

***L* La désoxygénation du milieu ambiant était-elle la fonction première de l'hémoglobine ?**

Considérées comme étant parmi les mieux connues des protéines, les hémoglobines (Hb) réservent encore quelques surprises. Au cours de cette dernière décennie en effet l'histoire non seulement des hémoglobines, mais également de toute la famille des hémoprotéines a connu un développement inattendu. Jusqu'à une période récente, leurs fonctions essentielles paraissaient être le transfert d'électrons et l'activité peroxydasique pour les cytochromes, la fixation réversible de l'oxygène pour l'Hb et la myoglobine (Mb), mais il s'avère que ces édifices protéiques, qui présentent de grandes similitudes dans leur structure, sont multifonctionnels.

La famille globine

Les hémoprotéines sont très répandues dans les organismes vivants, des procaryotes aux animaux supérieurs. Parmi ces protéines, les Hb sont des assemblages plus ou moins complexes d'un « motif protéique » de type myoglobine associé à une molécule d'hème, protoporphyrine contenant un atome de fer. Même si la structure primaire de ces motifs protéiques est très variable, leur structure tertiaire (*globin fold*) est très similaire. Leur association engendre une grande diversité de suprastructures moléculaires, du monomère (myoglobine) aux Hb géantes de certains vers [1]. Les flavohémoglobines, protéines chimériques des levures, par exemple, dans lesquelles le motif globine est associé à un domaine enzymatique non héminique, font également partie de la famille des globines [2]. Si toutes ces protéines ont en commun la capacité de fixer l'oxygène, en revanche la multitude d'assemblages ainsi créés offre à la nature un moyen de diversifier leurs fonctions.

Les multimères de globine tels les Hb de vertébrés fixent l'oxygène de façon coopérative, avec un large éventail d'affinités pour l'oxygène. La fixation d'une première molécule de ligand entraîne des modifications conformationnelles de la protéine. Le ligand suivant se trouve alors en présence d'une protéine de structure et de propriétés différentes. Un mécanisme similaire entre en jeu avec les « *heme sensors* », une classe d'hémoprotéines chimériques aux multiples domaines, découverte ces dernières années. Ces détecteurs d'oxygène limitent l'expression de certains gènes en conditions d'hypoxie. Par exemple, les protéines FixL [3] possèdent un domaine héminique qui contrôle l'activité d'un domaine histidine kinase. Un signal, déclenché par la liaison de l'oxygène au domaine globine, est transmis au domaine kinase par l'intermédiaire de modifications structurales. Il s'agit donc là d'une fonction de régulation distincte des fonctions classiques de transporteur d'oxygène ou d'électrons. Précisons que ces protéines qui, comme les Hb, fixent l'oxygène, n'ont peut-être pas conservé certaines caractéristiques structurales responsables du *globin fold*.

Hémoglobine humaine et monoxyde d'azote

Dans les cellules endothéliales, la liaison du monoxyde d'azote à la guanylate cyclase déclenche la vasodilatation des vaisseaux sanguins. L'identification du NO, molécule très réactive et ligand de l'Hb, comme étant l'*endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) [4] a suscité une grande effervescence en 1992. Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine cellulaire endogène, la réaction étant catalysée par un système enzymatique dans lequel intervient une NO synthase (une hémoprotéine) ; il diffuse hors de la cellule d'origine, puis dans les cellules cibles voisines et se lie au groupement héminique de la guanylate cyclase cytosolique, liaison qui entraîne l'activation de l'enzyme [5, 6].

L'intérêt suscité par les propriétés du NO et les relations complexes entre Hb, NO et oxygène ne semble pas prêt de s'éteindre. En 1996, Jia *et al* [7] ont proposé un mécanisme favorisant la propagation du NO au niveau des vaisseaux sanguins. Les Hb de vertébrés, grâce à une affinité modérée pour l'oxygène et une modulation très fine du mode de fonctionnement, assurent de façon extrêmement efficace l'oxygénation des tissus. Or Jia *et al* attribuent à l'Hb le transport non seulement de l'oxygène mais également du NO (*figure 1, réaction 2*) [7-9].

Les interactions entre Hb et NO se font de multiples façons : d'une part liaison par l'intermédiaire du fer héminique [10] ou d'un résidu de la chaîne polypeptidique [7], d'autre part oxydation du fer [11] (*figure 1, réaction 3*). L'interaction entre le NO et le fer de l'hème (*figure 1, réaction 1*) est bien documentée [10] : l'avidité du NO pour l'Hb, 100 000 fois plus élevée que celle de l'oxygène, suggère que toute trace de NO pénétrant dans les vaisseaux serait immédiatement balayée par le fort excès relatif en Hb. La liaison peut être considérée comme irréversible : le temps de dissociation est de quelques minutes pour l'Hb non oxygénée (état T), de l'ordre de 45 minutes pour l'Hb oxygénée (état R). En 1996, Jia *et al* [7] ont formulé l'hypothèse selon laquelle le NO se lierait à la cystéine $\beta 93$, résidu situé à la surface du tétramère, et ceci préférentiellement lorsque l'Hb est en configuration R (*figure 1, réaction 2*). Selon les auteurs, la nitrosyl-Hb ne serait pas stable aux concentrations physiologiques de

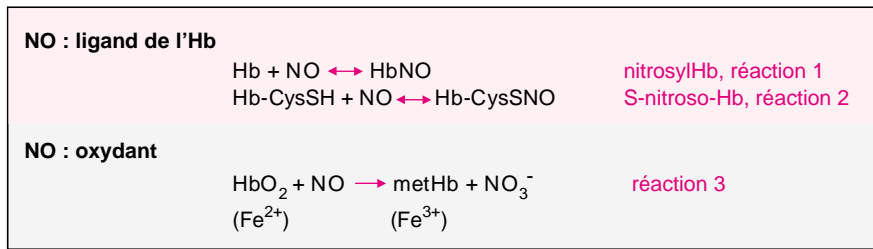


Figure 1. **NO, ligand de l'hémoglobine.**

l'Hb et du NO, et ce dernier serait transféré du fer à la cystéine β93 lors de l'oxygénation de l'Hb au niveau des poumons. La faible pression partielle en oxygène dans les capillaires sanguins induit la transition vers l'état T, le NO serait alors relargué avec comme conséquence la dilatation des vaisseaux, ce qui faciliterait l'apport d'oxygène aux tissus [8, 9]. Il y aurait donc couplage des processus d'oxygénation et de transport du NO. Malgré la compétition entre ces réactions, toutes trois très rapides, Stamler *et al.* [8] estiment que la formation de HbS-NO au niveau de la cystéine pourrait être la voie préférentielle.

Hémoglobine d'ascaris et monoxyde d'azote

Plus récemment, ces mêmes auteurs sont allés plus loin dans le paradoxe. L'Hb d'*Ascaris lumbricoides* [12] n'aurait pas de fonction d'oxygénation. L'Hb de ce nématode parasite, vivant dans l'environnement intestinal pauvre en oxygène d'un milliard d'individus, lie l'oxygène avec une très forte affinité, 10 000 fois celle de l'Hb humaine. Étant donnée sa forte affinité pour l'oxygène, elle constitue effectivement un excellent réservoir, mais un piètre donneur, d'où l'hypothèse d'une fonction « détoxifiante » : de par sa fonction désoxygénase dépendante du NO, elle agirait comme un chélateur et, en captant l'oxygène délétère pour le métabolisme de l'ascaris, permettrait à ce nématode de survivre dans l'environnement d'un organisme aérobique [13]. Elle pourrait également protéger le parasite contre le NO présent dans l'intestin de l'hôte.

Les hypothèses concernant l'Hb d'ascaris méritent quelques remarques. Dans une situation similaire impliquant des Hb de parasites ayant

une très forte affinité pour l'oxygène [14], l'Hb n'a pas de cystéine. Certes la cystéine β93 évoquée ci-dessus est conservée chez les mammifères et les oiseaux, mais la moitié seulement des séquences actuellement connues d'Hb de nématodes possèdent ce résidu, site de liaison du NO. C'est dire que le mécanisme proposé peut difficilement être généralisé. De plus, la forte affinité de l'Hb d'ascaris pour l'oxygène n'autorise pas à exclure systématiquement une capacité d'oxygénation. Elle permettrait en effet la capture d'oxygène en milieu même très peu oxygéné, et une dissociation lente, plusieurs secondes, assurerait alors un apport minimal en cas de nouvelle baisse du niveau. Ce mécanisme paraît plausible pour des organismes exposés de façon intermittente à l'oxygène, tels certains trématodes dont le cycle comporte des étapes aérobies. Ajoutons que la concentration globale en Hb varie en fonction des besoins fonctionnels de l'organisme. Certains poissons des mers froides (*icefish*) n'ont plus d'Hb, en relation avec des conditions de vie à basse température et un métabolisme extrêmement lent. En revanche les baleines et les phoques possèdent un réservoir de myoglobine leur permettant de supporter de longues durées de plongée. Il serait intéressant de savoir si les besoins en oxygène, ou correspondant à toute autre fonction alternative de l'Hb, justifient les concentrations élevées d'Hb chez les nématodes et les trématodes. Chez l'homme, la concentration en Hb répond aux besoins en oxygène ; elle est largement excédentaire en ce qui concerne le transport du NO qui simplement utilise un système existant. Il reste à démontrer s'il y a effectivement libération du NO dans le globe rouge, et si sa liaison à l'Hb

offre un quelconque avantage par rapport au transport dans le plasma. En outre, s'il est démontré que le NO se lie à l'Hb, il n'est pas prouvé que ces réactions, même si elles se produisent *in vivo*, soient liées à une fonction physiologique.

Les hémoglobines végétales

Un rôle similaire de capture d'oxygène avait déjà été décrit pour les leghémoglobines (Lb) qui piègent l'oxygène dans les nodules de plantes légumineuses [15]. Ces hémoglobines dites « symbiotiques » participent aux mécanismes de diffusion de l'oxygène vers les bactéries fixant l'azote, lors de la symbiose plantes-bactéries. L'affinité de la Lb pour l'oxygène, moins élevée que celle de l'Hb d'ascaris, maintient la pression partielle en oxygène à un niveau faible nécessaire à la fixation de l'azote ; dans ce cas la liaison Lb-O₂ est réversible, alors que le rôle hypothétique de l'Hb d'ascaris serait l'élimination de l'oxygène et du NO.

Ces deux dernières décades ont vu s'accumuler les informations prouvant qu'un autre type d'Hb « non symbiotiques » est très largement répandu dans le monde végétal [16]. Leur fonction est mal connue. La forte affinité pour l'oxygène de celles qui ont été étudiées jusqu'à présent rend peu probable un rôle dans la détection ou la diffusion du ligand. L'expression de certaines d'entre elles est induite en hypoxie : s'agit-il d'une réponse de la plante au manque d'oxygène ? Sowa *et al.* [17] suggèrent que les Hb non symbiotiques seraient des ancêtres d'Hb capables d'emmagasiner l'oxygène en milieu peu oxygéné, constituant ainsi une source d'oxygène pour oxyder le NADH et produire l'ATP nécessaire au développement de la cellule.

Les surprises que nous réservent les Hb ne se limitent pas à la fonction désoxygénante décrite par Minning *et al.* [13], et nous terminerons avec un exemple un peu plus exotique, la guerre chimique dans le monde des vers marins, conté dans ce même numéro de *Nature* [18]. Vivant dans les boues des estuaires, certains vers secrètent des composés halogénés toxiques pour leur voisin *Amphitrite ornata*. Celui-ci peut survivre grâce à l'activité d'une déhaloperoxydase, hémoprotéine dont la

structure tertiaire est typique de la famille des globines.

Ce court rapport ne donne qu'un aperçu de la complexité grandissante des possibilités fonctionnelles des hémoglobines. Un autre aspect intéressant concerne l'évolution de cette famille de protéines (figure 2) [19, 20]. On a longtemps considéré que « l'histoire de l'évolution était écrite dans les gènes de globine ». Actuellement cette notion est considérablement enrichie avec une lecture élargie à la structure, aux fonctions et aux interactions structure-fonction. La multiplicité fonctionnelle de la famille globine résulte de l'adaptation aux conditions environnementales, disponibilité de l'oxygène et besoins métaboliques. La transition de la vie anaérobie à la vie aérobie a évidemment constitué une étape cruciale.

Enfin, rendons à César ce qui revient à César: il semble que l'on ait oublié que dès les années 70 certains auteurs décrivaient des fonctions oxydatives de l'Hb [21]. Que penser également de la question posée en 1987: « Has haemoglobin a future ? » [22].

Josée Pagnier
Véronique Baudin-Creuz
Michael C. Marden

Inserm U. 473, 84, rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France.

RÉFÉRENCES

- Zhu H, Ownby DW, Riggs CK, Nolasco NJ, Stoops JK, Riggs AF. Assembly of the gigantic hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Roles of subunit equilibria, non-globin linker chains, and valence of the heme iron. *J Biol Chem* 1996; 271: 30007-21.
- Vinogradov SN, Walz DA, Pohajdak B, Moens L, Kapp OH, Suzuki T, Trotman CN. Adventitious variability? The amino acid sequences of nonvertebrate globins. *Comp Biochem Physiol B* 1993; 106: 1-26.
- Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G, Perutz MF, Kiger L, Marden MC, Poyart C. Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry* 1994; 33: 8067-73.
- Koshland DE Jr. The molecule of the year. *Science* 1992; 258: 1861.

5. Ignarro LJ. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 1990; 16: 477-83.

6. McDonald LJ, Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 211: 1-6

7. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996; 380: 221-6.

8. Stamler JS, Jia L, Eu JP, et al. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997; 276: 2034-7.

9. Durner J, Gow AJ, Stamler JS, Glazebrook J. Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14206-7.

10. Olson JS, Eich RF, Smith LP, Warren JJ, Knowles BC. Protein engineering strategies for designing more stable hemoglobin-based blood substitutes. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1997; 25: 227-41.

11. Eich RF, Li T, Lemon DD, et al. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry* 1996; 35: 6976-83.

12. Goldberg DE. The enigmatic oxygen-avid hemoglobin of *Ascaris*. *Bioessays* 1995; 17: 177-82.

13. Minning DM, Gow AJ, Bonaventura J, et al. *Ascaris* haemoglobin is a nitric oxide-activated « deoxygenase ». *Nature* 1999; 401: 497-502.

14. Kiger L, Rashid AK, Griffon N, et al. Trematode hemoglobins show exceptionally high oxygen affinity. *Biophys J* 1998; 75: 990-8.

15. Appleby CA. The origin and functions of haemoglobins in plants. *Sci Prog* 1992; 76: 365-98.

16. Hill RD. What are hemoglobins doing in plants? *Can J Bot* 1998; 76: 707-12.

17. Sowa AW, Duff SMG, Guy PA, Hill RD. Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10317-21.

18. Lebioda L, LaCount MW, Zhang E, et al. An enzymatic globin from a marine worm. *Nature* 1999; 401: 445.

19. Hardison RC. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5675-9.

20. Suzuki T, Imai K. Evolution of myoglobin. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54: 979-1004.

21. Carrell RW, Winterbourn CC, French JK. Haemoglobin-a frustrated oxidase? Implications for red cell metabolism. *Hemoglobin* 1977; 1: 815-27.

22. Weatherall DJ. Has haemoglobin a future? *Acta Haematol* 1987; 78: 74.

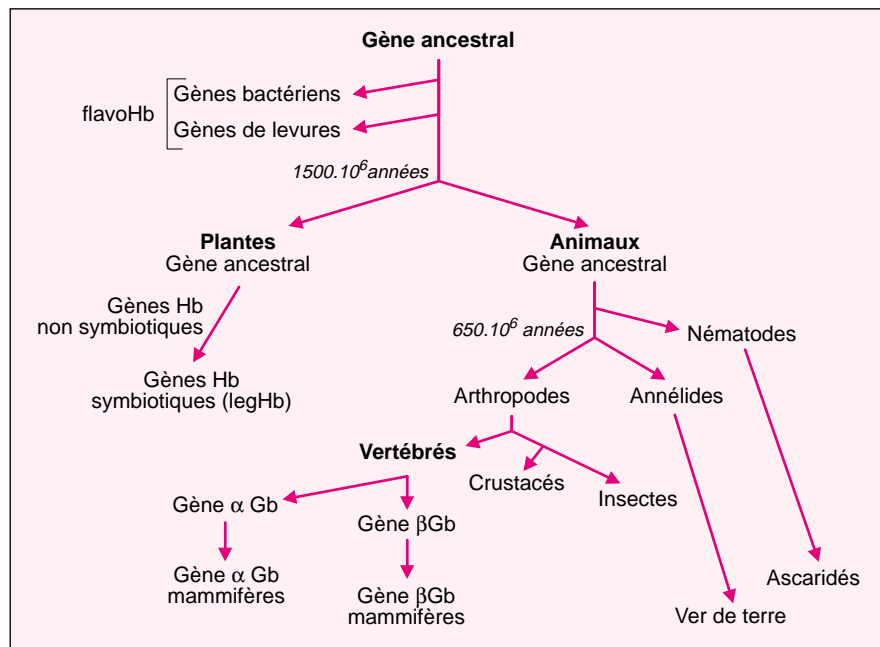


Figure 2. Principales étapes de l'évolution des gènes de globines. Le gène ancestral des globines dérive probablement d'un gène précurseur d'autres hémoprotéines, et précède la divergence entre organismes procaryotes et eucaryotes. Les données récentes montrent la diversité des arrangements exons-introns; le gène ancestral des Hb de plantes et des animaux possédait vraisemblablement trois introns. L'évolution des gènes de globine apparaît de plus en plus complexe, et sa rapidité rend difficile l'analyse phylogénétique.

TIRÉS À PART

J. Pagnier.