

BBA 3914

DÉTERMINATION DE LA DEMI-VIE DE L'HAPTOGLOBINE PLASMATIQUE HUMAINE

JEAN MORETTI, JACQUES BOREL, WANDA DOBRYSZYCKA* ET MAX-F. JAYLE

Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, Paris (France)

(Reçu le 11 juillet 1962)

SUMMARY

Determination of the half-life time of human plasma haptoglobin

Human haptoglobin, labeled with ^{131}I has been administered to various human subjects by injection. The elimination of the labeled haptoglobin was followed during 11 days. The half-life time of the protein appeared to be 4 days. Breakdown products, small peptides, appeared in the urine.

INTRODUCTION

La demi-vie de l'haptoglobine humaine Hp a été déterminée d'une manière approximative par NYMAN¹. Cet auteur a suivi, chez 9 sujets atteints de pneumonie, la diminution du taux de Hp après l'institution d'un traitement par des antibiotiques. La courbe de décroissance de la "surcharge haptoglobinique" lui a permis de calculer une demi-vie moyenne de 5.4 jours (4.4–6.8 jours).

Un tel procédé ne saurait, évidemment, donner qu'une indication approchée. La seule méthode permettant de calculer la demi-vie d'une protéine plasmatique implique l'administration de cette protéine marquée par un isotope. C'est pourquoi nous avons travaillé avec de l'haptoglobine marquée par de l'iode ^{131}I . En 1960, nous avions déjà procédé à 6 essais. Nous disposions alors d'une installation de comptage trop peu sensible pour pouvoir suivre la diminution de la radioactivité plasmatique plus de 4–5 jours. Pour le présent travail, nous avons utilisé des scintillateurs et des échelles qui nous ont permis de suivre la radioactivité résiduelle pendant onze jours chez deux sujets normaux. Nous indiquerons successivement les méthodes utilisées et les résultats obtenus.

MATERIEL ET MÉTHODES

Préparation de l'haptoglobine marquée

Nous avons adapté une méthode utilisée par divers auteurs pour marquer des anti-corps² ou de l'albumine³. Elle consiste à oxyder de l'iodure radioactif par de l'iodate en milieu acide, puis à fixer l'iode libéré sur la protéine en milieu alcalin, enfin à éliminer l'excès d'iode non fixé par la protéine. Voici le mode opératoire.

Purification de Hp humaine: L'haptoglobine est obtenu par la méthode de OWEN

* Abréviation: Hp, Haptoglobine.

* Adresse actuelle: Laboratoire de Biochimie, Académie de Médecine, Wrocław, (Pologne).

*et al.*⁴. Le sérum est passé sur une colonne de DEAE-cellulose en tampon acéto-acétique 0.01 M (pH 4.7). L'haptoglobine fixée est éluée sélectivement par du tampon 0.06 M contenant NaCl 0.1 M. On sépare ainsi un certain nombre de fractions contenant Hp que l'on dose par la méthode peroxydasique⁵, qui permet d'évaluer le taux de Hp native en g/l. D'autre part, à partir du coefficient d'extinction de Hp humaine $E = 1.21 \text{ mg/ml à } 278 \text{ m}\mu$, on détermine par spectrométrie la teneur en protéine de ces fractions, exprimée également en g/l. Lorsque ces deux valeurs coïncident, la pureté de Hp native est de 100 %. On ne retient que les fractions dont la teneur en Hp native est supérieure à 95 %. On vérifie également la pureté de Hp par une électrophorèse à travers un gel d'amidon.

Dans le présent travail, nous avons utilisé une Hp lyophilisée, du type 2-1, dont la pureté était supérieure à 97 %. 90 mg sont dissous dans 0.6 ml d'eau distillée. On obtient une solution limpide, légèrement teintée en jaune, à laquelle on ajoute 0.1 ml de tampon carbonate 0.2 M (pH 9).

Préparation de $^{131}\text{I}_2$: Le produit de départ est la solution S 3 du Commissariat à l'Energie Atomique. Elle contient de l'iodure de sodium sans entraîneur ni réducteur, en tampon carbonate-bicarbonate. Son activité spécifique est de 16 à 20 mC/ml. A 0.4 ml de solution S 3, on ajoute 10-20 μl de 1 N HCl pour neutraliser le tampon carbonate, puis, successivement, 0.1 ml de KI 0.025 M, 0.1 ml KIO_3 0.02 M, et enfin 0.1 ml de HCl 0.03 M. Aussitôt apparaît la coloration de l'iode libre.

La solution est aspirée à l'aide d'une propipette dans un tube de verre terminé par un capillaire, puis refoulée très lentement dans la solution de protéine agitée pendant toute la durée de cette opération. La mélange est ensuite abandonné à la température du laboratoire pendant 2 h. Une durée de contact plus longue n'améliore pas le rendement, nous l'avons expérimenté. Bien au contraire, la dénaturation de Hp par les rayons β et γ de l'iode augmente avec le temps.

Elimination de l'iode non fixé: On a proposé plusieurs techniques pour éliminer l'iode minéral non fixé sur la tyrosine. La dialyse, même en présence d'hyposulfite, exige plusieurs jours, délai incompatible avec la vie brève de l'iode. La chromatographie sur résines (Dowex, Amberlite) dénature l'haptoglobine. De même, l'extraction de l'iode par les solvants organiques. Nous avons essayé successivement le toluène, le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, le cyclohexane, le chlorure d'éthylène, le sulfure de carbone et l'hexane. Tous ces solvants dénaturent Hp plus ou moins rapidement. Nous avons alors procédé à une chromatographie sur une petite colonne de DEAE-cellulose, en tampon phosphate 0.02 M (pH 6); l'iode n'est pas fixé. On lave la colonne jusqu'à ce que le tampon effluent ne soit plus radioactif. Ce résultat est obtenu avec 90-95 ml de la solution tampon additionnée de quelques gouttes d'hyposulfite 0.01 M. L'haptoglobine iodée est éluée de la colonne par du tampon phosphate 0.2 M au même pH 6; 10-15 ml suffisent pour récupérer 40 mg de protéine marquée. L'activité peroxydasique de cette solution, après addition d'hémoglobine, est déterminée; on mesure d'autre part sa densité optique à 278 m μ pour connaître sa teneur en protéines; de ces deux mesures, on déduit que la protéine iodée éluée est pure et non dénaturée. Il reste sur la colonne de DEAE-cellulose une fraction importante de Hp initiale qui n'est pas éluée par le tampon 0.2 M. Il s'agit des molécules dénaturées par l'action du rayonnement.

La quantité d'iode fixée par Hp est déduite de la mesure de la radioactivité de Hp et de celle des éluats contenant l'iode non fixé. Le renouvellement de l'ioduration est de

10 %. On en déduit que 0,3 atome d'iode en moyenne sont fixés par molécule de Hp.

Stérilisation: Toutes les opérations précédentes sont faites avec des solutions contenant du merseptyl à la concentration de 10^{-4} g/l. Néanmoins, il est indispensable de stériliser la solution avant l'injection, et de la débarrasser des substances pyrogènes. Le passage à travers les filtres d'amiante (type Seitz) ou de papier (type Cofram) entraîne une énorme perte en protéine; de plus, la partie récupérée est dénaturée. Nous avons donc recherché dans quelles conditions nous pourrions préparer une protéine stérile et native, sans perte considérable. Ce résultat est obtenu par filtration à travers une bougie Chamberland 5 L 5. A cet effet, la solution de Hp marquée, dialysée pendant une nuit contre du tampon phosphate isotonique, est passée à travers la bougie préalablement stérilisée par un séjour de 48 h dans une étuve à 120°.

Au terme de cette dernière opération, on obtient 24 ml de solution contenant 800 μ C d'iode fixés sur 26 mg de protéine. Son activité spécifique est de 12 millions de coups/min/mg.

Injections et prélèvements

La solution de Hp marquée est injectée à des sujets sains ou atteints d'affections non susceptibles de modifier le taux de leur haptoglobine. Ces sujets, hospitalisés, demeurent sous contrôle médical pendant toute la durée de l'expérience. Chacun a reçu, la veille et le jour de l'injection, 10 ml de lugol, afin de saturer la thyroïde en iode. Un premier prélèvement de sang est effectué 10 min après l'injection. La mesure de la radioactivité du plasma permet de calculer le volume plasmatique du patient.

Les urines sont également collectées toutes les 24 h et leur radioactivité est mesurée.

Fractionnement des protéines sériques

Tous les jours, ou tous les deux jours, on prélève 10 ml de sang sur citrate, que l'on centrifuge aussitôt. (a) A partir de 1 ml plasma, on sépare le fibrinogène par précipitation avec NaCl 3 M. On mesure sa radioactivité. (b) A un autre millilitre, on ajoute un égal volume d'acide perchlorique 1,2 M. Des protéines précipitent. Le filtrat contient surtout de l'orosomucoïde (80 % environ) dont on mesure la radioactivité. (c) Pour déterminer, dans la radioactivité du plasma total, la part qui revient à la seule Hp, nous avons établi le protocole suivant. Il repose sur le fait que, à pH 5, en présence de sulfate d'ammonium à 52 % de saturation, les haptoglobines des types 2-1 et 2-2 précipitent, alors que leurs complexes Hb-Hp, plus solubles, précipitent seulement entre 54 et 65 % de saturation.

Pour chaque échantillon de sérum, on opère dans deux tubes à centrifuger, qui reçoivent chacun 1 ml de sérum, 5,5 ml de solution de NaCl à 0,9 % et 3,5 ml de solution saturée de sulfate d'ammonium. Le pH final est ajusté à 5. Un précipité se forme, constitué essentiellement de γ -globulines. Au bout de 3 h, on le sépare par centrifugation. On le reprend par un peu d'eau. Cette solution est amenée à un volume final de 1 ml dans un tube jaugé au préalable. (Nous avons vérifié que le lavage de ce précipité par une solution de sulfate d'ammonium à 35 % de saturation ne modifiait pas sa radioactivité.)

Les opérations suivantes, qui concernent les surnageants (que nous désignons par le symbole St) diffèrent d'un tube à l'autre. Au surnageant du premier tube (que nous appelons tube sérum Sm), on ajoute une quantité de sulfate d'ammonium en cristaux suffisante pour obtenir une teneur égale à 52 % de la saturation. Au surnageant du

second tube (que nous appelons tube complexe Cxe), on ajoute 0.1 ml de solution de Hb de cheval M/160 en fer. Le complexe Hb-Hp se forme aussitôt. On amène alors la solution à 52 % de saturation en sulfate d'ammonium par addition de cristaux. On laisse les précipités se former pendant une nuit. On centrifuge. Les surnageants St Sm et St Cxe sont prélevés quantitativement et amenés à un volume de 10 ml par addition d'eau. Les précipités Pé Sm et Pé Cxe sont dissous comme dans la première étape et amenés à un volume de 1 ml.

Les surnageants, comme d'ailleurs les précipités, ne diffèrent l'un de l'autre que par l'absence ou la présence de la combinaison radioactive Hb-Hp. Il est donc possible par différence, de mesurer spécifiquement la radioactivité imputable au complexe Hb-Hp. On doit avoir en effet :

$$(Pé Sm) - (Pé Cxe) = (St Cxe) - (St Sm)$$

si l'on désigne par ces symboles la radioactivité totale respectivement des précipités et des surnageants du tube sérum et du tube complexe. Cette valeur représente la radioactivité liée à l'haptoglobine.

Prélèvements urinaires

Chaque jour, l'urine des sujets a été collectée; sa radioactivité a été mesurée.

Nous avons recherché la présence d'iode libre ou d'iodure minéral par extraction chloroformique après oxydation par l'eau oxygénée en milieu acide. Nous avons également extrait les protéines pour mesurer leur radioactivité spécifique, en formant le complexe protéine-tannin⁶ d'où l'on déplace les protéines par la caféine. Enfin, sur une troisième fraction, nous avons dialysé l'urine, évaporé le dialysat, mesuré la radioactivité des deux parties, dialysable et non dialysable.

Mesures

Les mesures sont effectuées à l'aide d'une sonde à scintillation équipée d'un cristal en iodure de sodium activé au thallium (photomultiplicateur 51 AVP Radio-technique), d'une échelle de comptage Mesco type L.CSE 5P pour spectrométrie, ou bien à l'aide d'une sonde Well-Type Scintillation Detector de Packard montée sur une échelle Tri-Carb Packard. Pour tous ces échantillons, on opère sur un même volume de 0.5 ml. La série complète de toutes les fractions obtenues à cette date a été mesurée les 6°, 8° et 11° jour.

RÉSULTATS

Demi-vie de l'haptoglobine

La Fig. 1 représente, en coordonnées semi-logarithmiques, la radioactivité du sérum total et celle de l'haptoglobine correspondante chez deux sujets qui ont reçu chacun 10 à 11 ml de solution, soit environ 10 mg de Hp marquée par 350 µC d'iode. Le sujet L, 25 ans, a reçu une dose légèrement supérieure à celle injectée au sujet S, 73 ans. Cependant, en raison de son catabolisme plus actif, la radioactivité de son sérum total et celle de son Hp diminuent plus vite que chez S.

La demi-vie, calculée d'après la deuxième partie des courbes, est respectivement de 3.5 et 4 jours. Elle demeure constante du 6° au 11° jour, terme de l'expérience. Du 1° au 3° jour chez le sujet L, et du 1° au 4° jour chez le sujet S, la radioactivité de Hp décroît près de deux fois plus vite que dans la seconde moitié de l'expérience. C'est la période pendant laquelle Hp marquée diffuse dans les espaces extra-vasculaires.

L'équilibre est donc atteint au bout de 3-4 jours seulement, ce qui est conforme aux expériences antérieures sur les protéines plasmatiques.

Radioactivité du séromucoïde et du fibrinogène

Nous n'avons jamais décelé la moindre radioactivité dans le filtrat perchlorique. Quant au fibrinogène, la très faible activité mesurée est due, sans aucun doute, à la difficulté qu'on éprouve toujours à purifier cette protéine et à la débarrasser de toute contamination.

Radioactivité des autres fractions protéiques

Le précipité à 35 % de saturation en sulfate d'ammonium est formé surtout de γ -globulines. Quant à la fraction qui ne précipite pas à 52 %, elle contient surtout de l'albumine et des β -globulines. Nous avons trouvé, dans ces deux groupes de protéines, une certaine radioactivité qui décroît comme celle de Hp. Nous discuterons ce fait plus loin.

Radioactivité urinaire après le 8^e jour

La radioactivité de l'urine n'est pas fixée sur de grosses molécules, puisqu'elle dialyse dans la proportion de 99.9 %. Elle n'est pas présente sous forme d'iodure minéral, puisqu'après oxydation pendant 3 h par l'eau oxygénée 19 N en milieu acide, elle n'est pas extraite par le chloroforme.

Nous avons évaporé l'eau de dialyse, repris le résidu par de l'acétone anhydre contenant 1 % de HCl pur, filtré pour éliminer les sels et pigments, et évaporé la solution acétonique. Le résidu, fortement coloré, qui contient toute la radioactivité de l'urine initiale, est soumis à une chromatographie sur papier, dans le système butanol-

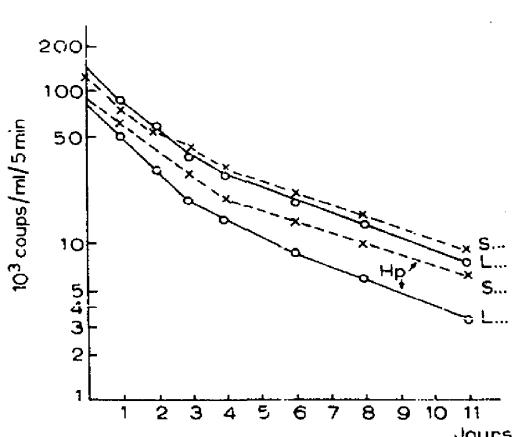


Fig. 1. Décroissance de la radioactivité du sérum (courbes supérieures) et de l'haptoglobine (courbes inférieures) pour le sujet S (---) et pour le sujet L (—). En ordonnées, on a porté des milliers de coups en 5 min, pour 1 ml de sérum.

des sérums après addition d'hémoglobine (complexe Hb-Hp). Les ordonnées représentent des centaines de coups en 5 min pour 1 ml de sérum.

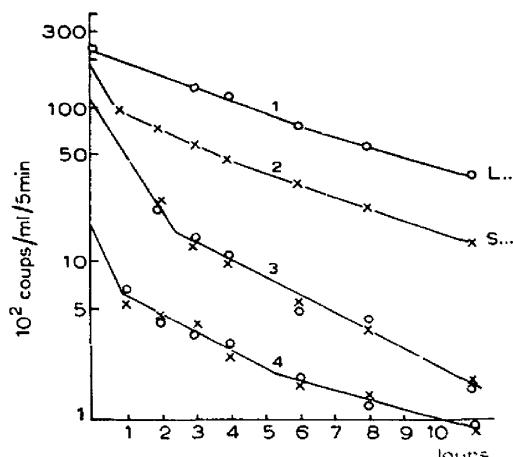


Fig. 2. Décroissance de la radioactivité des fractions séparées à partir du sérum par précipitation au sulfate d'ammonium. 1, Surnageant du sérum précipité à 52 % pour le sujet L (O—O); 2, surnageant du sérum précipité à 52 % pour le sujet S (×—×); 3, précipités des mêmes sérums à 35 %; 4, précipités

acide acétique-eau (73:7:23), puis révélé par autoradiographie. On ne trouve pas de mono- ou de di-iodotyrosine, mais une seule tache au front du solvant. Il ne peut s'agir que de peptides marqués.

DISCUSSION

Les courbes de la Fig. 1 montrent que les deux sujets suivis pendant 11 jours se sont comportés de façon pratiquement identique. Les courbes qui représentent la radioactivité de Hp sont presque parallèles à celles de la radioactivité du sérum total et leur sont toujours inférieures; dès la première prise de sang au bout de 10 min, on ne retrouve dans Hp que les 75 % de l'activité totale du sérum. Cette proportion diminue avec le temps et devient voisine de 50 % à partir du 6^o jour.

Sous quelle forme se trouve, dans le plasma, la fraction radioactive non-haptoglobulinique? Pour répondre à cette question, nous examinerons tour à tour les 3 hypothèses possibles.

Première hypothèse: Une partie de ¹³¹I est passée de Hp sur les autres protéines. Si cela était exact, les demi-vies des fractions correspondant aux γ -globulines et à l'albumine seraient de plusieurs semaines et non pas de 4 jours (Fig. 2).

Deuxième hypothèse: La radioactivité se trouve liée à des produits du catabolisme de Hp. Cette fois encore, on ne comprendrait pas comment ces divers produits auraient la même demi-vie que Hp native, et ce, dans les deux zones de précipitation où on les trouve.

Troisième hypothèse: Il s'agit de Hp, mais partiellement dénaturée, au point de ne plus précipiter dans les conditions habituelles.

Trois arguments militent en faveur de cette réponse: (a) Elle rend compte, évidemment, du fait que les deux fractions étudiées ont la même demi-vie que Hp normale (Fig. 2). (b) De plus, elle explique pourquoi la proportion de la radioactivité haptoglobulinique par rapport à celle du sérum total diminue avec le temps. Nous avons, en effet, constaté depuis longtemps que *in vitro* à 4°, sous l'action du rayonnement de ¹³¹I, Hp perdait en 6 jours la moitié de son aptitude à se combiner avec Hb. La dénaturation est donc d'autant plus importante que le sérum est plus radioactif. (c) Enfin, pour vérifier cette hypothèse, nous avons soumis le sérum des sujets à une électrophorèse en gel d'amidon et mesuré la radioactivité des fractions séparées. Celle-ci se trouve pour 80 % localisée dans les bandes de Hp 2-1 et pour 20 % au point d'insertion, sur la tache fortement colorée des protéines qui n'ont pas migré dans le gel. De plus, l'électrophorèse en gel d'amidon révèle la présence de traces de Hp dans le précipité à 35 % de saturation et dans le surnageant du sérum à 52 % de saturation en sulfate d'ammonium.

L'analyse de la radioactivité urinaire montre que Hp est métabolisée en peptides de faible poids moléculaire. A ce sujet, il est intéressant d'opposer le métabolisme de [¹³¹I]Hp à celui de la tyroxine marquée. L'iode tyroxinique, en effet, est transformé, au cours de son catabolisme, en iodures qui sont excrétés dans les urines; or, nous n'avons jamais pu mettre en évidence la présence d'iode minéral dans les urines des sujets auxquels nous avons injecté [¹³¹I]Hp, après le 8e jour.

CONCLUSION

La demi-vie de [¹³¹I]Hp est de 4 jours. Ce résultat est nettement plus faible que les chiffres avancés par NYMAN¹ à partir de la disparition de Hp des sujets pneumoniques.

Cela n'est pas étonnant, car, chez des sujets malades, on ne peut être assuré qu'un traitement par des antibiotiques supprime rapidement la surproduction de Hp. Sans doute ne peut-on affirmer que Hp iodée se comporte exactement comme Hp native dans l'organisme humain. Le fait, cependant, que la demi-vie que nous avons trouvée n'est que 1.4 jour plus rapide en moyenne que celle calculée par NYMAN nous laisse supposer qu'elle correspond bien à la réalité biologique.

Les acides aminés iodés provenant du catabolisme de Hp ne s'incorporent pas dans les autres protéines plasmatiques. Ce fait n'est pas surprenant, puisqu'ils sont sans doute considérés comme des substances étrangères par les RNA générateurs de protéines.

On peut encore tirer une dernière conclusion de ces expériences. L'haptoglobine est transformée dans l'organisme en peptides qui sont excrétés sous forme iodée. Il semble donc que les désiodases qui agissent sur les iodotyrosines et iodotyronines n'ont pas d'activité sur les iodopeptides qui proviennent de la dégradation de Hp.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur gratitude au Professeur MILLIEZ et au Docteur LAGRUE qui ont bien voulu assurer la surveillance médicale des sujets en expérience.

RÉSUMÉ

De l'haptoglobine humaine, marquée par ^{131}I , a été injectée à plusieurs sujets. Les auteurs ont suivi pendant onze jours l'élimination de l'haptoglobine marquée. La demi-vie de cette protéine plasmatique est de 4 jours. Les produits du catabolisme s'éliminent dans l'urine sous forme de petits peptides dialysables.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. NYMAN, *Scand. J. Lab. Invest. Suppl.* 39 (1959) 69.
- ² J. C. BOURSNELL, R. R. A. COOMBS ET V. RIZK, *Biochem. J.*, 55 (1953) 745.
- ³ A. S. MCFARLANE, *Biochem. J.*, 62 (1956) 135.
- ⁴ H. SMITH, P. EDMAN ET J. A. OWEN, *Nature*, 193 (1962) 286.
- ⁵ M. F. JAYLE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33 (1951) 876.
- ⁶ W. MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN ET W. DOBRYSZYCKA, *Nature*, 184 (1959) 1799.