

L'hémoglobine, le NO, les complexes protéiques nitrosylés et la régulation de la pression vasculaire

L'hémoglobine (Hb) des mammifères est un tétramère composé de deux chaînes α et de deux chaînes β , chacune comportant un groupe hémique. Les chaînes β possèdent à proximité de l'hème un résidu cystéinyl de surface ($\beta 93$). Ce résidu est extrêmement conservé, présent dans toutes les hémoglobines des mammifères et des oiseaux. Jusqu'à présent, aucune fonction spécifique ne lui avait été attribuée: on le savait libre et titrable dans la forme oxygénée de l'hémoglobine (état R de forte affinité pour les ligands), enfoui et peu réactif dans la forme désoxygénée (état T de faible affinité). Il était donc considéré comme un marqueur de l'état allostérique. L'intérêt pour ce résidu cystéinyl a été ravivé récemment par une publication du groupe de Stamler [1] suggérant que ce résidu serait associé au rôle vasodilatateur du monoxyde d'azote (NO•).

Depuis une dizaine d'années, on sait que le NO• est impliqué dans la régulation de la pression vasculaire par son effet vasodilatateur périphérique (le NO• a été identifié à l'EDRF ou *endothelial-derived relaxing factor*) (m/s n° 10, vol. 7, p. 1094). Mais, avec un électron célibataire, le NO• est une molécule extrêmement réactive [2] qui se lie à l'atome de fer de l'hème avec une constante d'affinité 10^6 fois supérieure à celle de l'oxygène. On se demandait donc comment le NO, libéré par les cellules endothéliales, pouvait survivre à la présence de 20 mM d'hèmes ferreux, avides de NO et présents de l'autre côté de la membrane des globules rouges.

La publication de Jia *et al.* propose l'existence dans le sang d'un autre mécanisme de transport et de mise en réserve du NO• par l'hémoglobine sous forme de composés S-nitro-

sylés [1]. Des études antérieures avaient montré que, dans les alvéoles pulmonaires, le NO• engendré par la NO-synthase se liait au glutathion qui y est abondant. La demi-vie du NO• complexé était alors de plusieurs heures, comparée à quelques secondes pour le NO• libre. La formation du complexe S-nitroso-glutathion réduisait la toxicité du NO• et entraînait la relaxation des fibres musculaires lisses des voies aériennes [3]. Les résultats actuels montrent que le NO• libre se lie aussi à l'hémoglobine et selon deux modalités: sur l'atome de fer ferreux ou ferrique et sur les groupes sulphydryl réactifs de la cystéine $\beta 93$. Par ailleurs, les dérivés nitroso thiols ne réagissent pas avec les atomes de fer ferreux de l'oxy- ni de la désoxyhémoglobine. Ils réagissent surtout avec la fonction thiol des résidus cystéinyl des sous-unités β de l'HbO₂ (S-nitroso HbO₂), du glutathion ou de l'albumine. Ces nitrosylations successives s'effectuent par un mécanisme de transnitrosylation en cascade de groupements thiols (*figure 1*). La mise en évidence quantitative de ces composés S-nitrosylés n'a été rendue possible que grâce à la mise au point d'une nouvelle technique de chemiluminescence extrêmement sensible (l'ordre des concentrations est nanomolaire) [4]: dans le sang artériel, la concentration de Fe²⁺NO est 536 ± 99 nM et cystéine $\beta 93$ -SNO 311 ± 55 nM; dans le sang veineux Fe²⁺NO est de 894 ± 126 nM et la concentration de cystéine $\beta 93$ -SNO 32 ± 14 nM. L'augmentation de S-nitrosylation de l'hémoglobine lors du passage pulmonaire suggère que la réaction de nitrosylation a lieu dans le poumon, mais on n'en a pas encore approché le mécanisme (*figure 2A*).

La libération de SNO au passage tissulaire suggère un rôle dans la régulation du tonus vasomoteur. On connaît l'élévation de la pression artérielle provoquée par l'administration systémique d'hémoglobine isolée; elle a été rapportée à la séquestration du NO endothélial. Les auteurs ont répété l'expérience avec de l'hémoglobine S-nitrosylée: l'injection de SNO-HbO₂ n'élève pas la pression à l'intérieur d'un segment artériolaire perfusé, celle de SNO-MetHb la réduit. En outre, si l'on perfuse des rats, prétraités par un inhibiteur des NO synthases de manière à dépléter l'organisme de composés nitrosylés, avec des érythrocytes contenant de l'hémoglobine nitrosylée à un niveau de Hb-SNO comparable à celui mesuré chez le rat normal, la pression artérielle s'abaisse d'environ 8 mmHg alors que les globules rouges ne contenant pas d'hémoglobine nitrosylée sont sans effet [1].

L'intérêt du travail de Jia *et al.* est également de démontrer que la formation des S-nitroso-($\beta 93$) Hb dépend de l'état allostérique de l'hémoglobine et de l'état de *spin** de l'atome de fer de l'hème. La réactivité à la nitrosylation des groupements -SH des résidus cystéinyl $\beta 93$ est plus

* L'état de spin du fer correspond au nombre d'électrons non appariés des orbitales périphériques. Les changements de spectre des différentes espèces d'Hb (désoxy, oxy, NO, metHb) traduisent les réarrangements électroniques qui accompagnent la liaison des ligands. Le changement de spin du fer est toujours accompagné par un changement des longueurs des liens fer-ligand (Fe \leftrightarrow Ne); dans les composés de spin bas (S = 0, HbO₂) ces liaisons sont plus courtes que dans les composés de spin-élevé (désoxyHb, S = 2). Très schématiquement la différence de spin correspond à une modification de la tension Fe \leftrightarrow azote lors de la transition structurale R \rightarrow T.

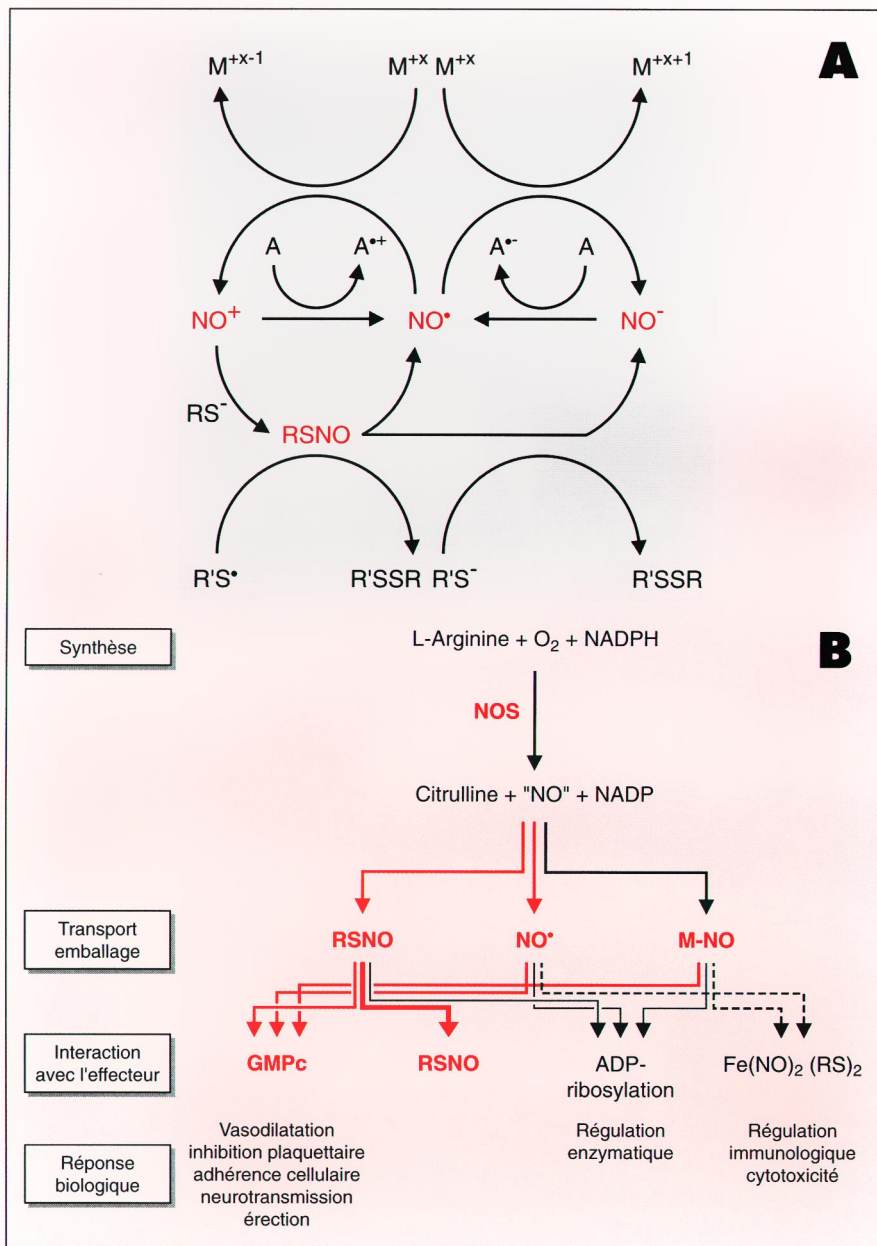


Figure 1. **Biochimie du NO.** **A.** Interconversion des formes de NO selon le potentiel redox. Trois voies pourraient avoir une action biologique, mettant en jeu un métal (M), des transferts de charge vers des accepteurs d'électrons (A) ou un couplage avec les réactions redox thiol/disulfures. **B.** Voies d'action biologique: en présence de NADPH et d'un certain nombre de facteurs, la NO synthase (NOS), une protéine hémique contenant un atome de fer lié à un cycle protoporphyrine IX, active successivement deux molécules d'O₂ et insère deux atomes d'oxygène dans le substrat arginine, donnant naissance au «NO» et à la citrulline. Le NO est produit sous trois formes: (1) NO[•], (2) composés S-nitrosylés, RSNO (la forme produite majoritairement chez l'homme) ou N-nitrosylés (amines), (3) NO lié à un métal (M). Les composés RSNO sont stables, ne réagissent pas avec l'O₂, à la différence de NO[•], très réactif, qui forme immédiatement des peroxy-nitrites. La forme sous laquelle le NO est délivré et transporté joue donc un rôle majeur dans la toxicité potentielle du NO. Le NO module l'action des protéines en réagissant de façon réversible avec leurs groupes fonctionnels. L'activation de la guanylyl cyclase par liaison du NO[•] à son atome de fer hémique rend compte de l'effet endothelium-derived relaxing factor de NO. On ne connaît pas la réaction qui permet à RSNO de libérer NO[•]. La réaction de NO avec les groupes thiols protéiques à la surface des cellules a été, par ailleurs, associée à certains effets antimicrobiens, à la modulation de l'activité du récepteur NMDA, à la transmission du signal relayé par l'ADP-ribosylation des groupes sulphydryl protéiques... D'après [2].

importante lorsque l'Hb est saturée en oxygène (état R) que dans le sang veineux où l'hémoglobine est désoxygénée (état T). De même, la dénitrosylation de la SNO-Hb est plus rapide lorsque l'Hb est désoxygénée ou oxydée (*spin* élevé) que lorsqu'elle est oxygénée (*spin* bas, état R) (figure 2B). En conséquence, dans les poumons, l'hémoglobine libère le CO₂ et se charge en O₂ et en NO[•]. Dans

les tissus, la désoxygénation de la SNO-HbO₂ s'accompagne de la libération du NO[•] et de la vasodilatation des artérioles (figure 2B). Le fonctionnement allostérique de l'hémoglobine, déjà impliqué dans le mécanisme de liaison et de transport de l'oxygène, du CO₂ et des ions H⁺, s'avère donc également impliqué dans la régulation de la pression sanguine.

Une conséquence importante de cette découverte concerne l'utilisation de solutions d'hémoglobine libre comme substitut du sang. En effet, il a été montré lors d'expériences sur l'animal ou lors d'essais cliniques chez l'homme, que l'injection de solutions d'hémoglobine purifiée provoquait l'apparition d'une vasoconstriction plus ou moins importante et durable. Comme nous l'avons men-

tionné plus haut, cette vasoconstriction a été attribuée à la disparition du NO « piégé » par l'hémoglobine en solution. La vasoconstriction artériolaire observée lors de la perfusion d'une solution d'hémoglobine est inhibée après injection de SNO-Hb. En conséquence, l'injection de ces substituts du sang à base d'hémoglobine devrait être associée à celle de SNO-HbO₂.

En conclusion, (1) le NO peut être transporté sous forme de SNO-Hb ce qui permet d'envisager la préservation de sa fonction vasodilatatrice et d'oxygénation tissulaire en présence d'oxygène ; (2) cette liaison est liée au fonctionnement allostérique de l'hémoglobine ; (3) ces résultats pourraient, selon les auteurs, avoir un bénéfice thérapeutique comme substitut du sang s'il se confirmait que les solutions de SNO-Hb étaient dépourvues d'effet vasoconstricteur.

C.P.
E.B.

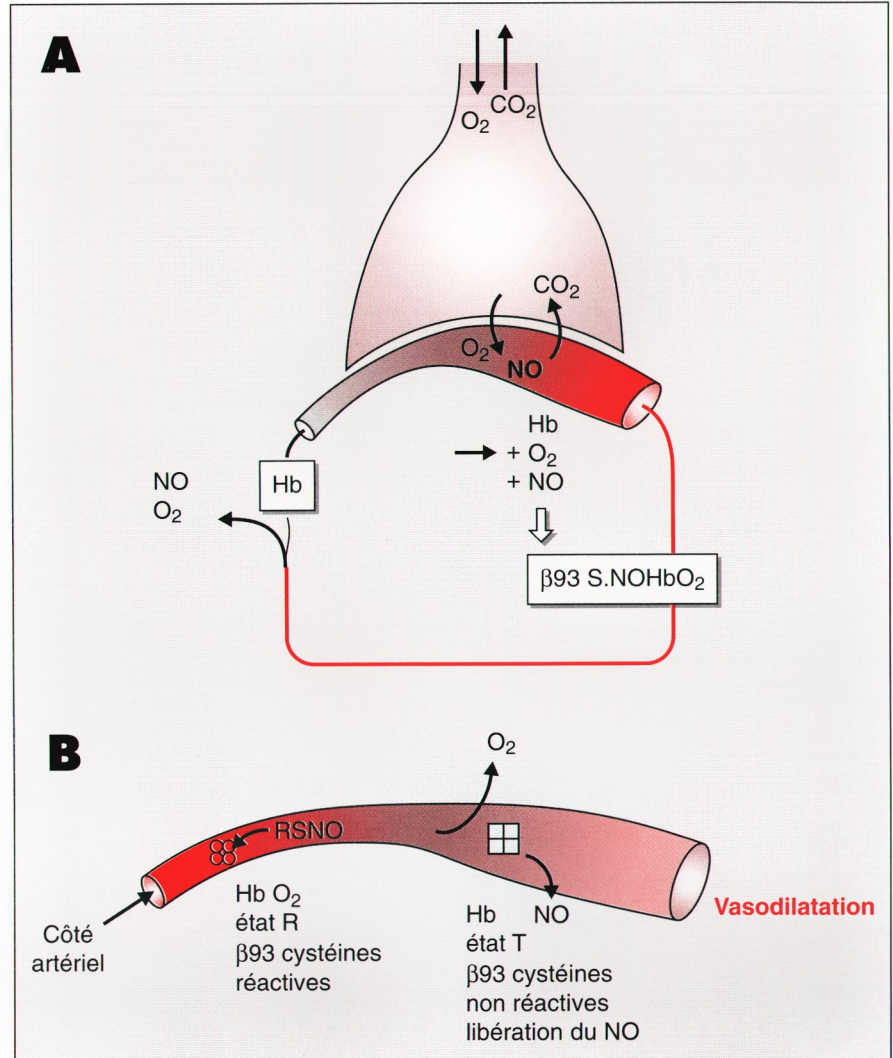


Figure 2. **Transport sanguin du NO.** **A.** Lors du passage alvéolaire le sang s'enrichit en O₂ (l'hémoglobine est en état R de forte affinité) et libère du CO₂. Il se charge aussi en NO qui se lie sur deux sites de la molécule d'hémoglobine oxygénée: sur l'atome de fer dont l'affinité pour le NO est très importante, mais le NO réagit aussi avec l'atome de soufre (S) du résidu cystéinyl β93. **B.** Au niveau capillaire, la libération de l'O₂ entraîne une modification conformationnelle de l'hémoglobine (R → T) qui modifie l'environnement de la cystéine β93 et permet la libération du NO. Celui-ci est vraisemblablement transféré au groupe thiol du glutathion, très abondant dans le globule rouge (5 mM), avant d'aller exercer ses effets vasodilatateurs dans la microcirculation.

1. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996; 380: 221-6.
2. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and redox-activated forms. *Science* 1992; 258: 1898-902.
3. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 444-8.
4. Gaston B, Reilly J, Drazen JM, et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10957-61.