

## Etude des interactions entre les phénotypes majeurs de l'haptoglobine et l'hémoglobine

### Study of interactions between the major phenotypes of haptoglobin and haemoglobin

Guèye P.M<sup>1\*,(2)</sup>, Kane M.O<sup>2,3</sup>, N Diaye R<sup>(1)</sup>, Diop P.A<sup>(1)</sup>, Lessinger J.M<sup>(2)</sup>.

#### Résumé :

L'étude de l'interaction entre les phénotypes majeurs de l'haptoglobine (Hp) et l'hémoglobine humaine (Hb) a été réalisée par deux approches : une méthode enzymatique basée sur le pouvoir peroxydasique du complexe haptoglobine-hémoglobine à pH 4,0, et une méthode physique, la microcalorimétrie. Les résultats de l'interaction de l'Hp avec l'Hb humaine en spectrophotométrie (méthode enzymatique) ont permis la détermination des constantes de dissociation apparentes suivantes : Hb-Hp 1-1 ( $2,5 \pm 0,5 \times 10^{-6}$  mol/L), Hb-Hp 2-1 ( $3,1 \pm 0,5 \times 10^{-6}$  mol/L) Hb-Hp 2-2 ( $6,7 \pm 1,0 \times 10^{-6}$  mol/L). Ces résultats ont montré des différences d'affinité selon le phénotype: Hp 1-1 > Hp 2-1 > Hp 2-2. Par ailleurs, les résultats obtenus avec la méthode microcalorimétrique ont montré que la variation d'enthalpie est significativement plus importante lors de la formation du complexe Hb-Hp 2-2 avec des valeurs de variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ) de l'ordre de - 24, - 29 et - 48 kcal/mol pour le phénotype Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2, respectivement. L'ensemble de ces résultats a permis de constater que les phénotypes d'haptoglobine interagissaient de manière différente avec l'hémoglobine, ce qui peut expliquer en partie les différences rapportées concernant l'influence des phénotypes d'Hp vis-à-vis des pathologies liées au métabolisme de l'Hb extra-érythrocytaire.

#### Mots-Clés :

Phénotypes d'haptoglobine ; hémoglobine ; microcalorimétrie ; Pouvoir peroxydasique ; affinité.

#### Abstract:

The interaction between human haemoglobin (Hb) and each of three major haptoglobin (Hp) phenotypes was carried out by two approaches: an enzymatic method based on peroxydasic capacity of haptoglobin-haemoglobin complex at pH 4,0, and a microcalorimetry method. Interaction results obtained by spectrophotometry method (enzymatic method) showed apparent constants of dissociation: Hb-Hp 1-1 ( $2,5 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ ), Hb-Hp 2-1 ( $3,1 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ ) Hb-Hp 2-2 ( $6,7 \pm 1,0 \times 10^{-6}$ ). These results showed differences in affinity according to phenotype: Hp 1-1, Hp 2-1 and Hp 2-2. In addition, results obtained with microcalorimetric method showed that variation of enthalpy is significantly more important at the formation of Hb-Hp 2-2 complex with variation values of enthalpy ( $\Delta H$ ) about - 24, - 29 and - 48 kcal/mol for phenotype Hp 1-1, Hp 2-1, and Hp 2-2, respectively. Our results suggested that haptoglobin phenotypes interacted differently with haemoglobin, explaining differences in involvement Hp phenotypes in pathologies of extracellular Hb metabolism.

#### Key word :

haptoglobin phenotypes ; extracellular hemoglobin ; microcalorimetry ; peroxydasic capacity ; affinity.

## 1. Introduction

L'haptoglobine (Hp) est une glycoprotéine dont la concentration plasmatique augmente dans les syndromes inflammatoires et diminue au cours des hémolyses. Comme son nom l'indique (haptein = bind = fixer), son rôle est de fixer l'hémoglobine libérée

lors d'épisodes hémolytiques. Elle a été découverte en 1938 par Polonovski et Jayle (Polonovski *et al.*, [1]), puis Smithies découvrit plus tard ses variants génétiques (Smithies [2]). L'Hp est synthétisée par le foie et fixe avec une grande affinité l'hémoglobine libre (Hb) pour former un

<sup>1\*</sup> **Correspondant** : Dr Papa Madieye Guèye, Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique, Faculté de médecine, pharmacie et odontostomatologie, UCAD, Dakar, Sénégal, BP 45701 Dakar Fann. Tél: +221.77.427.72.12, Fax : + 221.33.825.29.52, E-mail: [gmadieye@yahoo.fr](mailto:gmadieye@yahoo.fr).

<sup>2</sup> Institut Gilbert Laustriat, UMR 7175 CNRS, Université Louis Pasteur (Strasbourg I), Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France.

<sup>3</sup> Laboratoire de Physiologie Pharmaceutique, Faculté de médecine pharmacie et odontostomatologie, UCAD, Dakar, Sénégal.

complexe stable (Hp-Hb) (McCormick *et al.*, [3]). Ce dernier peut se former aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et possède une activité peroxydasique (Jayle [4]). Sur le plan de la structure primaire, plusieurs auteurs ont rapporté une analogie structurale entre la chaînes  $\beta$  de l'Hp et la famille des sérines protéases, groupe d'enzymes protéolytiques incluant la trypsine, la chymotrypsine, la thrombine, la plasmine, l'élastase et quelques facteurs du complément (Kurosky *et al.*, [5], Arcaleo et Greer [6]). Ainsi, les acides aminés en position 57 (His) et 195 (Ser) nécessaires à l'activité des sérines protéases sont remplacés dans la chaîne  $\beta$  par une lysine et une alanine, respectivement (Kurosky *et al.*, [5] ; Arcaleo et Greer, [6]).

Trois phénotypes majeurs de l'Hp ont été identifiés par électrophorèse sur gel d'amidon et dénommés : Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2 (Smithies [2]). Les phénotypes d'Hp présentent des différences sur le plan structural en rapport avec d'importantes différences fonctionnelles (Bowman *et al.*, [7] ; Langlois *et al.*, [8]). L'hétérogénéité des phénotypes d'Hp est due aux variations au niveau des chaînes alpha :  $\alpha 1$  (8.9 kDa) et  $\alpha 2$  (16 kDa). La chaîne  $\alpha 1$  est unique au phénotype Hp 1-1 comme l'est la chaîne  $\alpha 2$  pour le phénotype Hp 2-2. La chaîne  $\beta$  (40 kDa) est quant à elle identique pour tous les phénotypes d'Hp et est porteuse de groupements glucidiques variables (Ang *et al.* [9]). Ces derniers influencent la fixation de l'hémoglobine ainsi que d'autres propriétés de l'Hp. En effet, des changements dans leur structure ont été associés avec le développement de nombreux états pathologiques incluant le cancer, des maladies inflammatoires et maladies du foie (Mann *et al.*, [10] ; Katnik *et al.* [11] ; Ang *et al.*, [9]).

L'hémoglobine normale du sujet adulte est également un tétramère composé de 2 sous-unités  $\alpha$  et de 2 sous-unités  $\beta$ . En solution, le tétramère est en équilibre dynamique avec les 2 dimères  $\alpha\beta$  (Perutz [12]).

Plusieurs études ont montré que chaque dimère  $\alpha\beta$  de l'Hb peut se fixer sur une chaîne lourde  $\beta$  de l'Hp et que la chaîne légère  $\alpha$  de l'Hp ne semble pas intervenir dans cette liaison (Bernini *et al.*, [13]). Comme nous l'avons indiqué par ailleurs, l'Hp humaine présente trois phénotypes majeurs (Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2) et les principales fonctions biologiques de l'Hp (fixation de l'hémoglobine, activité anti-oxydante, inhibition de la synthèse des prostaglandines, effet angiogénique) ont été décrites comme variables en fonction du phénotype considéré (Langlois *et al.* [8]). De même, des conséquences cliniques décrits comme phénotypes dépendants ont été rapportées en relation avec l'importance de l'Hp dans le métabolisme du fer dans certaines situations pathologiques incluant l'hémochromatose, le stress oxydant, les maladies cardiovasculaires et les maladies infectieuses (Tolasano *et al.* [14]). Des hypothèses pour expliquer ces différences ont été avancées, en rapport avec d'une part des différences d'affinités entre les phénotypes d'Hp et l'Hb et/ou des différences d'affinités des complexes Hp-Hb pour le récepteur CD 163, et d'autre part des différences entre le pouvoir antioxydant des phénotypes d'Hp (Kristansen *et al.*, [15] ; Melamed-Franck *et al.*, [16] ; Asleh *et al.*, [17]). Notre objectif a été de comparer l'interaction de l'hémoglobine avec chacun des trois phénotypes majeurs de l'haptoglobine par deux approches complémentaires, l'une enzymatique à travers le pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb, l'autre physique en microcalorimétrie.

## 2. Matériels et Méthodes

L'Hp a été purifiée à partir de plasmas phénotypés. L'hémoglobine utilisée a été d'origine humaine (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA).

### 2.1. Spécimens

Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur héparinate de lithium. Les prélèvements ont été immédiatement centrifugés après recueils et les plasmas ont été séparés des

culots de globules rouges. Ils ont été ensuite immédiatement traités ou conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

### 2.2. Phénotypage de l'haptoglobine

Le phénotypage a été réalisé selon la méthode de Raymond (Raymond [18]). Brièvement, après une préincubation des spécimens avec un excès d'hémoglobine humaine purifiée à partir d'un hémolysat, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (à 5%, à pH 8,4 et 2h de migration sous un voltage constant de 200 V) a ensuite été effectuée. Après la migration, les bandes caractéristiques des phénotypes d'Hp ont été visualisées grâce à leur pouvoir peroxydasique en plaçant les gels dans une solution acétique d'orthodanisidine pendant 2h. Après incubation, une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3% (v/v) préparée extemporanément a été ajoutée, ce qui a provoqué l'apparition de bandes jaune brun dont le nombre et la position sont caractéristiques des phénotypes d'Hp.

### 2.3. Purification de l'haptoglobine humaine

Pour chaque séquence de purification, 10 à 15 mL de plasma hépariné provenant d'un prélèvement sanguin réalisé chez un patient préalablement typé ont été utilisés. La purification de l'haptoglobine a été réalisée par FPLC selon la méthode décrite par Gueye et al. [19]).

Pour les différentes séquences de purification réalisées, le rendement a été voisin de 65% avec une pureté de l'ordre de 98%. L'absence de protéines contaminantes a été vérifiée à partir de deux gels sur lesquels ont été déposés 6 échantillons d'haptoglobine purifiée. Après migration, l'un des gels a été mis dans la solution acétique de di... de révéler les... gel a été coloré... permettant de c... protéine. L'examen visuel comparatif des 2 gels n'a pas montré de spot supplémentaire

à ceux de l'haptoglobine permettant de conclure à l'absence de protéines contaminantes détectables par cette technique. L'absence de dénaturation de l'haptoglobine au cours de la purification été appréciée grâce à l'étude de son pouvoir peroxydasique.

Après purification, la concentration massique de chaque solution d'Hp a été déterminée par une méthode immunonéphélométrique utilisant un automate Image (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) avec les réactifs du fabricant. Puis les concentrations massiques ainsi déterminées ont été transformées en concentrations molaires en utilisant les masses molaires déterminées par gel filtration au cours de chaque séquence de purification comme décrit par Gueye et al. [19]. Enfin, ces concentrations molaires ont été vérifiées en utilisant les coefficients d'extinction molaire déterminés par Rademacher *et al.*, [20] ; c'est à dire 10,2 ; 11,8 ; 13,3 x 10<sup>4</sup> L.M<sup>-1</sup> pour les phénotypes Hp 1-1 ; Hp 2-1 ; et Hp 2-2 respectivement.

### 2.4. Détermination des constantes d'équilibre de dissociation grâce au pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb

Des essais préliminaires ont été réalisés pour déterminer la concentration d'Hp minimale à utiliser dans la réaction Hp/Hb suivie par la mesure du pouvoir peroxydasique du complexe en cinétique. La concentration de 10<sup>-7</sup> mol/L a été identifiée comme étant la concentration optimale, quel que soit le phénotype, permettant de suivre en cinétique à pH 4,0 la formation du complexe Hp-Hb en présence de concentrations variables en Hb, selon la méthode de Standing et Price modifiée (Standing et Price [21]). L'Hp à la

J. Sci. Technol.

$$([Hp] + [Hb] + K_d) - \sqrt{([Hp] + [Hb] + K_d)^2 - 4 [Hp][Hb]} \quad (1)$$

et de peroxyde d'hydrogene a pH 4,0.

Dans ces conditions, seul le pouvoir peroxydasique de l'Hb complexée à l'Hp a été mesuré (Connell et Smithies [22]), avec une variation d'absorbance liée à la formation du tétraguaiacol proportionnelle à l'activité peroxydasique du complexe. Pour chaque phénotype considéré, 12 dilutions d'une solution d'hémoglobine avec des concentrations comprises entre 0,7 et 62  $\mu\text{mol/L}$  ont été testées et pour chaque concentration d'hémoglobine, 4 mesures ont été réalisées indépendamment les unes des autres.

L'haptoglobine et l'hémoglobine ont été diluées dans un tampon Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5. 100  $\mu\text{L}$  d'une solution d'Hp (2  $\mu\text{mol/L}$ ) ont été additionnés à 100  $\mu\text{L}$  d'une solution d'hémoglobine humaine de concentration variable. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, 100  $\mu\text{L}$  du mélange ont été transférés dans une cuvette thermostatée à 37°C contenant 1 mL d'une solution de guaiacol (0,3 mol/L) dans un tampon acétate (0,175 mmol/L), pH 4,0. Après 10 min d'incubation, la réaction a été initiée par addition de 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de peroxyde d'hydrogène 0,12% (w/v) fraîchement préparée, et la variation d'absorbance  $\Delta A/\text{min}$  a été suivie en continu à 470 nm pendant 5 minutes avec un spectrophotomètre Uvikon 922 (Kontron Inst, Montigny le Bretonneux, France). Les données obtenues ont été analysées par régression non-linéaire en vue de la détermination de la meilleure estimation de la constante apparente d'équilibre de dissociation ( $K_d$ ) en utilisant l'équation (1). Cette équation, classiquement utilisée dans l'étude des interactions réversibles protéine-protéine (Easson et Stedman [23]; Straus et Goldstein [24]; Bieth, [25]), a été appliquée à notre système expérimental sous la forme suivante :

Où :  $\Delta A/\text{min}$  est la variation d'absorbance par min mesurée pour une concentration donnée en hémoglobine,  $\Delta A/\text{min}_{\text{max}}$  est la variation d'absorbance par minute obtenue pour une concentration saturante en hémoglobine. [Hp] désigne la concentration en haptoglobine et [Hb] désigne la concentration en hémoglobine.

## 2.5. Calorimétrie par titration isotherme (ITC)

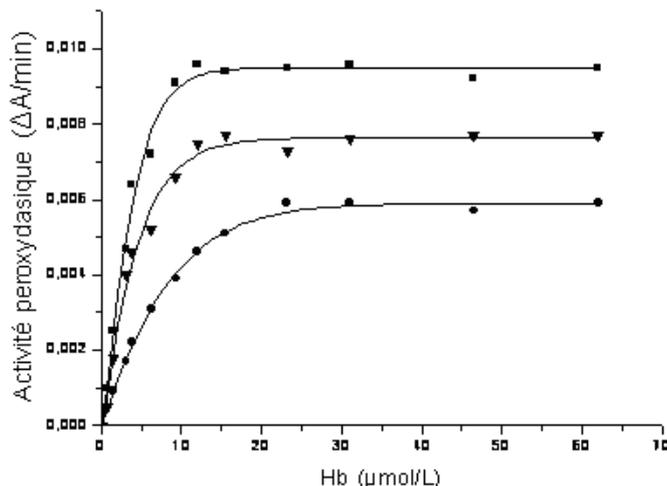
Nous avons mis en œuvre cette technique en utilisant un microcalorimètre à compensation thermique (modèle VP-ITC de Microcal Inc., Northampton, MA, USA). Les investigations calorimétriques de la réaction entre l'hémoglobine et chacun des trois phénotypes d'Hp ont été réalisées à 25°C dans un tampon Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5, contenant de 100 mmol/L NaCl). 1,4 ml de solution tamponnée d'haptoglobine (1  $\mu\text{mol/L}$ ) ont été placés dans la cellule de mesure alors que la cellule référence a été remplie par du tampon seul. L'hémoglobine dissoute dans le même tampon a été placée dans la seringue motorisée du système. Après que le système ait atteint son équilibre thermique (10-20 min) et enregistrement pendant 3-5 min de la ligne de base, la solution d'hémoglobine a été injectée sous forme d'incrément successifs de 3  $\mu\text{l}$  dans la solution d'haptoglobine. Une agitation continue du milieu réactionnel a été maintenue à vitesse constante durant toute l'expérience. Le contrôle du système de mesure, l'acquisition et l'analyse des données ont été réalisés avec les logiciels VP viewer® et Origin® fournis par le fabricant du microcalorimètre.

## 3. Résultats

### 3.1. Constantes d'équilibre de dissociation apparentes par la méthode enzymatique

La formation des complexes Hp-Hb a été quantifiée par leur activité peroxydasique pour chacun des trois phénotypes d'Hp en présence de concentrations croissantes d'hémoglobine. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 1.

permis de constater que l'interaction était exothermique. L'allure des courbes de titration de l'Hp par l'hémoglobine a montré que les données obtenues ne permettaient pas une détermination des constantes d'équilibre de dissociation



**Figure 1 :** Activité peroxydasique des complexes Hp-Hb. Hp 1-1 (■) Hp 2-1 (▼) Hp 2-2 (●). Chaque phénotype d'Hp à la concentration de  $10^{-7}$  mol/L a été incubé avec des concentrations croissantes d'Hb. Les variations d'absorbance ont été suivies à 470 nm pendant 5 min après addition de 100 μL de peroxyde d'hydrogène 0,12% (w/v). Chaque point représente la moyenne de 4 mesures réalisées indépendamment. Les courbes représentées ont été générées avec l'équation 6 et les meilleures estimations de  $K_d$ .

La meilleure estimation de la constante d'équilibre de dissociation ( $K_d$ ) du complexe formé entre chaque phénotype d'haptoglobine et l'hémoglobine a été déterminée par régression non-linéaire à partir des données expérimentales représentées dans la figure 1 en utilisant l'équation (1). Les valeurs sont présentées au tableau I. Les résultats ont montré que les affinités des phénotype Hp 1-1 et Hp 2-1 sont statistiquement significativement supérieures à celle du phénotype Hp 2-2.

**Tableau I :** Constantes d'équilibre de dissociation apparentes des complexes formés entre les phénotypes d'haptoglobine et l'hémoglobine

Type de complexe	Constantes de dissociation $K_d$ (mol/L)
Hb-Hp 1-1	$2,5 \pm 0,5 \times 10^{-6}$
Hb-Hp 2-1	$3,1 \pm 0,5 \times 10^{-6}$
Hb-Hp 2-2	$6,7 \pm 1,0 \times 10^{-6}$

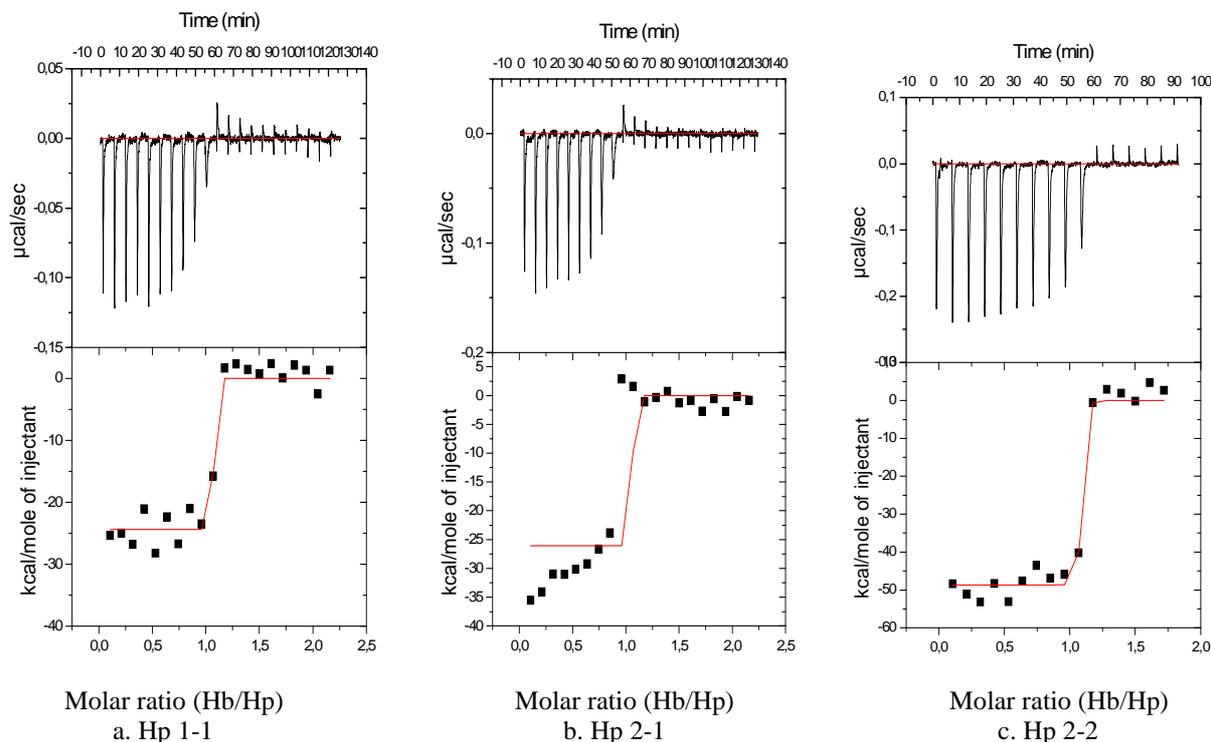
### 3.3.2. Investigation en microcalorimétrie

Des essais préliminaires réalisés à pH 7,5 de l'interaction de l'Hp avec l'Hb ont

(Figure 2). En effet, les courbes de titration de l'haptoglobine par l'hémoglobine traduisaient une fixation "pseudo-irréversible" de l'Hb par l'Hp dans nos conditions expérimentales. Par conséquent, il était impossible de déterminer des constantes d'équilibre de dissociation dans ces conditions. Des résultats fiables n'ont pas pu être obtenus, malgré des tentatives d'optimisation des conditions de réalisation des mesures (diminution des concentrations des protéines et des volumes injectés). La seule information qui a pu être déduite des expériences réalisées a été que la constante d'équilibre de dissociation était au moins inférieure à  $10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup>. Les quantités de chaleur totale obtenues dans nos conditions opératoires ont permis de calculer des valeurs de variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ) de l'ordre de -24, -29 et -48 kcal/mol pour le phénotype Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2, respectivement. Ces données montrent que la réaction entre l'hémoglobine et le phénotype Hp 2-2 est significativement plus

exothermique que celle entre l'hémoglobine et les deux autres phénotypes (Figure 2).

trois phénotypes d'Hp que nous avons purifié à partir de plasmas humains. La



**Figure 2 :** Courbes de titration des phénotypes d'haptoglobine par l'hémoglobine.

L'haptoglobine (1  $\mu\text{mol/L}$ ) placée dans la cellule de mesure a été titrée par addition de 3  $\mu\text{L}$  d'une solution d'hémoglobine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) placée dans la seringue. L'acquisition des données, le contrôle des instruments ont été réalisées avec le logiciel VP viewer® et l'analyse des données par le logiciel Origin®.

#### 4. Discussion

Plusieurs approches ont été utilisées pour suivre l'interaction Hp/Hb, qui s'avère relativement difficile à étudier du fait de l'affinité élevée de l'haptoglobine pour l'hémoglobine (Bowman et Kurosky, [7] ; Langlois et Delanghe, [8] ; Asleh [17]). Ces approches incluent des techniques de "quenching" de fluorescence, d'électrophorèse, de calorimétrie, par titration et de résonance plasmonique de surface (Nagel *et al.*, [26] ; Adams et Weiss, [27] ; Lavielle *et al.*, [28] ; Arcoletto et Greer, [6] ; Okazaki *et al.* [29] ; Asleh *et al.* [30]). Les résultats des paramètres de l'interaction obtenus à partir de ces différentes méthodes ne sont pas très précis du fait de la forte affinité entre les deux protéines (Asleh *et al.*, [30].).

L'interaction de l'haptoglobine avec l'hémoglobine a été étudiée au cours de ce travail par deux approches pour chacun des

première approche a utilisé une méthode enzymatique (permettant de travailler avec de faibles concentrations) basée sur le pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb à pH 4,0. Le traitement des données expérimentales relatives à la variation du pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb nous a permis de déterminer des constantes d'équilibre de dissociation apparentes de  $2,5 \pm 0,5$ ,  $3,0 \pm 0,5$  et  $6,7 \pm 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ , pour Hp1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2, respectivement. Ces résultats montrent que le phénotype Hp 2-2a une affinité significativement plus faible pour l'hémoglobine que les phénotypes Hp 1-1 et Hp 2-1. Les constantes d'équilibre de dissociation ont été déterminées à partir des résultats d'interactions haptoglobine/hémoglobine réalisées à pH acide pour ne mesurer que le pouvoir peroxydasique lié à la formation de complexes Hp-Hb et éviter toute interférence par l'hémoglobine non

liée. Cependant, ce pH n'est pas compatible avec un état physiologique. Ainsi, les constantes d'équilibre de dissociation déterminées à pH 4,0 ne peuvent correspondre à des constantes d'équilibre gouvernant l'interaction des deux protéines *in vivo*. Néanmoins, elles peuvent être utilisées pour comparer l'affinité des trois phénotypes d'Hp pour l'hémoglobine *in vitro*. Les valeurs des constantes d'équilibre de dissociation apparentes que nous avons déterminées correspondent à des affinités plus faibles que celles décrites dans la littérature où l'on trouve des valeurs allant de  $10^{-10}$  à  $10^{-16}$  mol.L<sup>-1</sup>, estimées ou déterminées dans des conditions opératoires différentes et avec des méthodes différentes, donc difficilement comparables. A titre d'exemple, Hwang et Greer ont étudié la réaction de fixation de l'Hp avec des chaînes alpha d'Hb par "quenching" de fluorescence. Ils ont déterminé des constantes d'équilibre de dissociation de  $0,6 \cdot 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, et partant de là, ont estimé que la constante d'équilibre de dissociation du complexe Hp-Hb devrait être de l'ordre  $10^{-15}$  mol.L<sup>-1</sup> à pH 7,4 (Hwang et Greer [31]). Ces mêmes auteurs avaient auparavant montré que les valeurs des constantes d'équilibre de dissociation de la réaction des chaînes alpha de l'Hb avec l'Hp variaient en fonction du pH d'un facteur de 100 avec un minimum de  $0,16 \cdot 10^{-6}$  à pH 6 et un maximum de  $0,16 \cdot 10^{-4}$  à pH 9,5 en suivant la réaction de fixation d'une chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine avec l'Hp par une méthode de "quenching" de fluorescence (Hwang et Greer [32]). D'autres auteurs, grâce à une méthode de résonance plasmonique de surface (SPR) utilisant comme appareillage le Biacore®, ont trouvé des constantes de dissociation de l'ordre  $10^{-10}$  mol.L<sup>-1</sup> (Asleh *et al.*, [30]). Il découle de ce qui précède que les constantes de dissociation disponibles sont des constantes de dissociation apparentes ; elles dépendent des conditions opératoires utilisées et ne peuvent en aucun cas être comparées. Dans nos conditions (pH acide), l'affinité entre les deux protéines pourrait

être abaissée ce qui expliquerait les différences entre les valeurs déterminées et celles de la littérature (Adams et Weiss [27]). Ces différences nous ont amené à vouloir confirmer nos résultats obtenus à pH 4,0 par une autre approche que celle basée sur le pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'interaction haptoglobine/hémoglobine à pH 4,0 en calorimétrie. Les essais réalisés n'ont pas été concluants car l'hémoglobine à ce pH a été dénaturée (Cassatt et Steinhardt, [33] ; Sasazuki *et al.* [34]). Cette dénaturation a été caractérisée par un changement de coloration de la solution de titrage et l'absence de pics lors de son injection à la solution d'Hp. La discordance entre l'absence de signal en microcalorimétrie et les résultats que nous avons obtenus par la mesure de l'activité peroxydasique, peut être liés aux conditions expérimentales utilisées. En effet, lors de l'étude du pouvoir peroxydasique des complexes Hp-Hb, l'hémoglobine a été incubée en présence d'Hp à pH 7,5, avant que 100  $\mu$ L de mélange ne soient transférés dans 1 mL de tampon acétate pH 4,0 pour la mesure de l'activité peroxydasique. Or il a été rapporté que la fixation de l'Hb à l'Hp prévient la dénaturation de l'Hb à pH acide (Adams et Weiss [27] ; Sasazuki *et al.*, [34]). En microcalorimétrie, il est indispensable que les tampons utilisés pour la solution titrante et la solution titrée soient identiques, mais un pH de 4,0 n'est pas compatible avec la conservation des propriétés biologiques de l'hémoglobine. L'étude de l'interaction de l'hémoglobine avec l'haptoglobine en microcalorimétrie à pH 7,5 nous a montré que la formation du complexe Hp-Hb était exothermique comme précédemment rapporté par Adams et Weiss (Adams et Weiss [27]). Cependant, le traitement des données issues de ces expériences n'a pas permis de déterminer des valeurs de constantes d'équilibre de dissociation avec une précision suffisante afin de les comparer avec celles trouvées par la méthode utilisant

l'activité peroxydasique du complexe Hp-Hb. En effet, la courbe de titration calorimétrique de l'haptoglobine par l'hémoglobine à pH 7.5 suggère une association pseudo-irréversible entre les deux partenaires, ce qui est incompatible avec une détermination fiable des constantes de dissociation. D'autres essais complémentaires, utilisant différentes conditions opératoires portant sur les concentrations d'Hb, d'Hp et les volumes d'injections, ne nous ont pas permis de réaliser la saturation de l'Hp de manière progressive. L'aspect de ces courbes de titration nous suggère cependant que les constantes de dissociation sont au moins inférieures à  $10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> à pH 7,5. Après avoir identifié des conditions d'analyses optimales, nous avons pu déterminer la variation de quantité de chaleur au cours de la formation du complexe Hp-Hb pour chaque phénotype d'Hp. La variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ) constitue un paramètre thermodynamique de la réaction. En effet, pour des interactions correspondant à de fortes affinités comme celle de la réaction Hp-Hb, la valeur de  $\Delta H$  peut être directement mesurée comme la valeur plafond du profil de variation de quantité de chaleur échangée (Wiseman et al. [35]; Jelesarov *et al.*, [36]). Dans nos conditions, des variations d'enthalpie ( $\Delta H$ ) de -24, -29 et -48 kcal/mol ont été déterminées à 25°C pour les phénotypes Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2, respectivement. D'autres auteurs ont rapporté des constantes de dissociation de l'ordre de  $10^{-10}$  mol.L<sup>-1</sup> (Asleh *et al.*, [30]) sans indiquer de valeur de  $\Delta H$  de l'interaction Hp-Hb, valeurs en principe accessibles par la technique utilisée (résonance plasmonique de surface). De telles valeurs auraient pu nous permettre de les comparer avec celles que nous avons déterminées, même si les valeurs de  $\Delta H$  issues des techniques différentes doivent être comparées avec prudence. En effet, la résonance plasmonique de surface et la microcalorimétrie sont basées sur des principes différents pour la détermination

des paramètres d'interactions moléculaires (Zuber [37]).

## 5. Conclusion

Nous avons étudié l'interaction de l'hémoglobine avec chacun des trois phénotypes majeurs de l'haptoglobine par deux approches. La première a consisté à la détermination des constantes d'équilibre de dissociation grâce à l'utilisation du pouvoir peroxydasique à pH 4,0 du complexe formé. Les constantes de dissociation obtenues à ce pH (certes non compatible avec des conditions physiologiques), nous ont permis de comparer les affinités de l'hémoglobine avec chaque phénotype d'Hp. A ce pH, les phénotypes Hp 1-1 et Hp 2-1 se sont révélés capables de fixer l'hémoglobine avec une affinité significativement plus élevée que le phénotype Hp 2-2. La deuxième approche a utilisé la titration en microcalorimétrie à pH neutre. Les résultats obtenus par cette méthode confirment que les constantes d'équilibre de dissociation de la réaction sont au moins supérieures à  $10^{-8}$  L.mol<sup>-1</sup>. Cette technique nous a également permis de déterminer les variations de quantité globale de chaleur dégagée lors de l'interaction de l'hémoglobine avec chacun des trois phénotypes d'haptoglobine. Les résultats obtenus nous indiquent que la variation d'enthalpie est significativement plus importante lors de la formation du complexe Hb-Hp 2-2 que lors de la formation des complexes Hb-Hp 2-1 et Hb-Hp1-1.

## 6. Bibliographie

- [1] Polonovski M., Jayle M.F. Existence dans le plasma humain d'une substance activant l'activité peroxydasique de l'hémoglobine. C R Soc Biol, 1938, **129** : 457-461.
- [2] Smithies O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal humans adults. Biochem J, 1955, **61** (4): 629-641.

- [3] McCormick D.J., Atassi M.Z. Hemoglobin binding with haptoglobin: delineation of the haptoglobin binding site on the alpha-chain of human haemoglobin. *J Protein Chem*, 1990, **9** (6) : 735-742.
- [4] Jayle M.F. Méthode de dosage de l'haptoglobine sérique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33** (7) : 876-880.
- [5] Kurosky A., Barnett D.R., Lee T.H., Touchstone B., Hay R.E., Arnott M.S., Bowman B.H., Fitch W.M. Covalent structure of human haptoglobin : a serine protease homolg. *Proc Natl Acad Sci*. 1980, **77** (6): 3388-3392.
- [6] Arcolego, J.P., Greer, J. (1982). Hemoglobin binding site and its relationship to the serine protease-like active site of haptoglobin. *J Biol Chem* **257** (17): 10063-10068
- [7] Bowman B.H., Kurosky A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv Hum Genet*, 1982, **12**: 189-261.
- [8] Langlois M.R., Delanghe J.R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem*, 1996, **42** (10): 1589-1600.
- [9] Ang I.L., Poon T.C., Lai P.B., Chan A.T., Ngai S.M., Hui A.Y., Johnson P.J., Sung J.J. Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycol-proteomic approach. *J Proteome Res.*, 2006, **5** (10): 2691-2700.
- [10] Mann A.C., Record C.O., Self C.H., Turner G.A. Monosaccharide composition of haptoglobin in liver disease and alcohol abuse *Clin Chim Acta*, 1994, **227** (1-2) : 68-78.
- [11] Katnik I., Goodarzi M.T., Turner G.A. An improved ELISA for the determination of sialyl lewis (x) structures on purified glycoconjugates. *Glycoconj J*, 1996, **13** (6): 1043-1047.
- [12] Perutz M.F. Structure and function of haemoglobin: a tentative atomic model of horse oxyhaemoglobin. *J Mol. Biol*, 1965, **13**: 646-668.
- [13] Bernini L.F., Borri-Voltattorni C. Studies on the structure of human haptoglobins. *Biochim Biophys Acta*, 1970, **200** (2): 203-219.
- [14] Tolasano E., Fagoonee S., Garuti C., Andrews N.C., Altruda F., Pietrangelo A. Haptoglobin modifies the hemochromatosis phenotype in mice. *Blood* 2005, **105**: 3353-3355.
- [15] Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law SK., Moestrup SK. Identification of the hemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 2001, **409** (6817) : 198-201.
- [16] Melamed-Frank M., Lache O., Enav B.I., Levy N.S., Ricklis R.M. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood*, 2001, **98** (13): 3693-3698.
- [17] Asleh R., Marsh S., Shilkrut M., Binah O., Guetta J., Lejbkowitz F., Levy NS., Levy AP. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ Res*, 2003, **92** (11): 1193-1200.
- [18] Raymond S.A convenient apparatus for vertical gel electrophoresis. *Clin Chem*, 1962, **8** : 455-470.
- [19] Gueye P.M., Glasser N., Ferard G., Lessinger JM. Influence of human haptoglobin polymorphism on oxidative stress induced by free hemoglobin on red blood cells. *Clinical Chemistry*

- Laboratory Medicine 2006, **44** (5): 542-547.
- [20] Rademacher B.E., Steele W.J. A general method for the isolation of haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 from human plasma. *Anal Biochem.* 1987; **160** (1) : 119-126.
- [21] Standing S., Price C.P. A kinetic method for the determination of haptoglobin as haemoglobin binding capacity. *Clin Chim Acta*, 1976, **66** (3): 393-403.
- [22] Connell G.E., Smithies O. Human haptoglobins: estimation and purification. *Biochem J*, 1959, **72** (1): 115-121.
- [23] Easson L.H., Stedman E. The absolute activity of cholinesterase. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1936, **121** : 142–164.
- [24] Straus O.H., Goldstein A. Zone behavior of enzymes. Illustrated by the effect of dissociation constant and dilution on the system cholinesterase-physostigmine. *J. Gen. Physiol.* ,1943, **26**, 559-585.
- [25] Bieth J. Some kinetic consequences of the tight binding of protein-proteinase-inhibitors to proteolytic enzymes and their application to the determination of dissociation constants. Bayer-symposium V “proteinase inhibitors”, 1974, 463-469 by Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- [26] R. Kinetics and mechanism of complex formation between hemoglobin and haptoglobin. *J Biol Chem* 1967 **242** (2) : 3428-3434.
- [27] Adams E.C., Weiss M.R. Calorimetric studies of the haemoglobin-haptoglobin reaction. *Biochem J*, 1969, **115** (3) : 441-447.
- [28] Lavielle, F., Rogard, M., Alfsen, A. Calorimetric determination of the enthalpy and heat capacity changes for the association of haptoglobin with hemoglobin. I. Demonstration of two interacting systems. *Biochemistry* 1974; **13** (10) : 2231-2234.
- [29] Okazaki, T., Yanagisawa, Y., Nagai, T. Determination of intermediates of hemoglobin-haptoglobin complex of haptoglobin polymers by “Crossed hemoglobin electrophoresis”. *Anal Biochem* 1996; **239** (2) : 123-129.
- [30] Asleh R., Guetta J., Litman S.K., Lotan R.M., Levy A.P. Haptoglobin genotype and diabetes-dependent differences in iron-mediated oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Circ Res* 2005, **96** (4): 435-441.
- [31] Hwang P.K., Greer J. Interaction between hemoglobin subunits in the hemoglobin-haptoglobin complex. *J Biol Chem*, 1980, **255** (7): 3038-3041.
- [32] Hwang P.K., Greer J. Identification of residues involved in the binding of hemoglobin alpha chains to haptoglobin. *J Biol Chem*, 1979, **254** (7): 2265-2270.
- [33] Cassatt J.C., Steinhardt J. Effects of pH on the rate of acid denaturation of horse oxy-deoxy-, and other ferro-hemoglobins. *Biochemistry*, 1971, **10** (2): 264-269.
- [34] Sasazuki T., Tsunoo H., Nakajima H. Interaction of human hemoglobin with haptoglobin or antihemoglobin antibody. *J Biol Chem*, 1974, **249** (8): 2441-2446.
- [35] Wiseman T., Williston T., Lin L.N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem*, 1989, **179** (1): 131-137.

- [36] Jelesarov II., Leder L., Bosshard H.R. Probing the Energetics of Antigen-Antibody Recognition by Titration Microcalorimetry. *Methods*, 1996, **9** (3): 533-541.
- [37] Zuber E. (1997). Approche biométrique de la dynamique des réactions antigènes-anticorps. Cas de deux systèmes automatisés de suivi en temps réel des cinétiques. Thèse Université Claude Bernard, Lyon, France.