

**Figure 2. Structure protéique de l'adiponutrine.** Le gène code pour une protéine de 481 acides aminés qui présente un domaine enzymatique à activité lipase/transacylase (domaine patatine, Pfam PF01734 : <http://pfam.sanger.ac.uk/family?acc=PF01734>). Il présente une dyade catalytique caractéristique entourée de 2 motifs consensus GXSXG (sérine en position 47) et DXG/A (aspartate en position 166). Les variants I148M et S453I sont indiqués en bleu.

7. Baulande S, Lasnier F, Lucas M, Pairault J. Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 33336-44.

8. Baulande S, Fève B. Identification de nouveaux gènes associés à l'adipogénèse. *Med Sci (Paris)* 2003 ; 19 : 151-4.

9. Moldes M, Beauregard G, Faraj M, et al. Adiponutrin gene is regulated by insulin and glucose in human adipose tissue. *Eur J Endocrinol* 2006 ; 155 : 461-8.

10. Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, et al. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 48968-75.

11. Lake AC, Sun Y, Li JL, et al. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J Lipid Res* 2005 ; 46 : 2477-87.

## NOUVELLE

### NO et hémoglobine Une longue histoire et quelques controverses

Dominique Labie

Département de génétique,  
développement et pathologie moléculaire,  
Institut Cochin,  
24, rue du Faubourg Saint-Jacques,  
75014 Paris, France.  
[labie@cochin.inserm.fr](mailto:labie@cochin.inserm.fr)

#### Vasodilatation et libération de NO : le concept initial du rôle de la nitrosohémoglobine

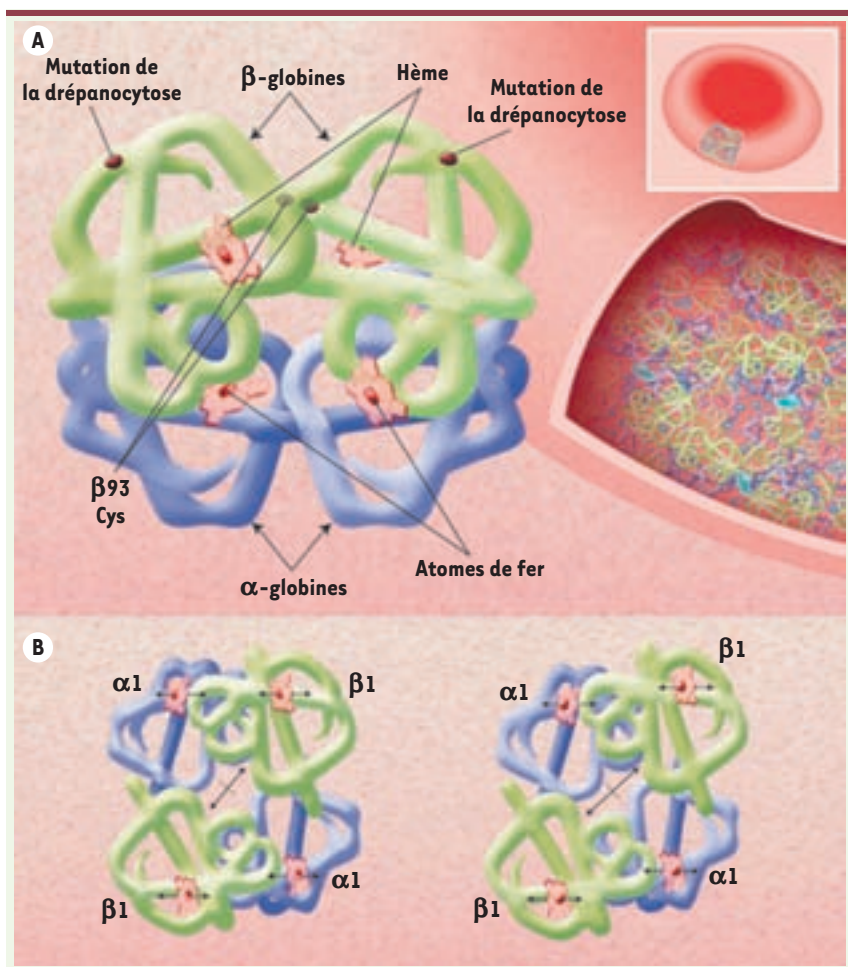
La vasodilatation, accroissant le flux sanguin en réponse à l'hypoxie, est une réaction systémique connue depuis plus d'un siècle. On sait que cette vasodilatation a lieu au moment de la désoxygénation de l'hémoglobine (Hb) et qu'elle est corrélée à la saturation partielle de l'Hb en oxygène (O<sub>2</sub>). Le concept a été énoncé que l'Hb elle-même exercerait cette régulation par une interaction avec le monoxyde d'azote (NO). Sur les modalités de cette interaction, J.S. Stamler a proposé dès 1996 et dans les années suivantes un mécanisme selon lequel NO était transporté par l'Hb, en se fixant sur le thiol du résidu Cys β93, à proximité immédiate du site de fixation de l'hème, au niveau du coude FG, résidu conservé dans toutes les Hb fonctionnelles, et en formant la S-nitrosohémoglobine (SNOHb) [1-3] (Figure 1). En conditions d'hypoxie, le NO dissocié sortirait du globule rouge (GR) et

serait transféré au glutathion, permettant sa diffusion et son action vasodilatatrice. Les auteurs ont depuis confirmé la valeur de leur modèle et insisté sur le rôle majeur de la SNOHb, et une revue récente de J.S. Stamler mentionne à nouveau le fait que la vasodilatation est sous le contrôle d'un signal S-nitrosothiol [4]. La plupart des publications, cependant, sont centrées sur des processus physiopathologiques vasculaires et non plus sur le problème précis de l'interaction Hb/NO. Le mécanisme suggéré par J.S. Stamler a été extrêmement discuté, et, selon les travaux de deux équipes du NIH (*National Institutes of Health*), celles de M.T. Gladwin et de A.N. Schechter, la fixation de NO ne se fait qu'accessoirement sur la Cys β93, mais essentiellement sur le Fer réduit (Fe<sup>2+</sup>) de l'hème (NOHb), nitrosation par opposition à la nitrosylation de la Cys β93 [5]. Pour le prouver, les auteurs ont en effet mis en évidence un gradient artérioveineux de nitrosyl(hème)Hb au niveau de l'avant-bras après inhalation de NO

par des volontaires. Un travail récent de l'équipe de Tim T. Townes (Université de Birmingham, Alabama, États-Unis) réalisé sur un modèle murin, confirme définitivement cette hypothèse [6]. Il se présente comme le complément de la recherche menée entre-temps par les équipes du NIH, qu'il convient de rappeler.

#### Contrôle du taux de NO vasculaire : globule rouge ou endothélium ?

Les auteurs s'opposent à l'hypothèse d'un rôle majeur joué par la Cys β93 libérant NO par une activité « endocrine », et proposent une fixation du NO sur le fer de l'hème. Ils démontrent que cette fixation de NO est 100 fois supérieure sur la désoxyHb à ce qu'elle est sur l'oxyHb, et se produit extrêmement rapidement - de l'ordre de la milliseconde - sur le fer, alors qu'elle est lente sur la Cys β93 [7]. Après inhalation de NO, on constate la formation de ~ 80 μM de metHb (Fe<sup>3+</sup>) par liaison à la désoxyHb, mais de seulement 1 μM de nitrosylHb (NOHb). On ne détecte



**Figure 1. Structure de la molécule d'hémoglobine.** **A.** Arrangement des hélices  $\alpha$  (représentées comme des tubes) dans chacune des unités  $\alpha\beta$ , et localisation des 4 groupements hème avec leur atome de fer où se fixe la molécule de gaz. Ces 4 polypeptides du tétramère d'Hb délimitent un espace central dans lequel un groupement prosthétique de l'hème, la protoporphyrine IX, est fixée. Le site de la mutation caractérisant la drépanocytose est figuré sur le schéma, de même que la cystéine  $\beta 93$  très conservée. À droite, l'organisation très repliée des molécules d'Hb dans le globule rouge est illustrée ; une telle concentration (34g/dl) facilite le transport d'oxygène, mais explique la difficulté d'accès à cette molécule, et la facilité de polymérisation de l'Hb drépanocytaire lors d'une désoxygénation même minimale. **B.** Représentation des changements de la structure quaternaire du tétramère d'Hb, vu du haut, lors de la transition de l'oxyHb (gauche) à la conformation désoxygénée (droite). L'atome de fer est déplacé, et une cavité se forme entre les chaînes  $\beta$ , favorisant la liaison du 2,3 DPG. Dessins originaux de Irving M. Geis, Illustration d'Alice Y. Chen (figure publiée dans *Blood* [19] - © Reproduite avec la permission de l'American Society of Hematology).

que des traces presque indétectables de SNOHb par fixation sur la Cys93, qui semble donc un composé instable. Les auteurs contestent l'hypothèse de la Cys  $\beta 93$  comme donneur de NO en se basant sur le fait que la cinétique des réactions chimiques supposées n'est pas compatible avec celle, extrêmement rapide, de la réaction de NO avec l'Hb ( $< 1$  ms) et que cette fixation de NO sur la Cys  $\beta 93$  serait la même sur l'oxyHb et la désoxyHb, donc en désaccord avec le mécanisme allostérique. Les données expérimentales de cinétique et de concentration indiquent donc que c'est la synthèse de NO par la NO synthase endothéliale (eNOS) qui règle le flux sanguin de base, et non une diffusion du NO à partir de SNOHb (Figure 2). Il s'agit donc d'une régulation paracrine du tonus vasculaire. Se pose alors la question d'un éventuel piégeage du NO dans

les vaisseaux par l'Hb dont la concentration est énorme, et qui, en capturant le NO, pourrait inhiber la vasodilatation. Mais cette capture est limitée par l'existence de barrières physiologiques. La principale est la compartimentalisation de l'Hb dans le GR, prévenant sa diffusion ; il existe aussi une barrière de diffusion à la surface de l'endothélium et peut-être au niveau de la membrane des GR. La concentration plasmatique de NO permet alors sa diffusion dans les muscles lisses et une activation de la guanylyl cyclase soluble (sGC) nécessaire à la vasodilatation. Cette capture de NO par l'Hb « libre » est l'explication des incidents dramatiques de vasoconstriction et d'hypertension observés au cours d'essais de transfusion avec des substituts à base d'Hb, qui ne sont pas stockés dans un équivalent de globule rouge [8] (Figure 2).

### Production et piégeage du NO par l'oxyhémoglobine

La principale forme de stockage intravasculaire de NO est l'anion nitrite ( $\text{NO}^{2-}$ ), à partir duquel l'action réductrice de l'Hb, qui assume le rôle d'une enzyme de type nitrite réductase, génère du NO lors de la transition allostérique de la forme oxygénée de l'Hb à la forme désoxygénée ( $\text{R} \rightarrow \text{T}$ ) [9]. Les auteurs ont montré que cette réduction est maximale lorsque le coefficient de saturation de l'Hb en oxygène est de 40 %–60 %, au voisinage donc de la  $\text{P}_{50}$ . Ce point semble le plus favorable à une libération de NO en réponse à l'hypoxie. Cette production de NO par l'Hb assure donc une vasodilatation en réponse à l'hypoxie sous le contrôle allostérique de l'Hb. Dans un travail complémentaire, les mêmes auteurs montrent qu'une hémolyse intravasculaire chronique libérant de l'oxyhémoglobine dans la





dans les valeurs des pressions artérielles, systolique et diastolique entre ces deux types de souris.

Une autre série d'expériences a alors été entreprise, tenant compte du fait que les mécanismes induisant l'hypoxie *in vivo* peuvent être multiples. Les auteurs ont exploré l'action des GR purifiés des souris HbC93 et HbA93 sur des artères pulmonaires de lapin exposées à un taux d'oxygène variable. Les deux types de GR entraînaient les mêmes effets : une vasoconstriction par captation du NO endogène si l'artère a une oxygénation équilibrée (21 % O<sub>2</sub>), une vasodilatation suivie de vasoconstriction secondaire en hypoxie ( $\leq$  1 % O<sub>2</sub>) [16]. Cette similitude de comportement indique que la vasodilatation hypoxique n'est pas contrôlée par SNO, mais due à une libération d'ATP par les GR hypoxiques, qui stimule la production de eNOS [17]. L'action de l'ATP est due à un métabolite, l'adénosine ; elle est en effet inhibée par la théophylline, antagoniste du récepteur de l'adénosine. Pour les auteurs, SNOHb ne joue pas un rôle essentiel comme régulateur physiologique de la concentration de NO circulante. La stricte conservation de la Cys  $\beta$ 93 fait cependant supposer que ce résidu aurait un rôle important, sans doute dans des maladies vasculaires.

Le travail de Tim Townes, qui paraît structuré et convaincant a cependant provoqué une critique immédiate et polémique de J.S. Stamler [18], s'attaquant aux procédures expérimentales. À cette polémique, Tim Townes répond en justifiant ses expériences tout en admettant que tout n'est pas éclairci et

que le sujet méritera encore des explorations. Le nombre et le rythme des publications sur le NO, presque quotidiennes, démontrent en effet l'importance du sujet, tant du point de vue de la compréhension fondamentale du mécanisme de son transport par l'hémoglobine que des multiples applications pathologiques et de la réflexion sur des applications thérapeutiques. ♦

### Nitric oxide and haemoglobin

#### GLOSSAIRE

**Le tétramère fonctionnel  $\alpha_2\beta_2$  d'hémoglobine (Hb)** existe alternativement sous les 2 formes désoxyHb (forme T) et oxyHb (forme R), la fixation du ligand O<sub>2</sub> induisant un remaniement des liaisons du contact  $\alpha_1\beta_2$ . Une molécule d'hème est liée à chaque sous-unité. Le Fer est sous forme réduite (Fe<sup>2+</sup>) dans l'oxyHb et dans la désoxyHb. La chaîne  $\beta$  (8 hélices A à H) lie l'hème au niveau de l'histidine  $\beta$ 63 (E7) et de l'histidine  $\beta$ 92 (F8).

**Met HB** est une forme oxydée irréversible (Fe<sup>3+</sup>) et n'est plus fonctionnelle.

**NOHb** correspond à une liaison coopérative de NO et du Fe<sup>2+</sup> de l'hème (nitrosylation).

**SNOHb** correspond à la fixation de NO sur le S de la cystéine  $\beta$ 93 (F9) (nitrosylation).

#### RÉFÉRENCES

- Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996; 380: 280-6.
- Stamler JS, Jia L, Eu JP, et al. Blood flow regulation by nitroso-hemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997; 276: 2034-7.
- Gow AJ, Stamler JS. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 1998; 391: 169-73.
- Diesen DL, Hess DT, Stamler JS. Hypoxic vasodilation by red blood cells. Evidence for an S-nitrosothiol-base signal. *Circ Res* 2008; 103: 545-53.
- Gladwin MT, Ognibene FP, Pannell LK, et al. Relative role of heme nitrosylation and  $\beta$ -cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9943-8.
- Isbell TS, Sun CW, Wu LC, et al. SNO-hemoglobin is not essential for red blood cell-dependent hypoxic vasodilation. *Nat Med* 2008; 14: 773-7.
- Gladwin MT, Lancaster JR, Freeman BA, Schechter AN. Nitric oxide's reactions with Hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med* 2003; 9: 496-500.
- Doherty DH et al. Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 672-6.
- Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, et al. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J Clin Invest* 1985; 115: 2099-107.
- Minne PC, Deans KJ, Zhi H, et al. Hemolysis associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest* 1985; 115: 2409-17.
- Cokic VP, Beleslin-Cokic BB, Tomic M, et al. Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells. *Blood* 1986; 108: 184-91.
- Hsu LL, Champion HC, Campbell-Lee SA, et al. Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability. *Blood* 2007; 109: 3088-98.
- Kokic VP, Schechter AN. Effects of nitric oxide on red blood cells development and phenotype. *Curr Top Dev Biol* 2008; 83: 169-215.
- Grubina R, Huang Z, Shiva S, et al. Concerted nitric oxide formation and release from the simultaneous reactions of nitrite with deoxy- and oxyhemoglobin. *J Biol Chem* 2007; 282: 12916-27.
- Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. The functional nitrite reductase activity of the beta-globin. *Blood* 2008; 112: 2636-47.
- McMahon TJ, Moon RF, Luschinger BP, et al. Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med* 2002; 8: 711-7.
- Crawford JH, Isbell TS, Huang Z, et al. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood* 2006; 107: 566-74.
- Stamler JS, Singel DI, Piantadosi CA. SNO-hemoglobin and hypoxic vasodilation. *Nat Med* 2008; 14: 1908-12.
- Schechter A. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 2008; 112: 3927-38.



**Tarifs d'abonnement M/S - 2009**

**Abonnez-vous**

**à Médecine/Sciences**

**> Grâce à m/s, vous vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales**

---

**Bulletin d'abonnement page 146 dans ce numéro de m/s**

