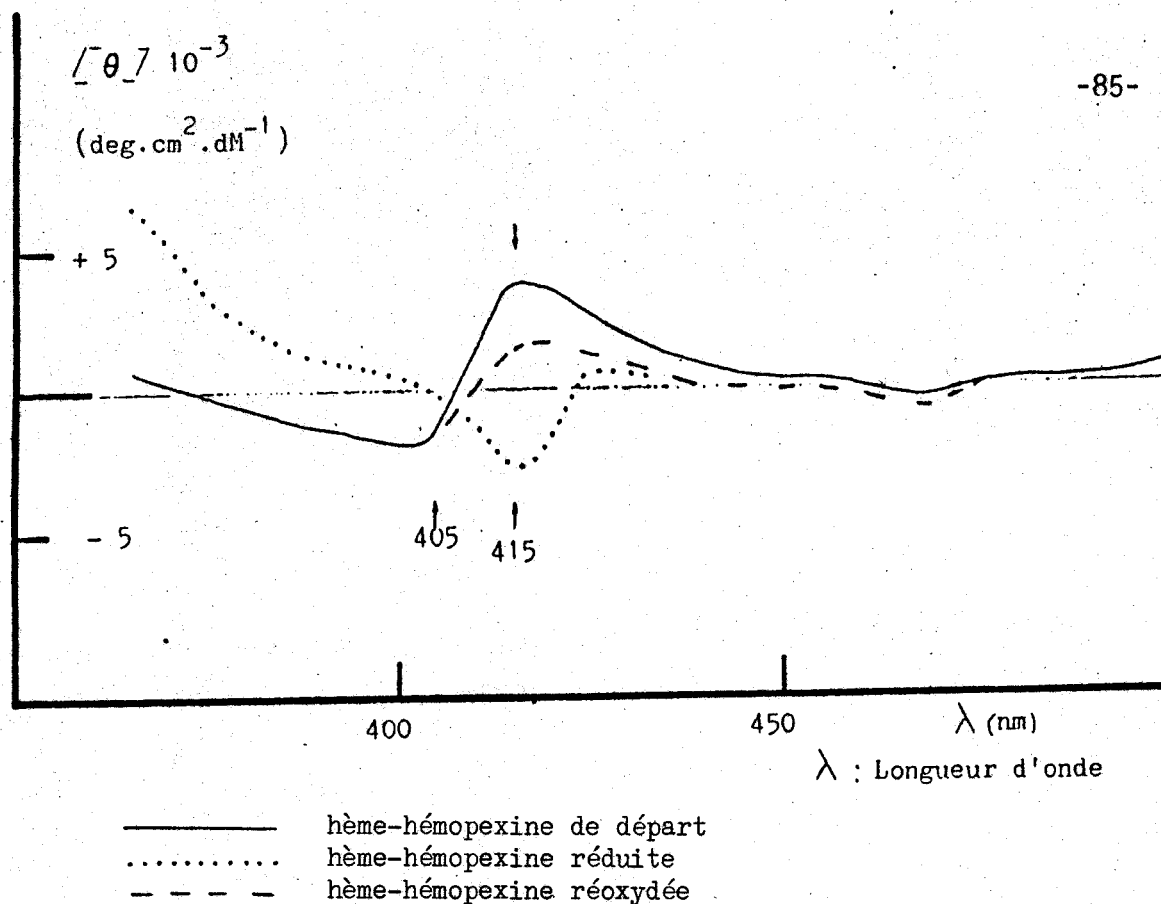
Rappelons que ce sont les mêmes solutions qui ont été utilisées pour tracer les spectres dichroïques et les spectres d'absorption correspondants.

La figure 3, page 85 qui est donc à rapprocher de la figure 1 page 81, montre les spectres dichroïques d'une solution d'hème hémapexine, après réduction et après réoxydation. L'amplitude du signal dichroïque est légèrement inférieure à 5.000. Cette valeur est proche de celle trouvée par KODICEK et al. (1977) (115) qui obtiennent des ellipticités du même ordre de grandeur.

La solution d'hème-hémapexine de départ est caractérisée par une bande positive dont le maximum est situé à 415 nm avec une ellipticité de $[\theta]_{415} = 3800 \text{ deg. cm}^2 \text{ dM}^{-1}$ et une bande négative moins intense à 405 nm $[\theta]_{405} = -1900 \text{ deg. cm}^2 \text{ dM}^{-1}$. La réduction s'accompagne d'une inversion du signal dichroïque dans la zone de Soret : une seule bande négative est observée vers 415 nm, avec $[\theta]_{415} = -2700 \text{ deg. cm}^2 \text{ dM}^{-1}$.

Lors de la réoxydation, l'allure générale du spectre est celle qui avait été obtenue pour la solution de départ, mais si l'intensité de la bande négative est identique à celle de la solution de départ, celle de la bande positive a diminué de façon tout à fait significative : $[\theta]_{415} = 1600 \text{ deg. cm}^2 \text{ dM}^{-1}$.

Sur la figure 4 page 87, ont été tracés les spectres



	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[\theta]_{\max}$ (deg.cm ² .dM ⁻¹)
Solution de départ	415	+ 3 800
	405	- 1 900
Solution "réduite"	415	- 2 700
Solution "réoxydée"	415	+ 1 620
	405	- 1 900

FIGURE 3. Spectres dichroïques de l'hème-hémopexine humaine.

La réduction s'accompagne d'une inversion du signal dichroïque dans la zone de Soret.

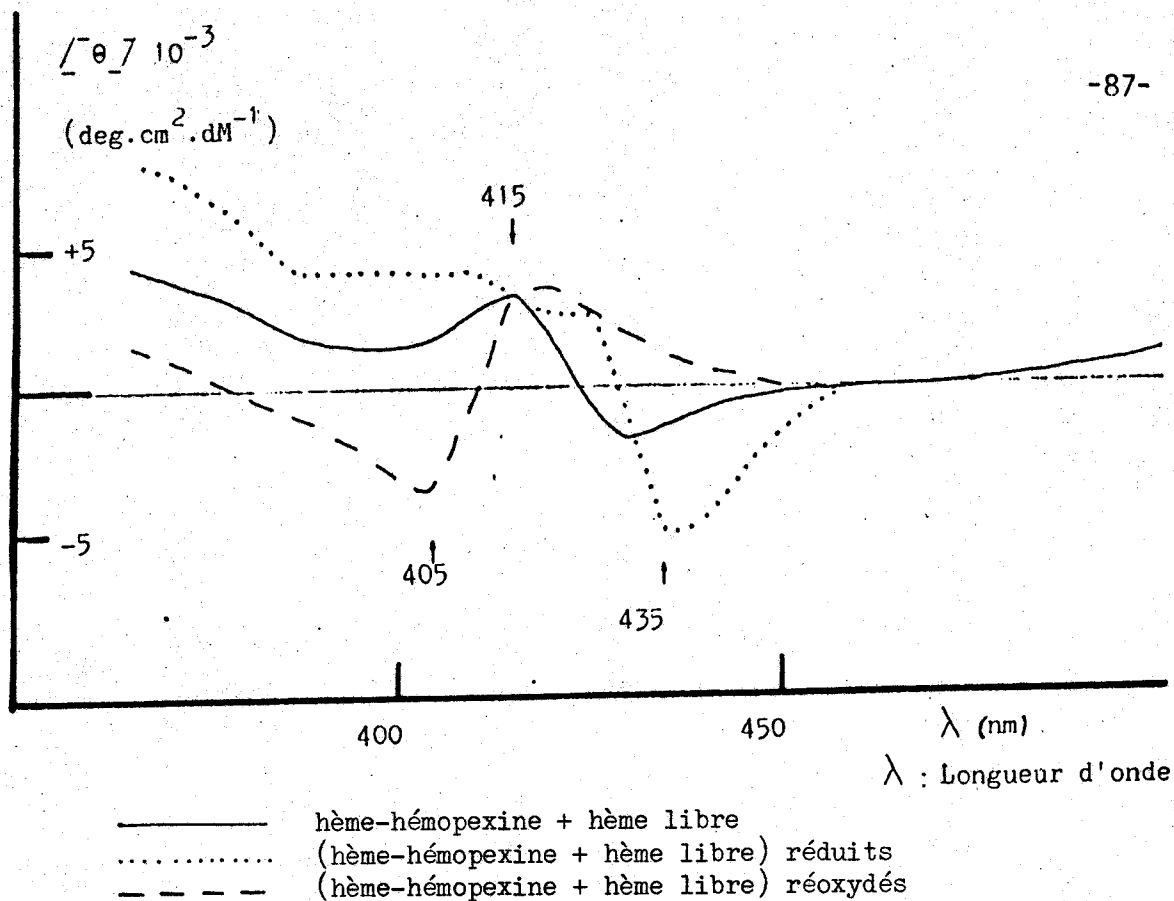
Lors de la réoxydation, l'intensité de ce signal décroît.

dichroïques obtenus à partir des solutions contenant de l'hème libre et correspondant aux spectres d'absorption de la Figure 2, page 83. Ils représentent l'effet de l'addition d'hème libre sur les signaux dichroïques, l'effet de la réduction et l'effet de la réoxydation.

La solution hème hémopexine + hème libre de départ ne présente pas un spectre identique à celui obtenu (Figure 3, page 85) pour une solution d'hème hémopexine, ce qui tendrait à prouver que, dès la mise en solution, une interaction existe entre l'hème et l'hémopexine. Le spectre de la solution après réduction présente une bande négative assez intense, localisée à 435 nm, qui n'avait pas été observée sur la solution d'hème hémopexine initiale (Figure 3, page 85). Par contre, après réoxydation, l'allure du spectre obtenu est la même que celle de la figure 3, page 85 caractérisant la solution d'hème-hémopexine réoxydée après réduction, mais les signaux dichroïques sont plus intenses.

3.3 - Comparaison des spectres dichroïques

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, les spectres dichroïques correspondant à l'hème hémopexine et à l'hème hémopexine à qui de l'hème libre a été ajouté ne sont pas superposables (Figures 3 et 4, pages 85 et 87). Ceci montre, que l'hème, dès qu'il est mis en présence d'hémopexine, interagit avec elle. Pour comprendre mieux cette interaction, il est intéressant de comparer les spectres dichroïques de l'hème hémopexine soit seule, soit en présence d'hème libre, aussi bien après la réduction qu'après



	λ_{max} (nm)	$[\theta]_{\text{max}}$ (deg.cm ² .dM ⁻¹)
Solution de départ	415	+ 3 800
	430	- 1 900
Solution "réduite"	435	- 5 200
Solution "réoxydée"	405	- 2 700
	420	+ 3 500

FIGURE 4. Spectres dichroïques de l'hème-hémopexine humaine additionnée d'hème libre.

L'hème libre interagit spécifiquement avec l'hème-hémopexine dans les 3 conditions : au départ, après réduction, et après réoxydation.

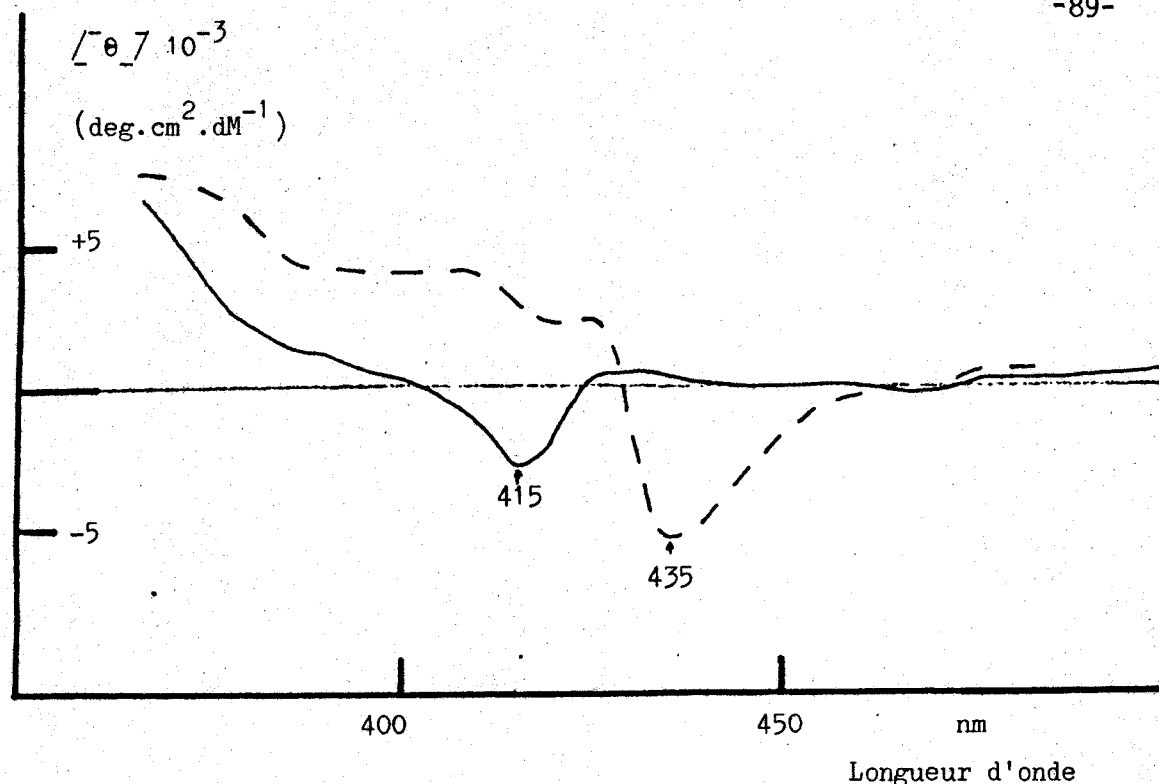


la réoxydation. Les effets sur le spectre dichroïque de la réduction sur l'hémopexine de départ et sur l'hémopexine de départ additionnée d'hème sont analysés à partir de deux spectres des Figures 3 et 4, pages 85 et 87, qui ont été retracés sur la Figure 5 page 89. Les deux courbes présentent une bande négative centrée respectivement à 415 et 435 nm avec des ellipticités de $[\theta]_{415} = -2700 \text{ deg. cm}^2 \text{ dM}^{-1}$ et de $[\theta]_{435} = -5200 \text{ deg. cm}^2 \text{ dM}^{-1}$.

Lors de la réoxydation, le signal à 415 nm, obtenu à partir d'une solution d'hème hémopexine, disparaîtra totalement et le spectre obtenu sera tout à fait comparable à celui du matériel de départ, la légère diminution d'intensité de la bande pouvant probablement être attribuée à une légère destruction de l'hème. Par contre, lors de la réoxydation de la solution d'hème hémopexine à qui de l'hème libre a été ajouté, on ne retrouve pas le signal dichroïque de la solution de départ, mais celui d'une solution d'hème hémopexine. Le fait que l'intensité soit légèrement plus grande que celle de l'hème hémopexine seule pourrait faire penser qu'une petite quantité d'hème libre s'est liée à l'hémopexine (Voir figure 7, page 92). Il est donc intéressant de considérer quels sont les effets de l'addition d'hème libre en deux étapes, l'une avant réduction-réoxydation, l'autre après réduction-réoxydation.

Ces résultats sont présentés Figure 6, page 91.

On constate que, lorsque l'hème est ajouté après une réduction suivie de réoxydation, le spectre qui est alors obtenu est tout à fait semblable à celui qui est obtenu à partir d'une



————— hème-hémopexine réduite
 - - - - - hème-hémopexine + hème libre réduits

FIGURE 5. Spectres dichroïques.

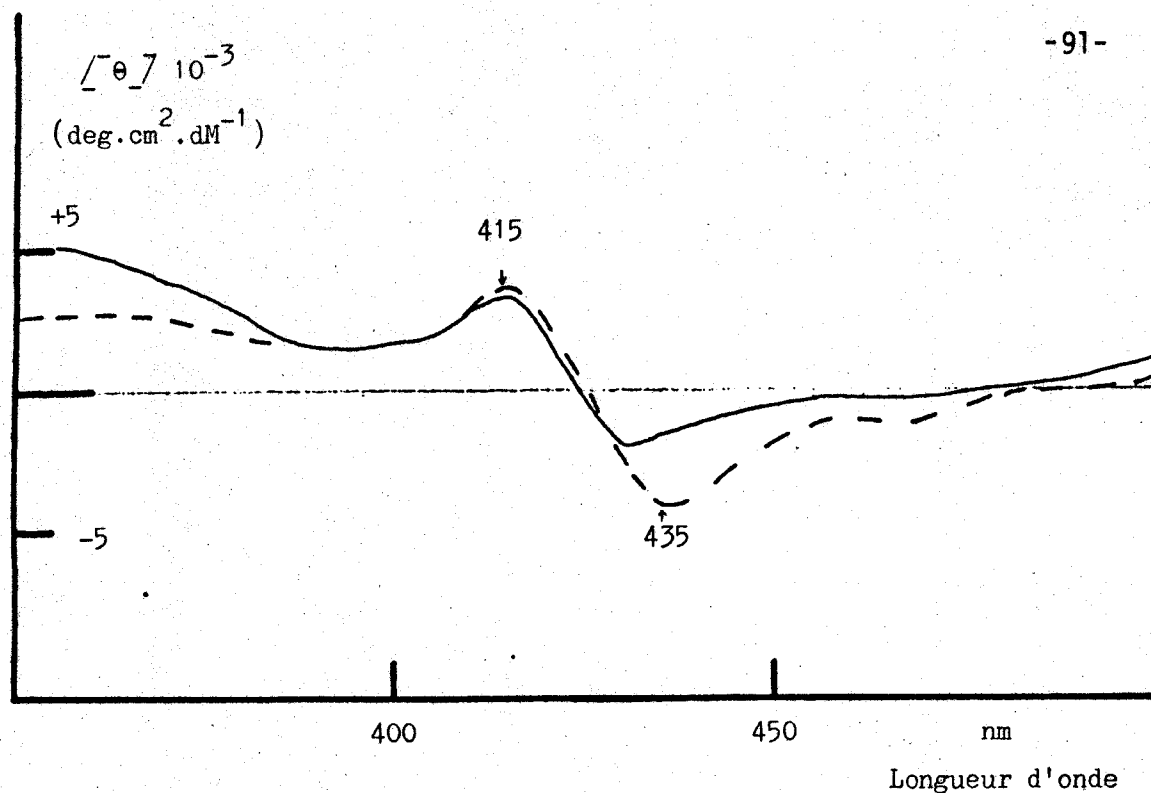
La comparaison des formes réduites d'hème-hémopexine sans addition d'hème libre et avec addition d'hème libre montre l'apparition d'un nouveau signal d'interaction de l'hémopexine avec l'hème.

solution hème hémopexine-hème libre après réduction. Il semblerait donc que la réduction suivie de réoxydation n'altère pas les propriétés de fixation de l'hème à l'hémopexine comme le prouve l'existence de la bande à 435 nm.

Ce signal caractérise donc l'addition d'hème libre. Il disparaît par réduction-réoxydation. Les autres signaux ne sont pas modifiés. C'est ce que l'on constate sur la figure 7 où l'on a indiqué ce que l'on obtenait lorsqu'une addition d'hème libre était suivie d'une réduction-oxydation. L'allure du spectre est tout à fait identique à celle d'une solution d'hème hémopexine ; seule l'ellipticité négative centrée à 405 nm est légèrement plus importante.

4 - DISCUSSION

Les variations d'ellipticité $\delta [\theta]$ que nous observons dans le spectre dichroïque de l'hème hémopexine humaine sont identiques à celles qu'ont observées KODICEK et al. (1977) (116). Dans les travaux de ces auteurs, la constance du signal dichroïque de l'hème hémopexine à pH 11,3 suppose une stabilisation de l'hème hémopexine par l'hème. L'observation que nous faisons des travaux de ces auteurs est à rapprocher d'un protocole de préparation de l'hème-hémopexine humaine, publiée par ce même groupe (HRKAL et al.) (1972) (117). L'addition d'hème était effectuée au cours du protocole de fractionnement du sérum humain. La dernière étape de purification était constituée par une chromatographie d'échange



————— hème-hémopexine + hème libre
 - - - - - hème-hémopexine réduite puis réoxydée avant l'addition d'hème libre: la réduction a été suivie d'une réoxydation puis de l'addition d'hème libre.

FIGURE 6. Spectres dichroïques des formes d'hème-hémopexine oxydées.

La réduction-réoxydation n'altère pas la propriété de l'hémopexine d'interagir avec l'hème.

Le signal d'ellipticité négative centré sur 435 nm environ caractérise l'addition d'hème libre.



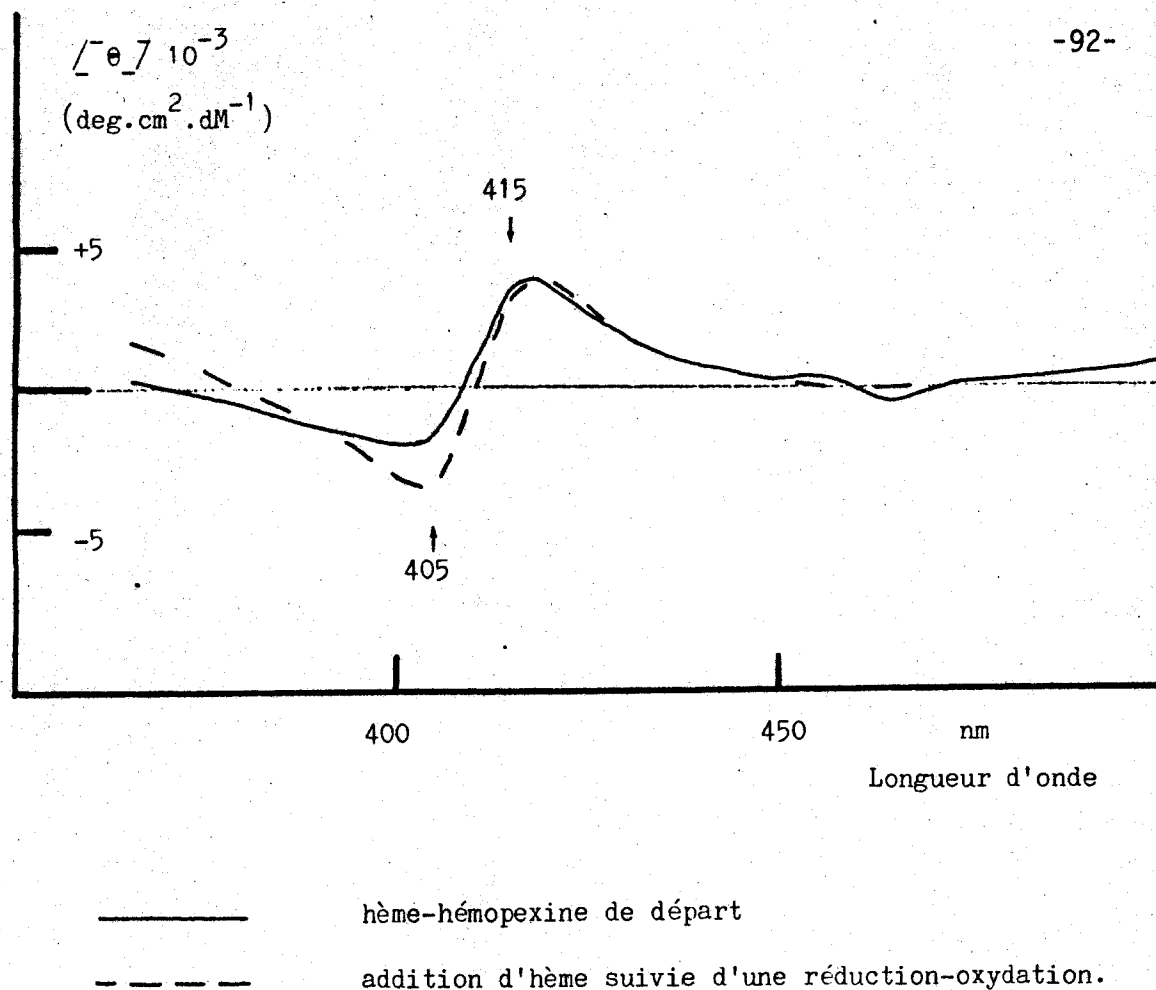


FIGURE 7. Spectres dichroïques montrant l'effet de la réduction-réoxydation sur la capture de l'hème.

L'ellipticité négative centrée sur 405 nm est amplifiée par l'addition d'hème libre suivie d'une réduction-réoxydation.

d'ion par élution sur DE 11 cellulose. L'hème hémopexine se séparait alors relativement bien de la transferrine.

Si l'on poursuit l'examen des spectres présentés dans cette étude, et en dépit de la simplicité du modèle expérimental, on ne peut exclure "a priori" l'hypothèse d'une coexistence de plusieurs phénomènes, c'est-à-dire :

- la production de bilirubine, après addition d'hème sans réduction. On sera amené à dire, un peu plus loin, que la bilirubine ne s'est pas formée dans nos conditions d'étude.

- la coupure oxydative de l'hème à la suite de la réduction-réoxydation qui peut conduire à la bilirubine (voir Chapitre IV).

- le passage de l'hème d'un site de liaison externe de faible affinité sur la molécule à un site de liaison interne de forte affinité, comme nous l'avons suggéré dans le chapitre II, en conclusion de notre article (PLANCKE et al.) (1977) (118).

4.1 - Hypothèse concernant la nature du chromophore responsable de l'ellipticité négative à 435 nm

Nous avons vu que si l'on ajoute de l'hème libre à une solution d'hème hémopexine, la réduction au dithionite s'accompagne de l'apparition d'une bande dichroïque négative centrée vers 435 nm. Nous allons essayer de déterminer l'origine de cette bande.

Rappelons que l'étude que nous venons de décrire nous a permis de mettre en évidence les bandes dichroïques suivantes,

toutes trois d'ellipticité négative :

- une à 405 nm, caractéristique de la ferri-hémehémopexine ;
- une à 415 nm, caractéristique de la ferro-hémehémopexine ;
- une à 435 nm, dont nous allons discuter l'origine.

Enfin, une quatrième bande, positive cette fois, centrée à 415 nm environ, est aussi caractéristique de la ferri-hémehémopexine.

Il n'est pas impossible de penser que la bande à 435 nm pourrait être due à de la bilirubine : malheureusement, si les spectres d'absorption permettent de distinguer l'état d'oxydation du fer (ferri-hémehémopexine ou ferro-hémehémopexine), ils ne permettent pas de mettre en évidence le complexe bilirubine-hémopexine : en effet, la bilirubine, qui coexisterait alors avec l'hème, échapperait à l'observation dans les spectres d'absorption, du fait de son faible coefficient d'extinction : il est en effet 2,5 fois plus faible que celui de l'hème. De plus, les maxima d'absorption ont des longueurs d'onde voisines. En effet, MORGAN et al. (1978) (119) ont déterminé que le maximum d'absorption du complexe bilirubine-hémopexine est situé à 420 nm environ, alors que le maximum d'absorption est à 418 nm pour l'hème hémopexine réduite et à 407 nm pour la ferri-hémehémopexine.

Il semble donc difficile d'admettre qu'un chromophore dont le maximum d'absorption est situé à 420 nm environ donne une bande dichroïque localisée à 435 nm. En effet, bandes d'absorption et bandes dichroïques sont, dans le cas présent, centrées pratiquement aux mêmes longueurs d'onde (418 et 415 nm pour l'hème hémopexine réduite, 407 et 405 nm pour la ferri-hémehémopexine).

De plus, il est tout à fait logique de penser que les interactions éventuelles bilirubine-hémopexine seraient de la même

nature que les interactions hème hémopexine : dans les deux cas il s'agit d'interactions entre les résidus aromatiques de la protéine et des noyaux pyrroles à double liaisons conjuguées. La bande dichroïque d'une interaction bilirubine-hémopexine devrait donc, si elle existe, se trouver près de 420 nm. Ce qui n'est pas le cas ici. Malgré ces arguments, il faut noter que dans la littérature, ces observations n'ont jamais été faites et nous tenons donc pour hautement improbable le fait que l'addition d'hème provoque d'emblée la formation de bilirubine sans réduction préalable.

4.2 - Coupure oxydative

D'après nos résultats, il semble bien que la réduction soit une condition nécessaire à la fixation de l'hème par l'hémopexine : en effet, l'épaulement correspondant à l'hème libre sur le spectre d'absorption (Figure 2, page 83) disparaît lors de la réoxydation. C'est l'attaque par l'oxygène de la forme réduite qui provoque ce que nous avons appelé le clivage oxydatif de l'hème au cours de la réoxydation, dans le chapitre I. Cette attaque se fait facilement et elle intervient déjà dans la cuve du dichrographe elle-même, uniquement grâce à l'oxygène dissous. De plus, nos résultats font apparaître la nécessité de contrôler la teneur globale en hème de la préparation d'hème hémopexine, puisque d'une part, l'étape de réduction provoque une meilleure fixation de l'hème, et que d'autre part, la ferro-hémehémopexine devient susceptible de subir le clivage oxydatif. Or, ce contrôle global de la teneur en hème ne semble pas avoir été effectué dans les expériences de HRKAL et al.

(1974) (120), concernant le transfert de l'hème à partir de la ferri-hémoglobine vers l'hémopexine. Ce que les auteurs ont alors attribué à la haute affinité apparente de l'hémopexine pour l'hème pourrait très bien n'être que le résultat d'une dégradation de l'hème par l'hémopexine elle-même. Cela pourrait expliquer le fait que BERNARD et LOMBARD (1978) (121) n'ont pu reproduire les expériences de HRKAL et al. (1974) (122) qu'en présence d'un agent réducteur : le mercaptoéthanol, puisque le clivage oxydatif peut intervenir même si une faible fraction de l'hémopexine passe sous la forme ferro-hémehémopexine. De plus, la durée globale de ces expériences est de 96 heures, ce qui est relativement long puisque, comme nous l'avons rapporté au Chapitre III, MORGAN et MULLER-EBERHARD (1972) (123) ont observé que déjà au bout de 48 heures, l'intensité de la bande de Soret diminue, si l'on conserve l'hémopexine de lapin en présence d'hème, de mésohème ou de deutérohème et de dithionite à 0,006 p. 100 à 4°C.

Dans notre étude, comme dans celle de MORGAN et al. (1976a)(124), les spectres montrent que si la réduction favorise la fixation, la réoxydation s'accompagne d'une diminution de l'intensité de la bande de Soret. C'est à cette diminution de la bande de Soret, donc de la concentration en hème, que peut être attribué le fait que le pic à 415 nm obtenu sur l'hémopexine de départ diminue lors de la coupure oxydative (Figure 3, page 85) Par contre, il est plus difficile d'interpréter le fait que son signe soit inversé.

4.3 - Liaison de l'hème réduit ou ferro-hème

Nous avons remarqué précédemment que la bande dichroïque correspondant à l'hémopexine oxydée, bande négative centrée à 405 nm environ, n'est pas altérée par la réduction-réoxydation (Figures 3 et 4, pages 85 et 87). De plus, elle augmente légèrement lors de la réoxydation si de l'hème libre a été ajouté au milieu (Figures 4 et 7, pages 87 et 92). D'autre part, la bande dichroïque positive de l'hémopexine de départ, centrée sur 415 nm environ (Figure 3, page 85) disparaît lors de la réduction alors qu'apparaît une bande centrée aussi à 415 nm, de même intensité que la précédente, mais de signe opposé.

Peut-être n'est-il pas inutile de rappeler ici les différences d'informations que donnent les spectres d'absorption et les spectres dichroïques : alors que les premiers renseignent uniquement sur la quantité de chromophore présent, les seconds ne peuvent être obtenus que si ces mêmes chromophores, qui dans le cas présent sont symétriques, sont perturbés de façon dissymétrique. Autrement dit, si l'on observe ici des spectres d'absorption d'intensité variable, mais des signaux dichroïques d'amplitude constante, c'est que, dans la limite des concentrations en hème utilisées, seule une fraction de la quantité d'hème est optiquement active, donc liée à la protéine, et cette fraction reste constante, même quand la concentration varie. En particulier, il n'est pas possible de distinguer à partir d'une mesure de densité optique, la contribution de l'hème libre de celle de l'hème lié à la

protéine ; par exemple, l'épaulement dû au ferri-hème libre est visible sur la ferri-hémehémopexine additionnée d'hème libre (Figure 2, page 83) et la bande d'absorption que l'on observe lors de l'addition d'hème libre, est due à la superposition de deux spectres : celui du ferri-hème libre et celui de la ferri-hème-hémopexine.

Dans le Chapitre II, en conclusion de notre article, nous avons déjà exposé la nécessité de trouver les conditions optimales d'incubation de l'hémopexine et de l'hème. Notre expérimentation présente fournit un élément de réponse par la réduction de la préparation d'hémopexine : l'hémopexine fixerait l'hème réduit ou ferro-hème.

Dans des expériences récentes, MORGAN et al. (1976a) (125) montrent que l'hémopexine ne peut d'emblée capter l'hème de la sérumalbumine, alors que DRABKIN (1971) (126), sur le sérum natif, avait montré que l'hémopexine (appelée alors "glycoglobulin hemochromogen") conduisait à une absence d'hème au niveau de la sérumalbumine si l'hème réduit était injecté. En ajoutant à l'hémopexine dans le sérum une quantité équimoléculaire d'hème réduit, cet auteur caractérisait uniquement la ferro-hémehémopexine, l'hème n'étant pas lié par la sérumalbumine.

Les études sur l'hémopexine et sur l'albumine isolées ne montrent pas "in vitro" la disparition de l'hème au niveau de l'albumine alors que DRABKIN (1971) (127) sur le sérum total ou après injection intraveineuse d'hème avait montré la disparition de

l'hème au niveau de la sérumalbumine.

En dichroïsme circulaire, MORGAN et al. (1978) (128) ont étudié l'hème-albumine. L'addition de bilirubine donne le spectre de la bilirubine-albumine. Cependant, l'addition d'hémopexine à l'hème albumine ne donne pas le spectre de l'hème hémopexine. Ce n'est qu'après 20 heures seulement, que le spectre montre un pic à 418 nm, attribuable à l'hème hémopexine.

"In vitro", les conditions de capture de l'hème sur l'albumine par l'hémopexine ne sont pas réalisées. Par dichroïsme circulaire, ces auteurs montrent que l'hémopexine fixe la bilirubine de façon équimoléculaire au même site de fixation que l'hème.

Dans une autre étude sur le transfert de l'hème de l'albumine vers l'hémopexine dans le sérum, la même équipe (MORGAN et al.) (1976 a) (129) a montré que l'hème lié à un site de haute affinité de l'albumine pour l'hème n'est transféré qu'après plusieurs heures, tandis que l'hème lié à des sites secondaires était plus rapidement transféré. De plus, ces auteurs montrent que le dithionite provoque une formation rapide du complexe ferre-hème-hémopexine dans le sérum. En présence de dithionite, le transfert de l'hème de l'albumine vers l'hémopexine, suivi au niveau des bandes de Soret, se fait de la même manière, que ce soit sur le sérum total ou sur une préparation d'albumine et d'hémopexine. Néanmoins DRABKIN (1971) (130), après injection intraveineuse d'hème chez le chien, conclut que l'hémopexine ne peut rendre compte à elle seule, du catabolisme de l'hème.



La nécessité d'une étape de réduction pour la fixation de l'hème sur l'hémopexine avec une efficacité comparable à celle des conditions physiologiques normales, pose le problème de la formation du complexe ferro-hème-hémopexine "in vivo".

Aucune expérimentation convaincante n'est actuellement disponible pour le résoudre.

On peut cependant noter que pour HRKAL et al. (1974) (131) l'hémopexine peut enlever l'hème à l'hémoglobine. Cet auteur a démontré que l'hème dans l'hémopexine est plus facilement oxydable que dans l'hémoglobine, l'hémopexine pourrait capter l'hème de l'hémoglobine avant son oxydation (HRKAL et al.) (1977) (132). La liaison de l'hème réduit est en effet plus aisée que la liaison de l'hème oxydé.

4.4. - Eventualité d'un deuxième site d'interaction de l'hémopexine avec l'hème

Nous avons vu que dans certaines conditions, l'addition d'hème libre provoque un signal d'ellipticité négative centrée vers 435 nm (Figure 4, page 87). Ce signal n'est pas modifié par la réduction (Figure 5, page 89). De plus, un cycle de réduction-réoxydation ne supprime pas l'aptitude de l'hémopexine à donner ce signal après une deuxième addition d'hème (Figure 6, page 91). Par contre, il disparaît lors de la réoxydation (Figure 7, page 92). Cette bande négative, centrée vers 435 nm, n'est pas observée sur l'hème-hémopexine de départ. Ceci est vraisemblablement dû au fait que la

préparation que nous utilisons a déjà subi un cycle de réduction-réoxydation au cours du protocole de purification. Parallèlement à la disparition de la bande négative centrée vers 435 nm, la réoxydation s'accompagne d'une augmentation de la bande négative centrée vers 405 nm (Figure 7, page 92). On peut alors admettre que la réduction-réoxydation provoque un changement irréversible dans l'environnement peptidique du chromophore. Ce changement est visualisé par le passage d'une ellipticité négative centrée sur 405 nm lors de la réoxydation. Dans ce dernier environnement, l'hème serait fortement solvato par la protéine. Ceci rendrait compte de la forte affinité pour l'hème de l'hémopexine, qui est la propriété caractéristique de l'hémopexine, soulignée depuis plusieurs années par différents auteurs.

L'ellipticité négative centrée sur 405 nm est présente dans l'hémopexine de départ (Figure 3, page 85). Elle disparaît transitoirement lors de la réduction (Figure 5), mais augmente si de l'hème libre est ajouté et qu'ensuite on réalise un cycle de réduction-réoxydation (Figures 4 et 7, pages 87 et 92).

L'ellipticité négative centrée sur 435 nm, qui intervient après la seule addition d'hème et qui disparaît lors de la réoxydation, pourrait s'expliquer par l'existence d'un deuxième type d'interaction de l'hémopexine avec l'hème. La liaison entre l'hème et l'hémopexine se ferait alors avec une affinité beaucoup moins grande que celle qui existe entre l'hème et l'hémopexine de départ. Une telle hypothèse permettrait d'expliquer un fait expérimental mentionné par MORGAN et al. (1976a)(133) : l'incapacité,

pour l'hémopexine de capter l'hème de l'albumine.

On peut penser qu'en effet, dans le site de faible affinité, l'hémopexine ne peut capter l'hème de l'albumine. En revanche, une réduction permet de retrouver une albumine sans hème, puisque, comme nous venons de la voir la réduction est nécessaire à la liaison par l'hémopexine de l'hème, au niveau de son site à haute affinité.

Ainsi, la destruction de l'hème par le dithionite serait une observation expérimentale, inséparable de la réduction. Seul l'hème réduit aurait accès au site de plus forte affinité de la molécule.

Puisque selon les travaux de HAYEM-LEVY et HAVEZ (1973) (134) on sait que deux histidines sont impliqués dans la liaison de l'hème par l'hémopexine, on peut penser que la réduction serait nécessaire pour assurer la liaison donneur-accepteur des doublets de l'azote imidazolique de l'histidine et du fer hémique. Il y aurait perte d'un électron sur une orbitale externe du fer et la libération d'une case quantique pour le doublet de l'azote, ce qui permettrait au fer d'acquérir une structure de gaz rare en complétant sa couche électronique externe.

Autrement dit, la réduction entraîne l'hème à son site de haute affinité pour l'hémopexine et il est tout à fait normal de penser que l'environnement peptidique n'est pas le même pour les deux sites d'affinité différente.

L'origine de la bande négative centrée vers 435 nm serait donc due à l'addition d'hème libre à l'hémopexine sur un site de

faible affinité. Comme elle n'est pas sensible à la réduction, on peut supposer qu'elle est due uniquement à une perturbation dans la symétrie de l'hème, apportée par son interaction avec certains résidus aromatiques de la protéine. Ce site de faible affinité semble être constitué au moins partiellement par des résidus aromatiques de l'hémopexine.

La réduction suivie de la réoxydation provoque une augmentation du signal d'ellipticité négative centrée sur 405 nm. Ceci semble traduire un passage de l'hème du site externe vers le site interne.

Par des arguments immunologiques exposés dans le chapitre II, en discussion de notre article (PLANCKE et al.) (1977) (135), nous avons été amené à envisager de la même manière, l'existence de ces deux types d'interaction de l'hémopexine avec l'hème.

CONCLUSION

Après avoir exposé dans le Chapitre IV, les effets de la réduction chimique de l'hème hémopexine dans le sérum hémolysé, nous avons exposé, dans ce Chapitre V, les effets de cette réduction chimique sur l'hème hémopexine purifiée obtenue par le protocole décrit dans le Chapitre III.

Par addition d'hème libre, nous avons caractérisé sur les spectres dichroïques de l'hème hémopexine humaine une nouvelle bande dichroïque, centrée à 435 nm environ.

La réduction-réoxydation est inséparable d'un clivage oxydatif de l'hème, mais elle est nécessaire pour retrouver la forme du spectre dichroïque de l'hème hémopexine de départ, obtenu avant

l'addition d'hème libre,

En rejoignant les conclusions rapportées dans le Chapitre II, l'observation des spectres suggère que l'hémopexine fixe l'hème réduit ou ferrohème à un site de liaison externe dans la molécule où seuls des résidus aromatiques de la protéine sont concernés, et que la réoxydation entraîne l'hème vers un site de haute affinité à l'intérieur de la molécule où des résidus d'histidine interviendraient aussi pour réaliser la forte liaison de l'hème qui caractérise l'hémopexine.

CONCLUSION GENERALE

Le premier chapitre, d'introduction bibliographique, concerne l'hémopexine et la coupure oxydative de l'hème.

Dans le Chapitre II, un antisérum a été produit contre une fraction d'hémopexine humaine hautement purifiée. Il permet en retour une analyse de l'hémopexine dans le sérum humain total, natif, selon une technique d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle. L'hémopexine se présente alors sous trois formes :

- L'apo-hémopexine
- L'hème-hémopexine
- Les polymères d'hémopexine

Un changement de point isoélectrique de l'hémopexine lors de sa liaison à l'hème est démontré.

Nos résultats apportent des éléments importants pour améliorer les procédés de préparation existant dans la littérature : lorsqu'ils sont basés sur le tamisage moléculaire ils perdent les polymères ; lorsqu'ils sont basés sur l'échange d'ion, ils perdent soit l'apo-hémopexine, soit l'hème-hémopexine. De plus nos résultats confirment les données physico-chimiques actuellement disponibles et nous permettent d'envisager l'hypothèse de deux sites d'interaction de l'hémopexine.

Dans le Chapitre III, nous avons soumis le sérum humain à une étape unique de chromatographie de déplacement et d'échange de ligand. La chromatographie de déplacement élimine la sérumalbumine et une partie des immunoglobulines. L'échange de ligand procure une fraction enrichie en hème hémopexine. Une préparation originale et non dénaturante de l'hème hémopexine est proposée.

Le comportement chromatographique de l'hémopexine correspond bien à sa mobilité électrophorétique en ce qui concerne le changement de son point isoélectrique lors de sa liaison à l'hème.

Dans le Chapitre IV, un clivage oxydatif de l'hème est provoqué au cours de la chromatographie de déplacement, réalisée sur un sérum hémolysé. Il est accompagné d'un retour de l'hémopexine à la configuration apo-hémopexine. La bilirubine est produite puis captée par la sérumalbumine.

Dans ce modèle expérimental, l'hémopexine catalyse la dégradation de l'hème. Elle lie le produit de la réaction de dégradation de l'hème, la bilirubine, en excluant la liaison d'une nouvelle molécule d'hème. Lorsque l'albumine est présente, elle fixe la bilirubine produite en libérant l'hémopexine pour la liaison d'une nouvelle molécule d'hème.

Les études spectroscopiques rapportées dans le Chapitre V confirment les données de la littérature. Des chromophores correspondant à l'hème hémopexine réduite (ferrohème-hémopexine) sont identifiés. Un troisième chromophore résultant de l'addition de l'hème est identifié. Ces études suggèrent, elles aussi, deux sites d'interaction de l'hémopexine avec l'hème, comme les études immunologiques rapportées dans le Chapitre II.

La discussion de ces résultats envisage, d'un point de vue global, l'état actuel de nos connaissances sur l'hémopexine et ses interactions avec l'hème.

BIBLIOGRAPHIE

AISEN, P., LEIBMAN, A. et HARRIS, D.C. (1974)

Human hemopexin, preparation and magnetic properties
J. Biol. Chem., 249, 6824-6827. (38) (67) (78) (80)

ALLISON, A.C. et REES, W.A.P. (1957)

The binding of haemoglobin by plasma proteins (haptoglobins)
Brit. Med. J., 2, 1137-1143 (6)

ANAN, F.K. et MASON, H.S. (1961)

An ^{18}O study of the hemoglobin degradation to biliverdin in the
model reaction
J. Biochem. (Tokyo) 49, 765-767. (56)

BERNARD, N., LOMBARD, C. et JAYLE, M.F. (1976)

Nouvelle méthode de préparation de l'hémopexine de rat.
Biochimie, 58, 1429-1431 (77)

BERNARD, N. et LOMBARD, C. (1978)

Modifications des propriétés de l'hémopexine après fixation de
l'hème
Communication orale. Forum des Jeunes de la Société de Chimie
Biologique - Villeneuve d'Ascq (121)

BISERTE, G., HAVEZ, R., HAYEM-LEVY, A. et LATURAZE, J. (1960~~a~~)

Isolation of seromucin β_1 (β_{1A} -globulin). Ability to bind to
chromoprotein
C.R. Acad. Sci., 250, 418-420. (35) (75)

BISERTE, G., HAVEZ, R., LATURAZE, J. et HAYEM-LEVY, A. (1960~~b~~)

Séparation chromatographique sur DEAE-cellulose de quelques
séromucoïdes (orosomucoïde, α_1 -glycoprotéine 3,5 S, haptoglobine,
et séromucoïde β_1)
C.R. Soc. Biol., 11, 2067-2071 (8)

BRAUN, H.J. (1971)

Eigenschaften, funktion und serumkonzentration des menschlichen hämopexins

Klin. Wochenschr., 49, 445-451 (21)(24)

BROWN, S.B. et LANTZKE, I.R. (1969)

Solution structure of ferrihaem in some dipolar aprotic solvents.

Biochem. J., 115, 279-285 (114)

BROWN, S.B. et THOMAS, S.E. (1978)

The mechanism of haem degradation "in vitro". Kinetic evidence for the formation of a haem-oxygen complex

Biochem. J., 178, 327-330. (64)

CONWAY, T.P., MORGAN, W.T., LIEM, H.H. et MULLER-EBERHARD, U. (1975)

Catabolism of photooxidized and desialylated hemopexin in the rabbit

J. Biol. Chem., 250, 3067-3073 (18)

DAVIES, M.D., SMITH, A., MULLER-EBERHARD, U. et MORGAN, W.T. (1979)

Hepatic subcellular metabolism of heme from heme-hemopexin : incorporation of iron into ferritin

Biochem. Biophys. Res. Comm., 91, 1504-1511. (100)

DRABKIN, D.L. (1971)

Heme binding and transport - A spectrophotometric study of plasma glycoglobulin hemochromogens

Proc. Nat. Acad. Sc., 68, 609-613(48)(50)(103) (104) (126) (127) (130)

FAIRLEY, N.H. (1938)

Methaemalbumin (Pseudo-methaemoglobin)

Nature, 142, 1156-1157 (1)

FISCHER, H. et ORTH, H. (1937, 1940)

Die Chemie des Pyrrols, vol. II, part. 1 et 2 - Akademische

Verlagsgesellschaft, Leipzig (1937, 1940) (55)

- FOUCRIER, J., KRAEMER, M., VASSY, J. et CHALUMEAU, M.T. (1979)
Demonstration of the simultaneous presence of transferrin,
hemopexin and albumin in the same adult rat hepatocyte
Cell Differentiation, 8, 39-48 (16)
- GRAY, C.H., MUIR, I.M.H. et NEUBERGER, A. (1950)
Studies in congenital porphyria. 3. The incorporation of ^{15}N into
the haem and glycine of haemoglobin
Biochem. J., 47, 542-548 (58)
- GRAY, C.H., NICHOLSON, D.C. and TIPTON, G. (1972)
Degradation of haem compound to bile pigments
Nature, 239, 5-8 (105)
- HAVEZ, R., HAYEM-LEVY, A., BONTE, M. et BISERTE, G. (1967)
Etude du séromucoïde β_1 (hémopexine) isolé du sérum humain
C.R. Acad. Sci., 265, 520-523 (25)
- HAYEM-LEVY, A. et HAVEZ, R. (1973)
Isolément et étude de l'hémopexine humaine
Clin. Chim. Acta, 47, 113-122 (28)(30)(36)(39)(47)(65)(66)(70)(73)
(79)(108)(134)
- HEIDE, K., HAUPT, H., STORIKO, K. et SCHULTZE, H.E. (1964)
On the heme-binding capacity of hemopexin
Clin. Chim. Acta, 10, 460-469 (33)
- HEILMEYER, L. (1933)
Medizinische Spektrophotometrie
F. Fischer, Jena, Germany (2)
- HEIMBURGER, N., HEIDE, K., HAUPT, H. et SCHULTZE, H.E. (1964)
Building stones of human serum proteins
Clin. Chim. Acta, 10, 293-307 (26)
- HERSHKO, C. (1975)
Annotation. The fate of circulating haemoglobin
Brit. J. Haemat., 29, 199-204 (14)
- HRKAL, Z. et MULLER-EBERHARD, U. (1971)
Partial characterization of the heme-binding serum glycoproteins
rabbit and human hemopexin
Biochemistry, 10, 1746-1750 (27)(31)

- HRKAL, Z., SUTTNAR, J. et VODRAZKA, Z. (1977)
Redox potential of human serum haemopexin
Stud. Biophys., 63, 55-58 (81) (88) (101) (132)
- HRKAL, Z., VODRAZKA, Z. et REJNKOVA, J. (1972)
Purification of human serum hemopexin by chromatography on
DEAE-cellulose
J. Chromatogr., 72, 198-201 (68) (117)
- HRKAL, Z., VODRAZKA, Z. et KALOUSEK, I. (1974)
Transfer of heme from ferrihemoglobin and ferrihemoglobin isolated
chains to hemopexin
Eur. J. Biochem., 43, 73-78 (34) (72) (76) (87) (96) (102) (120)
(122) (131)
- HSU, M.C. et WOODY, R.W. (1971)
The origin of the heme Cotton effects in myoglobin and hemoglobin
J. Amer. Chem. Soc., 93, 3515-3525 (41) (42) (107)
- JACOBSEN, J. (1969)
Binding of bilirubin to human serum albumin-determination of the
dissociation constants
FEBS Letters, 5, 112-114 (5)
- KODICEK, M., HRKAL, Z. et VODRAZKA, Z. (1977)
On the molecular conformation of human haemopexin. II. Analysis
of circular dichroic spectra
Biochim. Biophys. Acta, 495, 268-278 (40) (43) (109) (115) (116)
- KOSAKI, T., IKEDA, T., KOTANI, Y. (1957)
The affinities of cells and their formative elements for porphyrin
bodies XII. The affinity of cells and their formative elements for
coproporphyrin I and III
Mie Med. J., 7, 305-312 (9)

- KOSKELO, P., BERGRAHM, B. et TOIVONEN, I. (1971)
Observations on the binding of ^{14}C -labelled porphyrins by human plasma proteins
South Afr. Med. J. (special issue), 45, 167-169. (11)
- LEMBERG, R. (1935)
Transformation of hemins into bile pigments
Biochem. J., 29, 1322-1336 (57)
- LEMBERG, R. et LEGGE, J.W. (1949)
in "Hematin Compounds and bile pigments", Interscience Publishers Inc., New-York. (59)
- LIEM, H.H. (1974)
Hepatic uptake of heme and hemopexin but not albumin
Biochim. Biophys. Acta, 343, 546-550 (15)
- LIEM, H.H., SPECTOR, J.I., CONWAY, T.P., MORGAN, W.T. et MULLER-EBERHARD, U. (1975)
Effect of hemoglobin and hematin on plasma clearance of hemopexin, photo-inactivated hemopexin and albumin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 148, 519-522 (19)
- LUDWIG, G.D., BLAKEMORE, W.S. et DRABKIN, D.L. (1957)
Production of carbon monoxide and bile pigment by hemin oxidation.
Biochem. J., 66, 38P (55)
- MORGAN, W.T. (1976)
The binding and transport of heme by hemopexin
Ann. Clin. Res., 8, suppl. 17, 223-232. (85)
- MORGAN, W.T. et MULLER-EBERHARD, U. (1972)
Interactions of porphyrins with rabbit hemopexin
J. Biol. Chem., 247, 7181-7187 (44) (89) (111) (123)
- MORGAN, W.T. et MULLER-EBERHARD, U. (1974)
Modification of tryptophan residues in rabbit hemopexin by N-bromosuccinimide
Enzyme (Basel) 17, 108-115. (45) (110)

- MORGAN, W.T., LIEM, H.H., SUTOR, R.P. et MULLER-EBERHARD, U. (1976a)
Transfer of heme from heme-albumin to hemopexin
Biochim. Biophys. Acta, 444, 435-445 (124) (125) (129) (133)
- MORGAN, W.T., SUTOR, R.P. et MULLER-EBERHARD, U. (1976b)
The aromatic and heme chromophores of rabbit hemopexin. Difference
absorption and fluorescence spectra
Biochim. Biophys. Acta, 434, 311-323. (71) (74) (106)
- MORGAN, W.T. (1978)
Human serum histidine-rich glycoprotein. I. Interaction with heme,
metal ions and organic ligands
Biochim. Biophys. Acta, 533, 319-333 (12)
- MORGAN, W.T., MULLER-EBERHARD, U. et LAMOLA, A.A. (1978)
Interaction of rabbit hemopexin with bilirubin
Biochim. Biophys. Acta, 532, 57-64 (97) (119) (128)
- MULLER-EBERHARD, U., BOSMAN, C. et LIEM, H.H. (1970)
Tissue localization of the heme-hemopexin complex in the rabbit
and the rat as studied by light microscopy with the use of radioiso-
topes
J. Lab. Clin. Med., 76, 426-431 (17)
- MULLER-EBERHARD, U. et LIEM, H.H. (1974)
Hemopexin, the heme-binding serum-glycoprotein.
in "Plasma Proteins, vol. 1A, C. Allison, Ed., 35-53 - Plenum Press
London (England) (23)
- MULLER-EBERHARD, U. et MORGAN, W.T. (1975)
Porphyrin-binding proteins in serum
N.Y. Acad. Sci., 244, 624-650 (20)
- NAKAJIMA, O. et GRAY, C.H. (1967)
Studies on haem α -methenyl oxygenase
Isomeric structure of formylbiliverdine, a possible precursor of
biliverdin
Biochem. J., 104, 20-22 (61)

NEALE, F.C., ABER, G.M. et NORTHAM, B.E. (1958)

The demonstration of intravascular haemolysis by means of serum paper electrophoresis and a modification of Schumm's reaction
J. Clin. Path., 11, 206-219. (7)

O'CARRA, P. et COLLERAN, E. (1969)

Haem catabolism and coupled oxidation of haemproteins
FEBS Letters, 5, 295-298 (63) (91)

PETERS, T., Jr (1970)

Serum albumin
Adv. Clin. Chem., 13, 37-111 (3)

PLANCKE, Y., DAUTREVAUX, M. et BISERTE, G. (1977)

Change of hemopexin isoelectric point upon heme binding
FEBS Letters, 78, 291-294 (83) (118) (135)

PLANCKE, Y., DAUTREVAUX, M. et BISERTE, G. (1978)

Human serum hemopexin : direct evidence for change of its isoelectric point upon heme binding. A new serum protein fractionation
Biochimie, 60, 171-175 (84) (94) (95) (112)

ROTH, M. (1967)

Dosage fluorimétrique de la bilirubine
Clin. Chim. Acta, 17, 487-492 (92) (93)

SCHMID, R. et McDONAGH, A.F. (1975)

The enzymatic formation of bilirubin
Ann. N.Y. Acad. Sci., 244, 533-552 (90)

SCHULTZE, H.E., HEIDE, K. et HAUPT, H. (1961)

Charakterisierung von hochgereinigtem hämopexin.
Naturwissenschaften, 22, 1-3 (32)

SCHULTZE, H.E., et HEREMANS, J.F. (1966)

Molecular biology of human proteins. Vol. 1 : Nature and metabolism of extracellular proteins - Elsevier Publishing Co, New-York, N.Y. (22)

SEERY, V.L., HATHAWAY, G. et MULLER-EBERHARD, U. (1972)

Hemopexin of human and rabbit : molecular weight and extinction coefficient

Arch. Biochem. Biophys., 150, 269-272 (29) (113)

SEERY, V.L., MORGAN, W.T. et MULLER-EBERHARD, U. (1975)

Interaction of rabbit hemopexin with rose bengal and photooxidation of the rose bengal - hemopexin complex

J. Biol. Chem., 250, 6439-6444 (46)

SJOSTRAND, T. (1970)

Early studies of carbon monoxide production

Ann. N.Y. Acad. Sci., 174, 5-10 (54)

SJOSTRAND, T. (1952)

Formation of carbon monoxide by in vitro decomposition of hemoglobin in bile pigments

Acta Physiol. Scand., 26, 328-333 (53)

SJOSTRAND, T. (1951)

Formation and disposal of carbon monoxide in blood

Nature, 168, 729-730 (52)

SMITH, A. et MORGAN, W.T. (1978)

Transport of heme by hemopexin to the liver : evidence for receptor-mediated uptake

Biochem. Biophys. Res. Commun., 84, 151-157 (98)

SMITH, A. et MORGAN, W.T. (1979)

Haem transport to the liver by haemopexin

Receptor-mediated uptake with recycling of the protein.

Biochem. J., 182, 47-54 (51) (86) (99)

- SPECTOR, A.A., JOHN, K. et FLETCHER, J.E. (1969)
Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin
J. Lip. Res., 10, 56-67 (4)
- SUGITA, Y. (1962)
The role of particulate bound protoporphyrin in biosynthesis of heme
J. Biochem. (Japon) 51, 436-440 (10)
- SUTTAR, J., HRKAL, Z. et VODRAZKA, Z. (1977)
Affinity chromatography of serum haemopexin
J. Chromato., 131, 453-457 (69)
- TENHUNEN, R., MARVER, H.S. et SCHMID, R. (1969)
Microsomal heme oxygenase characterization of the enzyme
J. Biol. Chem., 344, 6388-6394 (49)
- TENHUNEN, R., MARVER, H., PIMSTONE, N.R., TRAGER, W.F., COOPER, D.Y.
et SCHMID, R. (1972)
Enzymatic degradation of heme. Oxygenative cleavage requiring
cytochrome P-450
Biochemistry, 11, 1716-1720 (62)
- TIPPING, E., KETTERER, B. et KOSKELO, P. (1978)
The binding of porphyrins by ligandin
Biochem. J., 169, 509-516 (13)
- VRETBLAD, P. et HJORTH, R. (1977)
The use of wheat-germ lectin-sepharose for the purification of
human haemopexin
Biochem. J., 167, 759-764 (82)
- WARBURG, O. et NEGELEIN, E. (1930)
Green hemin from blood hemin
Chem. Ber., 63, 1816-1822 (56)

WISE, C.D. et DRABKIN, D.L. (1965)

Enzymatic degradation of hemoglobin and hemin to biliverdin and carbon monoxide

Fed. Proc., 24, 222 (60)

WYMAN, Jr. (1939)

The heat of oxygenation of hemoglobin

J. Biol. Chem., 127, 581-599 (37)

