

BBA 12172

## ÉTUDE COMPARÉE DE L'ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE DE L'HÉMOGLOBINE, DE LA MÉTHÉMOGLOBINE ET DU COMPLEXE HÉMOGLOBINE-HAPTOGLOBINE

M. WAKS\*, J. YON, J. MORETTI ET M. F. JAYLE

*Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et  
Laboratoire de Biologie Physico-Chimique de la Faculté des Sciences,  
Paris (France)*

(Reçu le 18 juillet, 1962)

### SUMMARY

*Comparative study of peroxidase activity of hemoglobin, methemoglobin and hemoglobin-haptoglobin complex*

Kinetic studies of the peroxidase activity of hemoglobin and methemoglobin have been carried out with oxygenated water as oxidising substrate and with gallicol as electron donor. The values of kinetic constants have been determined and compared with those previously obtained for the hemoglobin-haptoglobin complex.

Contrary to what might be presumed, the  $K_m$  and  $k_s$  of the reaction catalysed by hemoglobin are not significantly different from those catalysed by the hemoglobin-haptoglobin complex. The character of the inhibition promoted by high concentrations of gallicol is, however, different in the two cases. An attempt is made to explain this difference in terms of structural changes of hemoglobin resulting from the haptoglobin fixation.

### INTRODUCTION

Les recherches initiales de POLONOVSKI ET JAYLE<sup>1,2</sup> ont montré qu'il existe dans le sérum une protéine: l'haptoglobine, susceptible de s'unir à l'hémoglobine. La formation du complexe Hb-Hp s'effectue dans des proportions bien définies<sup>3,4</sup>. D'autre part, le complexe ainsi formé présente une activité peroxydasique très différente de celle de l'Hb seule. En suivant la décomposition de l'hydroperoxyde d'éthyle en présence d'iodure de potassium les auteurs ont montré qu'il y a modification de la cinétique de la réaction<sup>5</sup>.

Plus récemment MORETTI ET YON<sup>6</sup> ont effectué l'étude cinétique de la réaction catalysée par le complexe, en présence de gallicol comme donneur d'électrons, d'après la technique décrite par CONNELL ET SMITHIES<sup>7</sup>. Utilisant deux substrats différents, l'eau oxygénée et l'hydroperoxyde d'éthyle, ces auteurs ont déterminé les constantes de la réaction en fonction de concentrations variables en enzyme, en sub-

Abréviations: Hb, hémoglobine; Hp, haptoglobine; Hb-Hp, complexe hémoglobine-haptoglobine; MetHb, méthémoglobine.

\* Attaché de Recherches à l'Institut National d'Hygiène.

strat et en donneur. De plus, ils ont confirmé l'action inhibitrice de fortes concentrations de gaïacol, souligné le rôle de l'haptoglobine comme activateur de l'hémoglobine et proposé un schéma pour la partie initiale de la réaction.

Dans le but d'obtenir quelques précisions sur le mécanisme de l'activation par l'haptoglobine, nous avons effectué l'étude cinétique de la réaction catalysée par l'hémoglobine ou par la méthémoglobine seules, qui ne présentent qu'une faible activité peroxydasique. Nous nous sommes placés dans les mêmes conditions que les auteurs précédents<sup>6</sup> en utilisant le gaïacol comme donneur d'électrons. La comparaison de l'activité enzymatique des hémoprotéines étudiées avec celle du complexe hémoglobine-haptoglobine, permet quelques suggestions sur le rôle activateur de l'haptoglobine.

#### TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Le seul substrat utilisé dans ce travail est l'eau oxygénée. Celle-ci est préparée toutes les 30 min, au cours de l'expérience à partir d'une solution 19 N type "Electro". La solution mère conservée à 3°, est retitrée toutes les trois semaines.

La solution de gaïacol est préparée comme il est dit précédemment<sup>6</sup>.

L'hémoglobine de cheval est obtenue de la manière suivante: après lavage à l'eau physiologique (NaCl 9%), les globules sont laqués par le toluène. Par centrifugation à 15 000 tours/min, on sépare le toluène et les stromas de l'Hb. L'ensemble des opérations s'effectue à 3°.

On transforme l'hémoglobine en méthémoglobine par addition de 25 mg de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]K_3$  pour 100 mg d'Hb. On laisse reposer quelques heures, puis on dialyse contre un tampon phosphate 0.01 M (pH 7.0). La pureté des produits obtenus est vérifiée par électrophorèse sur gel d'amidon<sup>8</sup>. Le titrage des hémoprotéines s'effectue par dosage spectrophotométrique du fer héminique<sup>9</sup>.

#### Mode opératoire

On suit la réaction à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur. On introduit dans la cuve (1 cm  $\times$  1 cm) une portion aliquote de la solution tamponnée de gaïacol, puis une quantité déterminée d'Hb. On attend que l'équilibre de température soit atteint, puis au temps zéro de la réaction, on introduit 0.050 ml de substrat à l'aide d'une pipette à striction. L'ensemble est rapidement mélangé pendant que l'appareil est mis en marche. La cuve du témoin ne reçoit pas de substrat. On enregistre simultanément l'augmentation de la densité optique à 470 m $\mu$  et le temps. La température est maintenue constante à l'aide d'un thermostat; elle est vérifiée à l'intérieur même de la cuve au début et à la fin de chaque expérience.

#### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

##### *Variation de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration d'Hb et de MetHb*

Comme le montre la Fig. 1, pour une concentration donnée de substrat et de gaïacol, la vitesse de la réaction augmente avec la concentration d'enzyme, mais il n'y a pas proportionnalité entre ces deux valeurs. La relation ne devient linéaire qu'à partir d'une concentration d'enzyme voisine de  $7.4 \cdot 10^{-8}$  M et ceci se vérifie avec l'Hb et avec la MetHb.

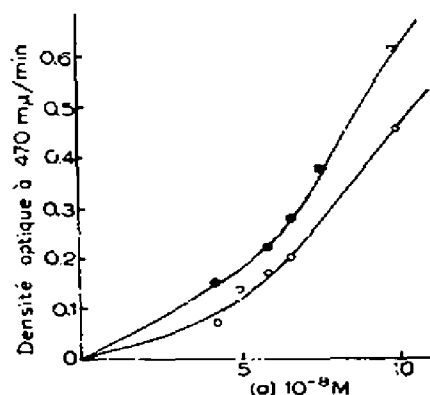


Fig. 1. Loi de variation de la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration d'enzyme. ●—●, hémoglobine; ○—○, méthémoglobine. Gaïacol:  $2.85 \cdot 10^{-2}$  M;  $H_2O_2$ , 0.01 M.

L'incurvation initiale de la courbe se retrouve lorsqu'on observe l'évolution de la réaction en fonction du temps. Ceci laisse supposer que l'état stationnaire n'est pas atteint immédiatement et qu'il s'établit d'autant plus rapidement que la concentration d'enzyme est plus forte. MORETTI ET YON<sup>6</sup> avaient observé le même phénomène lorsque la réaction est catalysée par le complexe Hb-Hp<sup>6</sup>. Le retard à l'établissement de l'état stationnaire n'est donc pas imputable à la formation du complexe Hb-Hp.

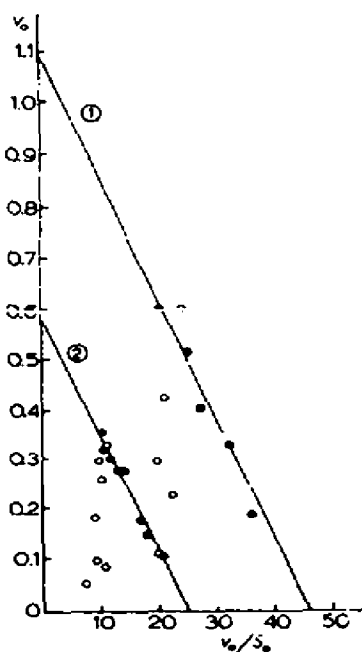


Fig. 2. Détermination de  $K_m$  par la représentation d'EADIE pour une concentration de gaïacol de  $2.85 \cdot 10^{-2}$  M. 1, enzyme  $1.2 \cdot 10^{-7}$  M; 2, enzyme  $0.25 \cdot 10^{-7}$  M. Les concentrations de substrat varient entre  $2.5 \cdot 10^{-2}$  M et  $9.5 \cdot 10^{-2}$  M. Température  $35^\circ$  et pH 4.5. ●—●, hémoglobine; ○—○, méthémoglobine.

*Variation de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration de substrat*

Les expériences ont été effectuées avec l'Hb, et avec la MetHb.

Pour les concentrations d'enzyme étudiées ( $1.2 \cdot 10^{-7}$  M et  $0.25 \cdot 10^{-7}$  M) la cinétique suit la loi de Michaelis, par rapport à la concentration du substrat. Nous avons pu déterminer une constante de Michaelis expérimentale  $K_m$ . Si l'on représente graphiquement les variations de la vitesse  $v$  en fonction de  $v/s$  (représentation d'EADIE<sup>10</sup>), la pente de la droite obtenue donne la valeur de  $K_m$ ; elle est indépendante de la concentration en enzyme (Fig. 2).

Cette détermination a été effectuée avec  $H_2O_2$  comme substrat en présence de gaïacol  $2.85 \cdot 10^{-2}$  M.

Pour l'hémoglobine, la valeur de  $K_m$  est de  $2.31 \cdot 10^{-2}$  M alors que pour la MetHb la réaction est pratiquement d'ordre un par rapport à la concentration de substrat, la valeur de  $K_m$  est très grande.

*Variation de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration de gaïacol*

*Allure générale du phénomène:* CONNELL ET SMITHIES<sup>7</sup> avaient déjà montré que lorsqu'on augmente progressivement la concentration de gaïacol, la vitesse passe par un maximum au delà duquel on observe une inhibition de la réaction. Ces auteurs ont utilisé le complexe MetHb-Hp.

Le même phénomène est observé avec le complexe Hb-Hp<sup>8</sup>, et le maximum se situe dans les deux cas entre 0.010 et 0.012 M de gaïacol. Nous avons retrouvé cette inhibition avec la MetHb et l'Hb seules, mais la vitesse maximum de la réaction correspond à une concentration de gaïacol d'environ 0.0016 M. Dans ce dernier cas l'inhibition intervient donc pour des concentrations de gaïacol beaucoup plus faibles (Fig. 3).

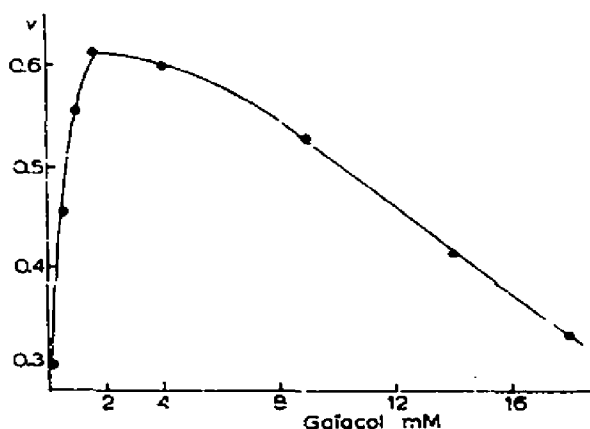


Fig. 3. Variation de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration de gaïacol. Substrat:  $H_2O_2$ , 0.005 M; enzyme: hémoglobine,  $0.56 \cdot 10^{-7}$  M.

*Étude de la réaction catalysée par Hb et MetHb seules, pour de faibles concentrations de gaïacol:* Cette étude est difficile, car elle impose de travailler à des concentrations de gaïacol inférieures à 1.6 mM. Dans ces conditions, les mesures effectuées

sont entachées d'une imprécision plus forte que celles qui permettent la détermination des autres constantes.

Dans la plupart des réactions catalysées par des peroxydases, la réaction est d'ordre un par rapport à la concentration du donneur d'électrons. Dans la présente réaction, le gaïacol se comporte au point de vue cinétique comme un deuxième substrat; la variation de la vitesse en fonction de la concentration de donneur pour une concentration donnée d'enzyme et d'eau oxygénée obéit à la loi de Michaelis. On se trouve en présence d'une réaction à deux substrats, le substrat oxydant et le donneur d'électrons. La cinétique présente donc la même particularité que lorsque la réaction est catalysée par le complexe Hb-Hp<sup>9</sup>.

Pour des concentrations d'Hb et de MetHb de  $0.83 \cdot 10^{-7}$  M, à deux concentrations différentes de substrat ( $5 \cdot 10^{-3}$  M et  $2.5 \cdot 10^{-3}$  M) et pour des concentrations de gaïacol variant entre 0.1 et 1.6 mM, nous avons trouvé  $K_a$ , la constante de Michaelis se rapportant au gaïacol, égale à  $0.43 \cdot 10^{-3}$  M pour Hb et à  $0.86 \cdot 10^{-3}$  M pour MetHb.  $K_a$  est indépendante de la concentration de substrat oxydant (Tableau I).

TABLEAU I  
VARIATION DE LA VITESSE DE LA RÉACTION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE GAÏACOL

	$H_2O_2$ ( $2.5$ mM)			$H_2O_2$ ( $5$ mM)			
$v_0$ ( $A_{470}/\text{min}$ )	0.47	0.56	0.65	0.75	0.86	0.95	Hb
	0.34	0.45	0.52	0.54	0.70	0.85	MetHb
$(v_0/a) \times 10^3$	0.78	0.51	0.39	1.25	0.78	0.59	Hb
	0.52	0.40	0.32	0.9	0.63	0.53	MetHb
$a$ (mM)	0.6	1.1	1.6	0.6	1.1	1.6	

*Étude de la réaction catalysée pour Hb et pour MetHb en présence de fortes concentrations de gaïacol:* La nature de l'inhibition observée aux fortes concentrations de gaïacol s'est avérée du type non compétitif aussi bien avec l'Hb qu'avec la MetHb (Fig. 4 et 5). Nous avons utilisé la représentation graphique proposée par Dixon<sup>11</sup>, en portant l'inverse de la vitesse initiale  $1/v$  en fonction de la concentration de l'inhibiteur ( $a$ ). Les droites obtenues convergent en un point de l'axe des abscisses qui donne  $-K_{aa}$ ,  $K_{aa}$  étant la constante d'inhibition par le gaïacol. La valeur ainsi obtenue est égale à  $8 \cdot 10^{-3}$  M pour l'Hb et  $3 \cdot 10^{-3}$  M pour MetHb. On doit noter que dans le cas du complexe Hb-Hp, la nature de l'inhibition est différente; elle est du type compétitif; toutefois la valeur de la constante  $K_{aa}$  est la même, mais elle semble dépendre de l'état de valence du fer.

Le fait que l'inhibition soit non compétitive dans le cas de l'Hb et de la MetHb seules, a pour conséquence que  $K_m$  ne varie pas, quelle que soit la concentration de gaïacol. La valeur de  $K_m$  déterminée expérimentalement dans les deux cas représente bien la constante de Michaelis de la réaction.

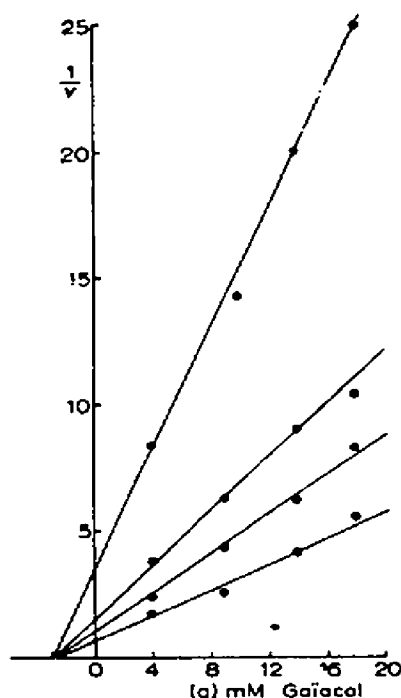


Fig. 4. Inhibition non compétitive de la réaction par le gallicol. Variation de l'inverse de la vitesse en fonction de la concentration de gallicol (représentation de DIXON). Concentration d'hémoglobine,  $0.57 \cdot 10^{-2}$  M; concentrations de substrat 1.5-7 mM.

#### DISCUSSION

Dans le Tableau II, nous avons groupé les valeurs des constantes cinétiques déterminées dans ce travail et celles qui correspondent à la réaction catalysée par le complexe Hb-Hp, d'après MORETTI ET YON<sup>6</sup>. L'analyse des résultats montre tout d'abord que lorsque la réaction est catalysée par la MetHb, la constante de Michaelis est très grande devant les concentrations de substrat utilisées. La réaction est pratiquement du premier ordre par rapport à la concentration d' $H_2O_2$ , alors que  $K_m$  est relativement faible avec Hb. Dans le cas des réactions catalysées par une peroxydase,

TABLEAU II

COMPARAISON DES CONSTANTES CINÉTIQUES CORRESPONDANT  
AUX DIFFÉRENTES RÉACTIONS

$k_s$  est exprimé en valeur relative par la densité optique à 470 mμ par seconde et par mole d'enzyme.

Enzyme	$K_s (10^{-2} M)$	$K_{s+I} (10^{-2} M)$	$K_m (10^{-3} M)$	$k_1 (10^6)$	Type de l'inhibition
Hémoglobine	0.43	8	2.31	0.2*	Non compétitive
Méthémoglobine	0.86	3	Très grande		Non compétitive
Complexe Hb Hp	1.3	8.2	1.75	0.4	Compétitive

\* Cette valeur a été extrapolée; elle correspond à une valeur idéale en absence d'inhibition par le gallicol.

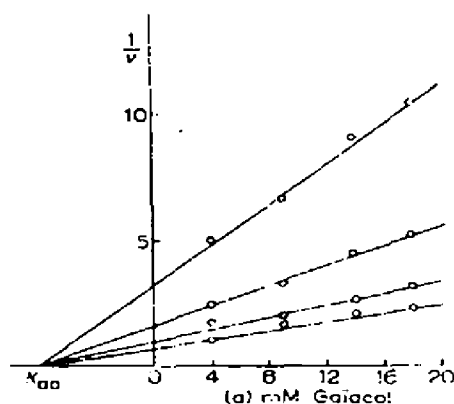


Fig. 5. Inhibition non compétitive de la réaction par le gaïacol. Concentration de méthémoglobine,  $0,57 \cdot 10^{-3}$  M. Même représentation et même concentrations de substrat que pour la Fig. 4.0

on ne peut généralement pas assimiler  $K_m$  à la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat. La grande valeur de  $K_m$  peut traduire, soit une faible affinité de la MetHb pour le substrat lorsque le fer est sous la forme  $Fe^{3+}$ , soit une valeur élevée de  $k_a$ .

D'autre part, contrairement à ce que l'on pouvait penser il n'apparaît pas de différences significatives dans les valeurs des constantes cinétiques obtenues avec Hb et avec le complexe Hb-Hp. L'augmentation de la vitesse de la réaction observée dans nos conditions d'expérience, lorsque Hp est fixée sur Hb, ne résulte donc pas d'une modification sensible des constantes cinétiques. La différence essentielle réside dans le changement du type d'inhibition par les fortes concentrations de gaïacol. Alors que l'inhibition est non compétitive dans le cas de l'Hb, elle devient compétitive dans le cas du complexe Hb-Hp. La constante d'inhibition n'étant pas modifiée, il semble que l'inhibiteur s'associe de la même manière à la molécule d'Hb et en un même point que l'Hp soit fixée ou non. Mais la fixation de l'Hp imprime vraisemblablement des déformations dans la molécule d'Hb telles que le type d'inhibition se trouve modifié. On peut concevoir que le site de fixation de la molécule de gaïacol qui entraîne l'inhibition se trouve rapproché de l'atome de fer, supprimant ainsi la possibilité d'approche du substrat oxydant.

Le ramaniement de la structure de l'Hb pourrait avoir pour effet d'entraîner une répartition différente des électrons au voisinage de l'atome de fer lui conférant une plus grande réactivité.

#### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur J. TONNELAT pour l'intérêt constant qu'il a porté à ce travail.

#### RÉSUMÉ

L'étude cinétique de l'activité peroxydasique de l'hémoglobine et de la méthémoglobine a été effectuée avec l'eau oxygénée comme substrat et le gaïacol comme donneur d'électrons. Les constantes de ces réactions ont été déterminées et com-

parées à celles obtenues dans un précédent travail pour le complexe hémoglobine-haptoglobine.

Contrairement à ce que l'on pouvait penser, les constantes  $K_m$  et  $k_s$  ne diffèrent pas considérablement dans la réaction catalysée par l'hémoglobine et dans celle catalysée par le complexe hémoglobine-haptoglobine. Cependant, le type de l'inhibition entraînée par les fortes concentrations de gaïacol est différent dans les deux cas. Les auteurs cherchent à expliquer cette différence par une modification de structure de l'hémoglobine résultant de la fixation de l'haptoglobine.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> M. POLONOVSKI ET M. F. JAYLE, *Compt. Rend.*, 129 (1938) 457.
- <sup>2</sup> M. F. JAYLE, *Compt. Rend.*, 211 (1940) 574.
- <sup>3</sup> M. F. JAYLE, G. BOUSSIER ET J. TONNELAT, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 38 (1956) 343.
- <sup>4</sup> S. GUINAND, J. TONNELAT, G. BOUSSIER ET M. F. JAYLE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 38 (1956) 329.
- <sup>5</sup> M. F. JAYLE, S. ISHAK ET P. GILLARD, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 28 (1946) 63.
- <sup>6</sup> J. MORETTI ET J. YON, *Biochim. Biophys. Acta*, 46 (1961) 545.
- <sup>7</sup> G. E. CONNELL ET O. SMITHIES, *Biochem. J.*, 72 (1959) 115.
- <sup>8</sup> J. MORETTI, G. BOUSSIER ET M. F. JAYLE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 40 (1958) 59.
- <sup>9</sup> R. HENRY, *Ann. Biol. Chim.*, 3 (1945) 101.
- <sup>10</sup> G. J. EADIE, *Science*, 116 (1952) 688.
- <sup>11</sup> M. DIXON, *Biochem. J.*, 55 (1953) 161.

*Biochim. Biophys. Acta*, 67 (1963) 417-424