

- Note CEA-N-2302 -

FR 8203139

Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay  
Division d'Etudes de Séparation Isotopique et de Chimie Physique  
Département de Physico-Chimie  
Section de Chimie Moléculaire

**ETUDE PAR RADIOLYSE DE LA REACTIVITE DE CERTAINS RADICAUX  
AVEC LE SYSTEME OXYHEMOGLOBINE - METHEMOGLOBINE**

par

**L. GILLES, D. HARISTOY**

- Juin 1982 -

We regret that some of the pages in the microfiche copy of this report may not be up to the proper legibility standards, even though the best possible copy was used for preparing the master fiche

Note CEA-N-2302

**DESCRIPTION-MATIERE (mots clefs extraits du thesaurus SIDON/INIS)**

*en français*

METHEMOGLOBINE  
RADIOLYSE  
RADICAUX  
OXYDATION  
CINETIQUE DES REACTIONS CHIMIQUES  
SPECTRES D'ABSORPTION  
PH

*en anglais*

METHOMOBLOBIN  
RADIOLYSIS  
RADICALS  
OXIDATION  
CHEMICAL REACTION KINETICS  
ABSORPTION SPECTRA  
PH VALUE

- Note CEA-N-2302 -

Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay  
Division d'Etudes de Séparation Isotopique et de Chimie Physique  
Département de Physico-Chimie  
Section de Chimie Moléculaire

ETUDE PAR RADIOLYSE DE LA REACTIVITE DE CERTAINS RADICAUX  
AVEC LE SYSTEME OXYHEMOGLOBINE - METHEMOGLOBINE

par

L. GILLES, D. HARISTOY

NOTE CEA-N-2302 - L. GILLES - D. HARISTOY

ETUDE PAR RADIOLYSE DE LA REACTIVITE DE CERTAINS RADICAUX AVEC LE SYSTEME OXYHEMOGLOBINE-METHEMOGLOBINE.

Sommaire. L'hémoglobine a un rôle comme porteur d'oxygène dans la chaîne respiratoire des cellules mais l'autooxydation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine peut perturber cette chaîne à moins que ce système ne soit un donneur de  $O_2^-$  qui pourrait faciliter les oxydations par  $O_2$ . C'est pourquoi la réactivité de ce système avec des espèces à faible durée de vie ( $O_2^-$ ,  $CO_2^-$ ) a été étudiée. Les réactions de  $O_2^-$  avec  $HbO_2$  et avec  $HbFe^{III}$  se sont montrées lentes : par conséquent l'autooxydation de  $HbO_2$  in vivo pourrait bien agir comme source de  $O_2^-$ .

1982

68 p.

Commissariat à l'Energie Atomique - France.

NOTE CEA-N-2302 - L. GILLES - D. HARISTOY

PULSE RADIOLYSIS STUDY OF THE REACTIONS OF CERTAIN RADICALS WITH THE OXYHEMOGLOBIN-METHEMOGLOBIN SYSTEM.

Summary. - Hemoglobin occupies an important role as oxygen carrier in the respiratory chain. The autoxydation of oxyhemoglobin ( $HbO_2$ ) into methemoglobin ( $HbFe^{III}$ ) could perturb this chain unless the system acts as a source of  $O_2^-$  which could facilitate oxydation processes. The reactivity of the  $HbO_2$ - $HbFe^{III}$  system with short lived transients ( $O_2^-$ ,  $CO_2^-$ ) was studied in order to gain some insight into this problem. The low reactivity of  $O_2^-$  with respect to both  $HbO_2$  and  $HbFe^{III}$  shows that the autoxydation of  $HbO_2$  in vivo could act as an  $O_2^-$  donor.

1982

68 p.

Commissariat à l'Energie Atomique - France.

cellules. Le rôle biologique de cette protéine étant bien connu, il convient d'examiner ses différentes structures et les conséquences de leur stabilité.

#### A. Structures de l'hémoglobine et de ses dérivés

L'hémoglobine est formée par l'association d'un groupement prosthétique appelé hème et d'une globine chaîne polypeptidique.

Dans la suite du texte il sera essentiellement question de l'hémoglobine humaine majoritaire, l'hémoglobine A.

Certains résultats expérimentaux font toutefois référence à de l'hémoglobine de boeuf (provenance :  $\Sigma$ ), celle-ci a été utilisée au cours de travaux antérieurs<sup>(4)(5)</sup>. Bien que la constitution des chaînes polypeptidiques varie selon le type d'hémoglobine il existe peu de différences entre les structures de ces hémoglobines ( $A_1$  et bovine).

Quatre structures sont définies dans les chaînes polypeptidiques : la structure primaire qui décrit l'enchaînement des acides aminés, la structure secondaire qui rend compte de leur arrangement spatial, la structure tertiaire qui décrit le repliement des chaînes et enfin la structure quaternaire qui se rapporte à la localisation des chaînes les unes par rapport aux autres. La structure de l'hème fera l'objet du premier paragraphe et l'étude des chaînes polypeptidiques fera l'objet des paragraphes suivants.

##### 1°) - Structure de l'hème

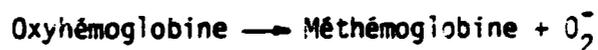
L'hème est constituée de quatre noyaux pyrroliques unis entre eux par des groupements méthényles ( $>C-H$ ) fixés sur les carbones  $\alpha$ .

Les carbones  $\beta$  sont substitués au total par quatre groupements méthyles ( $-CH_3$ ), deux groupements vinyles ( $-CH=CH_2$ ) et deux groupements propionyles ( $-CH_2-CH_2-COOH$ ). Un ion ferreux est lié aux quatre atomes d'azote des pyrroles formant un complexe chélate (Fig. 1).

## 1.- INTRODUCTION

Depuis une vingtaine d'années les études de biochimie se sont développées grâce à l'utilisation de techniques nouvelles physiques et physico-chimiques. Parmi celles-ci la radiolyse pulsée a joué un rôle important dans l'élucidation du mécanisme des réactions radicalaires rapides. Cette technique permet de suivre l'évolution d'une réaction induite par le passage d'une impulsion de rayonnement liée à la création quasi instantanée d'une grande concentration d'espèces radicalaires à très courte durée de vie.

Le radical-ion superoxyde  $O_2^-$  impliqué dans certains mécanismes d'oxydation biologique a été étudié par cette technique. Ces ions sont créés "in vivo" par différents systèmes biochimiques d'oxydation comme par exemple les enzymes flaviniques<sup>(1)(2)</sup>, ainsi qu'au cours de l'autoxydation de l'oxyhémoglobine<sup>(3)</sup>



Ce dernier système semble donc jouer le rôle de donneur de  $O_2^-$  pour autant que ces ions ne réagissent rapidement sur l'oxyhémoglobine ou la méthémoglobine.

Le présent travail a pour objet l'étude des réactions de cet ion avec ces deux protéines.

## 2.- L'HEMOGLOBINE ET SES DERIVES : STRUCTURES, SPECTRES, PREPARATION

Dans le groupe des hémoprotéines, on considère que l'hémoglobine est essentielle chez les animaux supérieurs à cause de sa propriété de transporter l'oxygène depuis les poumons, où la pression partielle de celui-ci est élevée, jusqu'aux tissus où elle est faible.

L'oxygène intervient alors à ce niveau dans la chaîne enzymatique des

cellules. Le rôle biologique de cette protéine étant bien connu, il convient d'examiner ses différentes structures et les conséquences de leur stabilité.

#### A. Structures de l'hémoglobine et de ses dérivés

L'hémoglobine est formée par l'association d'un groupement prosthétique appelé hème et d'une globine chaîne polypeptidique.

Dans la suite du texte il sera essentiellement question de l'hémoglobine humaine majoritaire, l'hémoglobine A.

Certains résultats expérimentaux font toutefois référence à de l'hémoglobine de boeuf (provenance : Sigma), celle-ci a été utilisée au cours de travaux antérieurs<sup>(4)(5)</sup>. Bien que la constitution des chaînes polypeptidiques varie selon le type d'hémoglobine il existe peu de différences entre les structures de ces hémoglobines (A<sub>1</sub> et bovine).

Quatre structures sont définies dans les chaînes polypeptidiques : la structure primaire qui décrit l'enchaînement des acides aminés, la structure secondaire qui rend compte de leur arrangement spatial, la structure tertiaire qui décrit le repliement des chaînes et enfin la structure quaternaire qui se rapporte à la localisation des chaînes les unes par rapport aux autres. La structure de l'hème fera l'objet du premier paragraphe et l'étude des chaînes polypeptidiques fera l'objet des paragraphes suivants.

##### 1°) - Structure de l'hème

L'hème est constituée de quatre noyaux pyrroliques unis entre eux par des groupements méthényles ( $>C-H$ ) fixés sur les carbones  $\alpha$ .

Les carbones  $\beta$  sont substitués au total par quatre groupements méthyles ( $-CH_3$ ), deux groupements vinyles ( $-CH=CH_2$ ) et deux groupements propionyles ( $-CH_2-CH_2-COOH$ ). Un ion ferreux est lié aux quatre atomes d'azote des pyrroles formant un complexe chélate (Fig. 1).

Le fer forme aussi une liaison avec le groupement imidazol de l'histidine F8 (Fig. 2). Le sixième ligande varie selon le dérivé considéré.

Ainsi dans le cas de l'oxyhémoglobine ce ligande est l'oxygène, une liaison labile se forme entre l'ion ferreux et l'histidine E<sub>7</sub> par l'intermédiaire de cet oxygène.

Dans le cas de la carboxyhémoglobine le monoxyde de carbone (CO) peut prendre exactement la place de l'oxygène.

L'hémoglobine ayant une affinité trente fois supérieure pour CO que pour l'oxygène le transport de celui-ci est bloqué. Le monoxyde de carbone est donc un composé toxique.

Par contre le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> ne forme pas de liaison avec le fer, mais avec des fonctions basiques de la partie protéique de la molécule<sup>(6)</sup>.

Quand l'ion ferreux est oxydé en ion ferrique l'hémoglobine se transforme en méthémoglobine qui ne peut plus fixer l'oxygène. Les agents méthémoglobinisants sont donc également des composés toxiques. Les sixièmes ligandes possibles pour la méthémoglobine sont en général OH<sup>-</sup> et H<sub>2</sub>O

## 2°) - Structure des chaînes polypeptidiques

### *Structure primaire*

L'hémoglobine A<sub>1</sub> se compose de quatre chaînes identiques deux à deux, les chaînes α et les chaînes β.

La chaîne α comprend 141 acides aminés<sup>(7)</sup>, la chaîne β en comprend 146<sup>(8)</sup>.

### *Structure secondaire*

Les chaînes de l'hémoglobine sont constituées de 13 segments articulés entre eux. Huit segments ont une structure hélicoïdale du type hélice α (Fig. 3), chaque tour d'hélice comprenant 3,6 résidus d'acides aminés (-N- $\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}$ - $\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}$ -)<sup>(9)</sup>. Le nombre d'acides aminés varie de 7

pour l'hélice C à 26 pour l'hélice H<sup>(10)</sup>. Le nombre d'acides aminés entrant dans la structure hélicoïdale représente 75 pour cent du nombre total d'acides aminés.

Les acides aminés constituant les autres segments se trouvent sous forme non hélicoïdale et servent à relier les huit segments hélicoïdaux entre eux.

#### *Structure tertiaire*

L'articulation due aux segments interhélicoïdaux permet le repliement de la structure.

L'ensemble forme alors une structure globulaire qui présente près de sa surface une cavité dans laquelle la molécule d'hème est enfouie.

Cette cavité porte le nom de poche de l'hème. La région interne est principalement occupée par des acides aminés à caractère hydrophobe, ces acides aminés échangent entre eux de nombreuses liaisons de Van der Waals, qui sont responsables de la cohésion de la molécule.

Comme on l'a déjà dit, l'importance de la molécule d'hémoglobine est en rapport avec son aptitude au transport de l'oxygène. Pour cela il faut que le fer possède le degré d'oxydation II, il serait donc possible de penser que seul l'hème intervient dans cette fonction.

Cependant de nombreuses protéines hémiques telle que le catalase sont impropres à jouer ce rôle et il est apparu que la stabilité du complexe hème-poche de l'hème avait une importance primordiale en maintenant le fer à l'état ferreux.

Cette stabilité est assurée par une soixantaine de liaisons de Van der Waals<sup>(11)</sup> échangées entre l'hème et les acides aminés de la poche de l'hème.

Ces acides aminés ayant un caractère hydrophobe il n'y a pas irruption d'eau dans la poche et par conséquent pas d'oxydation du fer ferreux.

Il faut remarquer qu'en absence d'hème, la globine n'a pas la même structure tertiaire.

#### *Structure quaternaire*

L'étude du mécanisme de fixation de l'oxygène a conduit à considérer la molécule d'hémoglobine comme un tétramère (complexe allostérique)<sup>(12)</sup>. La molécule d'hémoglobine contient 574 acides aminés et quatre hèmes, sa masse molaire est de 64450. L'ensemble forme un sphéroïde dont une bonne représentation a été donnée par Dickerson et Geiss<sup>(13)</sup> (Fig. 4):

Les poches de l'hème se localisent près de la surface externe de la sphère, les poches  $\alpha_2 \beta_1$  et  $\alpha_1 \beta_2$  sont particulièrement voisines.

Les chaînes créent entre elles des liaisons de type hydrophobe. Il existe deux types de liaisons, celles à hèmes voisins ( $\alpha_1 \beta_2$  et  $\alpha_2 \beta_1$ ) et celles à hèmes lointains ( $\alpha_2 \beta_2$  et  $\alpha_1 \beta_1$ ).

Notons qu'entre les chaînes d'un même type il existe peu de liaisons. Celles-ci seraient de type pontsalin (3 contacts  $\alpha_1 \alpha_2$ , 2 contacts  $\beta_1 \beta_2$ ).

#### *Influence de la configuration sur les spectres*

La théorie du complexe allostérique de Monod et al. définit deux formes dans la structure de l'hémoglobine :

- la forme à faible affinité pour les ligandes (structure T) dont la structure quaternaire est celle de la déoxyhémoglobine
- la forme à forte affinité pour les ligandes (structure R) dont la structure quaternaire est celle de l'oxyhémoglobine.

Un équilibre entre les deux structures quaternaires R et T est possible, il dépend de la structure tertiaire des sous unités, structure qui est régie par le déplacement de l'atome de fer hors du plan des noyaux pyrroliques.

Dans le cas de l'oxyhémoglobine qui a une configuration à spin faible, le fer est dans le plan des atomes d'azotes; dans le cas de la déoxyhémoglobine qui a une configuration à spin fort, le fer est au-dessus de ce plan ( $0,75\text{\AA}$ ).

Comme nous l'avons déjà indiqué la méthémoglobine a deux ligandes possibles  $\text{OH}^-$  et  $\text{H}_2\text{O}$ .

Quand  $\text{OH}^-$  est lié au fer (hydroxyméthémoglobine) celui-ci a une configuration à spin faible et se trouve dans le plan des azotes.

Dans le cas de  $\text{H}_2\text{O}$  le fer a la configuration à spin fort et il se trouve localisé à  $0,4\text{\AA}$  hors du plan. Cette position intermédiaire entre 0 et  $0,75\text{\AA}$  hors du plan, permet à l'aquométhémoglobine de prendre soit la structure de la déoxyhémoglobine (T) soit celle de l'oxyhémoglobine (R).

La constante K de l'équilibre  $R \rightleftharpoons T$  décroît quand le pH augmente et ceci pour deux raisons.

La première est qu'aux pH élevés la concentration d'aquométhémoglobine est inférieure à celle d'hydroxyméthémoglobine, celle-ci ayant une configuration à spin faible favorise la structure R, la deuxième vient du fait que les liaisons par pont salin qui utilisent la forme T deviennent faibles à ces mêmes pH.

L'existence des équilibres entre les deux formes (R et T) et les configurations (spin faible, spin fort) explique la variation du spectre de la méthémoglobine en fonction du pH qui est montré par les figures 5, 6; la figure 7 rend compte de l'influence de la présence de formiate sur ces mêmes spectres. Cette influence est moindre par

rapport à celle du pH. Le spectre de l'oxyhémoglobine est par contre indépendant du pH ou de la présence de formiate (Fig. 9 et 10)

### 3°) - Convention d'écriture

Dans la suite de ce texte la déoxyhémoglobine forme ne contenant pas de sixième ligande sera symbolisée par  $\text{HbFe}^{\text{III}}$ , l'oxyhémoglobine dont le ligande est l'oxygène sera symbolisée par  $\text{HbFe}^{\text{II}}\text{O}_2$  et la méthémoglobine dans laquelle le fer de l'hème est à l'état ferrique, par  $\text{HbFe}^{\text{III}}$ . Les concentrations seront exprimées en mole de monomère (hème + globine) considérant par là que chaque hème est un site actif indépendant des trois autres.

### B. Modes de préparation des solutions d'oxyhémoglobine et de méthémoglobine

L'essentiel de ces expériences a été réalisée avec de l'hémoglobine humaine dont le mode de préparation est donné ci-dessous.

La caractérisation des protéines est faite par leurs spectres d'absorption, leur concentration est calculée à la fois à partir du spectre d'absorption de la protéine et par la méthode de Drabkin<sup>(15)(16)</sup>.

Cette méthode consiste à transformer les différentes formes de l'hémoglobine ( $\text{HbFe}^{\text{II}}$ ,  $\text{HbFe}^{\text{II}}\text{O}_2$ ,  $\text{HbFe}^{\text{III}}$ ) en cyanméthémoglobine, forme dont le spectre est indépendant du pH. Cette transformation est faite par adjonction d'une solution contenant du KCN et du  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  ( $\text{KCN} = 8 \times 10^{-4} \text{M}$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 = 6 \times 10^{-4} \text{M}$ ) à une partie de solution de protéine.

La mesure de l'absorption de la solution se fait à 540nm, longueur d'onde du maximum d'absorption du spectre

$$\epsilon_{540} \text{HbFe}^{\text{III}}(\text{CN}) = 11000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} (17)$$

## 1.°) - Préparation de l'oxyhémoglobine

L'hémoglobine utilisée était de l'hémoglobine humaine A<sub>1</sub> isolée dans le laboratoire de biochimie du Pr. J. Rosa (Hopital Henri Mondor, Créteil).

L'oxyhémoglobine est séparée en utilisant la méthode de Drabkin<sup>(18)</sup>. La première étape de cette méthode consiste à extraire les globules rouges du sang humain. Cette séparation s'opère par centrifugation à 3000 tours/mn mélange sang-sérum physiologique (NaCl 9%), les globules blancs, restant dans le sérum physiologique surnageant sont facilement éliminés

Les oxyhémoglobines sont extraites des globules rouges par dialyse dans de l'eau permutée pendant 1 heure. Sous l'effet osmotique, l'eau pénètre la membrane cellulaire, provoque son éclatement avec la mise en solution des oxyhémoglobines.

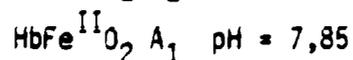
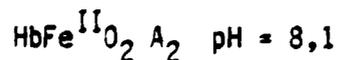
Après une ultracentrifugation à 18000 tours/mn le surnageant contenant les oxyhémoglobines (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, etc) en solution est séparé du culot globulaire.

La séparation des différentes oxyhémoglobines s'opère par chromatographie sur résine DEAE Séphadex A50 équilibrée à un pH de 8,4.

Les oxyhémoglobines en solution (pH 8,4) sont fixées sur la résine puis éluées à l'aide d'une solution tampon à un pH de 7,85. Lors du passage de cette solution dans la colonne il se crée un gradient de pH.

Les oxyhémoglobines ayant un pH d'éluion différent, sont recueillies séparément par un collecteur tournant (6 prélèvements/heure)

pH de sortie des différentes hémoglobines



La solution d'oxyhémoglobine est alors concentrée sous vide elle est ensuite congelée ce qui permet de la conserver pendant des mois sans qu'elle ne subisse d'altération.

## 2°) - Préparation de la méthémoglobine

L'oxyhémoglobine A<sub>1</sub>, seule utilisée est oxydée en méthémoglobine par addition de ferricyanure de potassium en excès. La solution (25cc) est ensuite filtrée sur gel (résine sephadex G25, pH = 6,2) pour éliminer le ferrocyanure formé et l'excès de ferricyanure.

## 3.- RADIOLYSE

### Techniques expérimentales

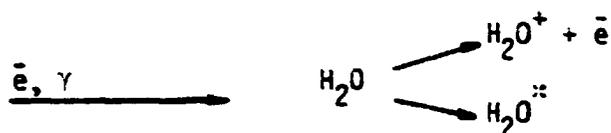
Deux types d'irradiation ont été utilisés : l'irradiation continue aux rayons gammas à l'aide d'une source de cobalt 60, ceci permet de caractériser des produits finaux et d'étudier des mécanismes réactionnels éventuellement responsables de leur formation, et l'irradiation impulsionnelle d'électrons qui crée quasi instantanément une forte concentration en radicaux spécifiques susceptibles de réagir avec le soluté. Avant d'aborder la description de ces deux techniques un bref sommaire de l'action chimique des rayonnements sera donné : la spécificité de l'étude fait que les effets sur l'eau et les solutions aqueuses vont être exclusivement abordés.

### A. Radiolyse

#### 1°) ) Effet primaire et secondaire. Cas de la radiolyse gamma

L'absorption de l'énergie d'un rayonnement ionisant par l'eau se fait pour la plupart par l'intermédiaire des électrons Compton.

Chaque électron peut être assimilé à un champ électrostatique mobile qui selon la distance d'interaction avec les molécules d'eau, les ionise ou les excite



dans les temps de l'ordre de  $10^{-16}$  s.

Le  $\text{H}_2\text{O}^+$ , acide très fort, réagit avec l'eau suivant la réaction

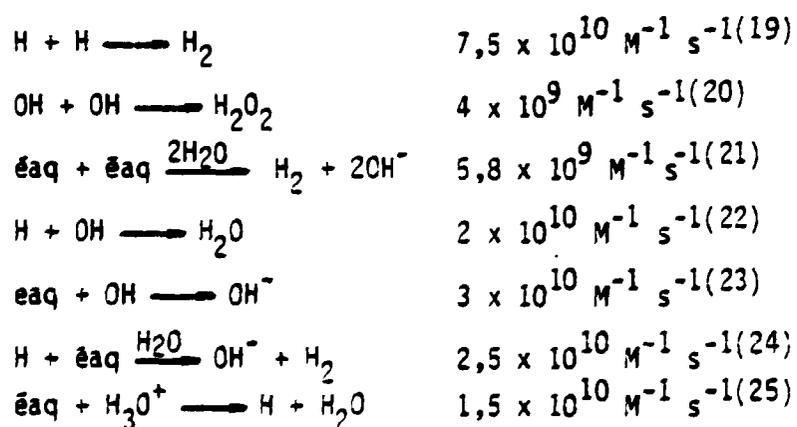


Cette réaction est complète  $10^{-14}$  s après le passage du rayonnement.

L'électron cédant son énergie au milieu par une série d'excitations et d'ionisations se thermalise. Finalement dans un temps de l'ordre de  $10^{-12}$  s il se solvate ( $\bar{e}\text{aq}$ ) en orientant les molécules d'eau dans son champ.

Le  $\text{H}_2\text{O}^{\cdot\cdot}$  se désexcite suivant deux processus principaux, soit par rupture homolytique, d'une liaison OH soit par choc avec les molécules du milieu.  $10^{-12}$  secondes après le passage du rayonnement il y a dans le milieu des zones hétérogènes qui contiennent de grandes concentrations en radicaux H, OH et  $\bar{e}\text{aq}$ .

A l'intérieur des zones hétérogènes les réactions suivantes ont lieu entre les différentes espèces ces réactions étant favorisées par la localisation des radicaux en compétition avec leur diffusion hors de ces zones :



Les valeurs des constantes de vitesses bimoléculaires sont données après les réactions.

A  $10^{-9}$  s après le passage du rayonnement, les espèces H, OH,  $\bar{e}\text{aq}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  résiduelles se trouvent réparties de manière homogène

dans la solution aqueuse où elles réagissent entre elles ou avec les solutés présents. Dans le cas de la radiolyse pulsée l'évolution de ces réactions peut être suivi en fonction du temps. Dans le cas de la radiolyse continue un état stationnaire s'établit pendant la durée de l'irradiation conduisant à une accumulation des produits de ces réactions.

## 2°) - Action des solutés

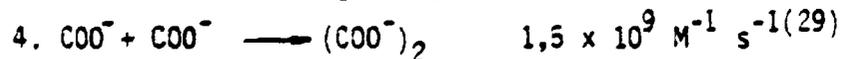
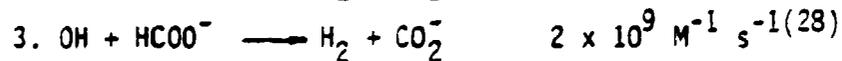
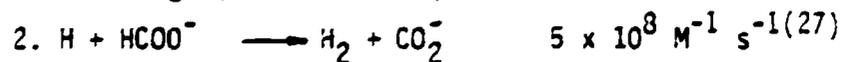
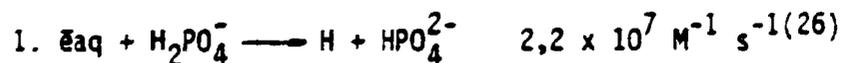
Quand un soluté est présent les espèces primaires (eaq, H, OH) peuvent réagir directement avec lui.

Dans les expériences de radiolyse pulsée qui seront décrites plus loin, compte tenu des doses déposées (20 krad), la concentration des espèces primaires produites est d'environ  $10^{-4}$ M.

Donc une concentration de  $10^{-3}$ M d'un soluté qui réagit avec les radicaux avec une constante de  $10^{10} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  consomme tous les radicaux aux dépens des autres réactions possibles.

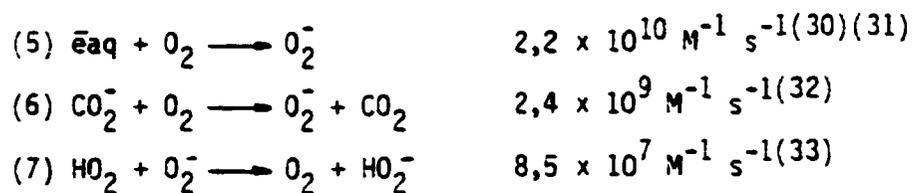
Certaines réactions avec les solutés peuvent être favorisées en choisissant les concentrations de ces derniers, et en particulier les réactions suivantes :

a.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O} = 5 \times 10^{-2} \text{M}, \text{Na COOH} = 0,16 \text{M}$  pH = 7,8 milieu désaéré



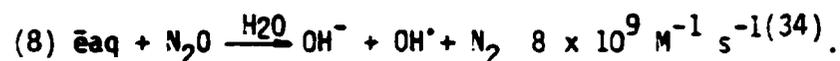
b.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O} = 5 \times 10^{-2} \text{M}; \text{NaCOOH} = 0,16 \text{M}, \text{pH} = 7,8$  solution aérée ou oxygénée

Réactions (1) (2) (3) (4) auxquelles il faut ajouter



c.  $NaH_2PO_4, H_2O = 5 \times 10^{-2} M$  ;  $NaCOOH = 0,16M$ ,  $pH = 7,8$   $N_2O \sim 10^{-2} M$

Réactions (1) (2) (3) (4) et



Les réactions avec les solutés  $HbFe^{III}$  et  $HbFe^{II}O_2$  seront envisagées dans la partie expérimentale.

### 3. Les techniques d'irradiation

#### 1°) - Dispositif utilisé en radiolyse pulsée

Ce dispositif comprend un générateur d'électrons, et un dispositif d'analyse par spectrophotométrie.

##### *Générateur d'électrons*

L'appareil utilisé est un canon à électrons (Febetron 707) dont le principe est le suivant : quand une forte tension est appliquée momentanément sur une cathode, par effet de champ, des électrons sont émis sous la forme d'une impulsion.

Dans le cas du Febetron la tension est fournie par la décharge en série de 80 modules chargés en parallèle sous 35000 volts chargeant ainsi la cathode à une tension de 2MV.

Les électrons émis sont focalisés par une lentille magnétique, la durée de l'impulsion à la sortie du canon est d'environ 100ns<sup>(35)</sup>. Les électrons présentent alors un large spectre en énergie (Fig. 11).

Afin de réduire celui-ci les électrons de 1,7 à 1,9MeV sont déviés à 90° par un champ magnétique<sup>(36)</sup>. Il en résulte une diminution de la durée de l'impulsion ainsi que le montre la figure 12 (16ns à la

base, 8ns à mi-hauteur).

Ces électrons traversent alors la cellule d'irradiation. Les événements qui se produisent dans la solution sont étudiés par spectrophotométrie d'absorption à l'aide du dispositif d'analyse.

#### *Dispositif d'analyse*

Il comprend une source intense de lumière continue, un monochromateur, un photomultiplicateur et un oscilloscope.

La lumière d'analyse provient d'une lampe à xénon (XB0 450) émettant un continuum de lumière dans la gamme des longueurs d'onde de 200 à 1500nm. Pour les mesures effectuées entre 10ns et 100 $\mu$ s le flux lumineux émis peut être augmenté d'un facteur 20 à 100 selon la longueur d'onde et ce d'une façon constante pendant 100 $\mu$ s<sup>(37)</sup>, (Fig. 13) en appliquant une tension surélevée aux bornes de la lampe. Le faisceau lumineux sortant de la cellule d'irradiation est orienté à l'aide de miroirs vers le dispositif de mesure Fig. 14.

Le monochromateur à prisme Zeiss M4QIII permet de travailler entre 220 et 750nm. L'incertitude maximale sur les longueurs d'onde était de 10nm.

A la sortie du monochromateur le signal lumineux est transformé en signal électrique par un photomultiplicateur Hamamatsu R446 à neuf étages d'amplification dont six seulement sont utilisés. Le câblage permet au photomultiplicateur de recevoir de fortes intensités lumineuses (3-4mA)<sup>(38)</sup> pendant des temps de 2ms soit la durée totale de la surtension de la lampe.

Le signal électrique du photomultiplicateur est envoyé sur un oscilloscope, Tektronix (type 485 ou 454), dont les temps de montée

sont respectivement 1 et 2ns. Une caméra Steinheil M3 permet d'enregistrer les oscillogrammes sur film polaroid 3200 ASA. La figure 14 montre un oscillogramme type obtenu;  $I_0$  et  $I$  représentent l'intensité de la lumière à la sortie de la cellule d'irradiation,  $I_0$  étant celle avant l'impulsion,  $I$  étant celle après l'impulsion. La différence entre  $I$  et  $I_0$  rend compte du fait qu'une espèce transitoire a été formée celle ci absorbant plus que la solution initiale.

La mesure de la densité optique  $DO = \log \frac{I_0}{I}$  à différentes longueurs d'onde  $\lambda$  à un temps donné après le passage de l'impulsion permet de tracer le spectre d'absorption de cette espèce transitoire.

L'étude de la variation de la densité optique en fonction du temps à une longueur d'onde donnée, permet de déterminer l'ordre et la constante de vitesse de la réaction ayant lieu. Dans cette étude pratiquement tous les spectres enregistrés sont différentiels c'est-à-dire que ce sont des spectres relatifs qui ne traduisent que l'écart entre le spectre initial et le spectre final (Fig. 15).

#### *Dosimétrie*

La connaissance de la dose (énergie déposée dans la solution par l'impulsion d'électrons) se fait à l'aide d'une mesure de l'énergie totale déposée dans le bloc cible, cette énergie collectée dans un système de condensateurs donne une différence de potentiel qui est mesurée aux bornes du système après le passage de l'impulsion. La corrélation entre cette mesure et la dose déposée dans la cellule d'irradiation a été faite à l'aide d'un dosimètre chimique. Dans notre cas l'absorption de l'électron hydrate dans l'eau trisdistillée était utilisée, la longueur d'onde était 720nm<sup>(39)</sup> maximum d'absorption du spectre de l'électron hydraté ( $G=3$ ,  $\epsilon = 17500M^{-1}s^{-1}$  à 30ns). La correspondance trouvée est 106 krad/volt.

## 2°) - Le dispositif en radiolyse gamma

Le dispositif d'irradiation de  $^{60}\text{Co}$  comprend la source mobile qui dans la position d'irradiation, est entourée d'une série de trous où peuvent être positionnés les échantillons, le débit de dose varie suivant leur localisation par rapport à la source.

La dosimétrie de chaque position est effectuée à l'aide du dosimètre de Fricke<sup>(40)</sup> pour lequel en milieu aéré  $G(\text{Fe}^{3+}) = 15,6$  où  $G_x$  rendement de l'espèce  $x$ , représente le nombre d'espèces  $x$  apparues pour 100 eV absorbés. La concentration en ions ferriques apparus est dosée spectrophotométriquement ( $\lambda_{\text{max}} = 304\text{nm}$ ,  $\epsilon_{304} = 2197\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  à  $25^\circ\text{C}$ ). La loi de Beer Lambert ( $D_0 = \epsilon \cdot c \cdot l$ ), est respectée jusqu'à  $[\text{Fe}^{3+}] = 10^{-2}\text{M}$ .

3°) - Certaines expériences notamment en radiolyse pulsée nécessitent que les solutions soient saturées en un gaz donné (argon, oxygène, ou protoxyde d'azote). Pour cela nous avons utilisé l'appareillage montré sur la figure 16. Ce système permet de saturer les solutions en un gaz désiré puis d'entretenir au-dessus de la solution une atmosphère de ce même gaz afin que les solutions restent toujours saturées et surtout d'éviter que la solution ne se dégrade. En effet les molécules de protéines possèdent des parties hydrophobes et hydrophiles, des bulles se forment à la surface de la solution. Quand elles éclatent, il se forme à l'interface de la solution un dépôt de protéine qui ne se redissout pas.

Si le gaz traverse la solution pendant très longtemps, la concentration en protéine varie continuellement, par exemple au cours d'une journée de manipulation, ce qui fausse les résultats.

## 4.-- RESULTATS EXPERIMENTAUX ET INTERPRETATIONS

A. Etude en radiolyse pulsée

Le but de ce travail déjà précisé dans l'introduction, est l'étude de la réactivité de  $O_2^-$  vis-à-vis de deux protéines, la méthémoglobine et l'oxyhémoglobine.

Le mode de préparation radiolytique de  $O_2^-$  a été décrit au chapitre précédent (cf. chap. 3.2).

L'électron hydraté transfère sa charge directement à l'oxygène alors que les radicaux hydroxyles et les atomes d'hydrogène réagissent sur l'ion formiate pour former l'ion moléculaire  $CO_2^-$  qui à son tour réagit sur l'oxygène pour former  $O_2^-$ . Ces divers radicaux se produisent en des temps qui dépendent des concentrations relatives des espèces mises en présence; c'est pourquoi il est apparu nécessaire d'étudier leur réactivité vis-à-vis de la méthémoglobine. Les effets chimiques de  $CO_2^-$ ,  $e_{aq}^-$  et  $O_2^-$  ont été successivement étudiés.

Les réactions éventuelles de OH et H avec les protéines ne sont pas à envisager dans ce travail du fait de la forte concentration en formiate utilisée (0,16M)

1°) - Irradiations de solutions aqueuses contenant de la méthémoglobinea - Réduction de la méthémoglobine par  $CO_2^-$ 

Lorsque la solution de méthémoglobine est préalablement saturée en protoxyde d'azote  $N_2O$ , la seule espèce créée en quelques nanosecondes est le radical  $CO_2^-$ .

La figure 17 montre le spectre différentiel par rapport à  $HbFe^{III}$  obtenu pour une solution contenant  $4,94 \times 10^{-5} N$  en méthémoglobine pH = 7,8 irradiée à une dose de 30krad (espèce n° 1), 50 nanosecondes après le début de l'impulsion.

Dans la région de longueurs d'onde explorée ce spectre ne présente pas de points isosbestiques avec la méthémoglobine.

Cette absorption "initiale" évolue ensuite jusqu'à une valeur palier atteinte après 2,5ms : on obtient alors l'espèce n° II indiquée sur la figure 18. Ce spectre qui présente un maximum d'absorption à 560nm et des points isosbestiques avec la méthémoglobine à 515 et 605nm possède donc des similitudes avec le spectre de la déoxyhémoglobine.

Dans les conditions de l'expérience les temps de vie des espèces primaires  $\bar{e}aq$ , OH, H sont respectivement 4,2 et 9ns; c'est la raison pour laquelle l'espèce correspondant au spectre n° I ne peut être due qu'à une réaction de  $CO_2^-$  avec la protéine.

L'évolution ultérieure du spectre I vers le spectre II suggère que cette réaction n'est pas une réaction directe de  $CO_2^-$  avec le fer de l'hème mais correspond plutôt à une fixation de  $CO_2^-$  sur la globine. Cet effet serait alors comparable à ce que l'on observe lors de la fixation de  $CO_2$  par la déoxyhémoglobine, le  $CO_2$  ne se lie pas avec le fer mais à des fonctions basiques de la partie protéique de la molécule. On peut estimer d'après le temps d'apparition la constante de vitesse  $k_1$  de la réaction  $CO_2^- + HbFe^{III} \xrightarrow{k_1} CO_2^- - HbFe^{III}$  à  $2 \times 10^{11} M^{-1}s^{-1}$ .

L'obtention du spectre n° II, qui s'effectue selon une cinétique du premier ordre,  $k \approx 2 \times 10^3 s^{-1}$ , pourrait correspondre à un transfert de charge le long de la globine jusqu'au fer de l'hème. Cette réaction a été envisagée par Shafferman<sup>(41)</sup> et Simic<sup>(42)</sup> à propos de la réduction de cytochrome C par les radicaux  $H^\cdot$ .

### b. Réduction par l'électron hydraté

Au cours de la radiolyse de solutions désaérées (argon) de formiate seules les espèces  $CO_2^-$  et  $\bar{e}aq$  sont créées dans le temps de l'impulsion. L'étude préalable de la réactivité de  $CO_2^-$  vis-à-vis de la méthémoglobine

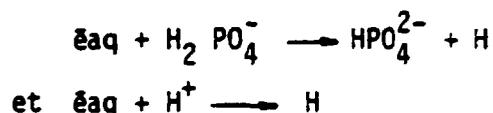
permet maintenant d'envisager celle de la réduction produite par l' $\bar{e}aq$  (étude cinétique et spectrale).

Etude cinétique : mesure de la constante de vitesse de la réaction de  $\bar{e}aq$  avec la méthémoglobine.

Cette mesure est effectuée à 720nm où seul l'électron hydraté absorbe dans des solutions contenant des concentrations différentes mais faibles de méthémoglobine.

Les doses déposées dans la solution ont été choisies faibles (quelques krad) afin de diminuer l'effet des réactions de recombinaison de type biradicalaire telles que ( $\bar{e}aq + \bar{e}aq \xrightarrow{2H_2O} H_2 + 2OH^-$ ).

Sous ces conditions les réactions qui interviennent dans le mécanisme de disparition de l'électron sont :



La figure 19 donne la variation de la valeur de la constante de vitesse de disparition de  $\bar{e}aq$  en fonction de la concentration en  $HbFe^{III}$ . La constante cinétique a été trouvée du pseudo premier ordre.

La pente de la droite  $k = f(HbFe^{III})$  permet de calculer la constante de vitesse de la réaction  $\bar{e}aq + HbFe^{III}$

$$k (\bar{e}aq + HbFe^{III}) = (1,2 \pm 0,2) 10^{10} M^{-1} s^{-1}$$

Cette valeur est en accord avec celle de Clément<sup>(43)</sup> et Ilan<sup>(44)</sup>.

Etude spectrale : observations expérimentales

La figure 20 représente les spectres obtenus 10, 500 et 4500 $\mu$ s après l'impulsion dans une solution aérée contenant  $4,7 \times 10^{-5} M$  de  $HbFe^{III}$  irradiée à 20krad.

Le temps de 10 $\mu$ s a été choisi pour ne pas être gêné par l'absorption due à l'électron hydraté dont le temps de demi vie est de l'ordre

de quelques microsecondes. Les autres temps correspondent à des paliers dans l'évolution temporelle. Ce spectre ayant son maximum d'absorption à 560nm présente des similitudes avec celui de la déoxyhémoglobine.

Du fait de la faible contribution spectrale due à l'action de  $\text{CO}_2^-$  (figure 18) pour une concentration de ce réducteur double de celle mise en oeuvre pour ces expériences ( $G(\text{CO}_2^-) = G(\text{OH}) + G(\text{H}) \simeq 3$ ) il apparaît que le spectre de la figure 20 rend compte pour 94% de la réaction éaq +  $\text{HbFe}^{\text{III}}$ .

L'évolution ultérieure aboutit en 500us à un spectre IV (Fig. 20) spectre qui est tout à fait comparable (même maximum, même points isobestiques avec  $\text{HbFe}^{\text{III}}$ ) à celui obtenu lors de l'étude de la réaction  $\text{CO}_2^- + \text{HbFe}^{\text{III}}$  (Fig. 18), à la différence d'absorption près et ce pour les mêmes conditions d'irradiation.

On aurait pu s'attendre à ce que cette espèce IV n'évolue pas en fonction du temps, or elle subit une évolution lente qui se poursuit 4,5ms après l'impulsion (V).

#### Etude spectrale: identification des spectres

Le spectre III (figure 20) reflète la réaction de réduction de la méthémoglobine pour donner de la méthémoglobine réduite ; sa forme et la longueur d'onde de son maximum d'absorption présentent des similitudes avec ceux du spectre de la déoxyhémoglobine.

Il en est de même pour le spectre IV dont le maximum d'absorption se situe aussi à 560nm. Ces résultats conduisent à penser que ces deux spectres correspondent aux deux formes de la déoxyhémoglobine comme cela a été suggéré par Raap<sup>(45)</sup> lors d'une étude en radiolyse pulsée de même système mais à un pH différent.

La transition entre les espèces correspondant aux spectres III et IV rendait alors compte du passage de la forme la moins stable (R) à

la forme la plus stable (T) de la déoxyhémoglobine (cf paragraphe précédent). Cette transition s'effectue selon une cinétique du premier ordre avec une constante de vitesse  $k = (1,5 \pm 0,5)10^4 \text{ s}^{-1}$ .

L'évolution spectrale suivante observée entre 500 $\mu$ s et 4,5ms peut être expliquée par une réorganisation de la structure tertiaire de la protéine à la suite du changement de conformation R  $\rightarrow$  T

En conclusion de ces deux études sur la réactivité de  $\text{CO}_2^-$  et  $\text{e}_{\text{aq}}^-$  d'après les résultats auxquels on peut aboutir, il apparaît :

- que la variation d'absorption dans la région 500-600nm est essentiellement due à la réduction de  $\text{HbFe}^{\text{III}}$  par l'électron hydraté.

- qu'il n'est pas nécessaire de supposer un transfert intramoléculaire dans le cas de la réaction avec l'électron hydraté mais plutôt qu'une réduction directe du site actif a lieu pour donner la forme instable de la déoxyhémoglobine qui par suite prend sa forme stable après réorganisation de la structure tertiaire en plusieurs millisecondes. La connaissance et l'interprétation des effets observés permet maintenant d'aborder l'étude de la réactivité possible de l'ion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ )

### c. Etude de la réactivité de l'ion superoxyde $\text{O}_2^-$

La formation de l'ion superoxyde peut être obtenue comme précédemment indiqué, soit en solution aérée ( $[\text{O}_2] = 2,3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) soit oxygénée ( $[\text{O}_2] = 1,3 \times 10^{-3} \text{ M}$ )

#### Résultats obtenus dans les solutions aérées de méthémoglobine

La figure 21 représente les spectres correspondant aux espèces formées 10 $\mu$ s, 300 $\mu$ s et 8ms après l'impulsion.

Ces temps ont été choisis à partir des changements d'absorption observé à  $\lambda = 430\text{nm}$ <sup>(4)(5)</sup> là où les coefficients d'extinction molaire sont les plus élevés. Une autre longueur d'onde aurait aussi bien pu être choisie.

Dans les temps inférieurs à la dizaine de microsecondes, il y a un accroissement de l'absorption suivie d'une décroissance de celle-ci qui aboutit en  $800\mu\text{s}$  à un palier dont la durée est d'environ 3s. Ce palier se termine par une augmentation de l'absorption qui se poursuit jusque 8mn après l'impulsion.

#### Identification des spectres VI et VII

Le spectre VI est du même type que celui obtenu lors de la réduction de  $\text{HbFe}^{\text{III}}$  par  $\text{eaq}$  (spectre III Fig. 19) ainsi que cela apparaît sur la figure 22 où les deux spectres ont été normalisés à partir de l'absorption à  $\lambda_{\text{max}} = 560\text{nm}$ .

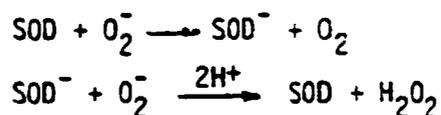
Le spectre VII de la figure 21 possède deux bandes d'absorption centrées à 540 et 575nm et deux points isosbestiques avec la méthémoglobine.

Ces caractéristiques permettent d'attribuer ce spectre à l'oxyhémoglobine (Fig. 9). Il est à noter que la bande 560nm de la déoxyhémoglobine et celle à 575nm de l'oxyhémoglobine ont le même coefficient d'extinction molaire alors que le rapport des densités optiques dans le cas des spectres VI et VII est d'environ 2.

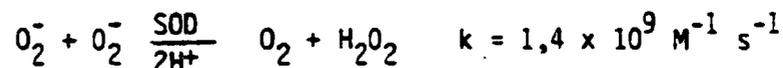
Les espèces  $\text{eaq}$  et  $\text{CO}_2^-$  participent aux mécanismes d'apparition du spectre VI mais il n'est pas exclu que  $\text{O}_2^-$  y participe aussi.

Afin de préciser la contribution de l'ion superoxyde dans ce mécanisme, une enzyme, la superoxyde dismutase (SOD) a été ajoutée aux solutions.

En effet les SOD sont des métalloprotéines qui ont la propriété de catalyser la réaction de dismutation des ions superoxydes<sup>(46)</sup> suivant le mécanisme.



de telle sorte que l'on puisse écrire



#### 2. Solution contenant de la SOD

La concentration de SOD utilisée était de  $2 \times 10^{-8} \text{ M}$  afin qu'elle n'intervienne dans le mécanisme que pour catalyser la dismutation de  $\text{O}_2^-$ .

La figure 23 montre qu'aucun effet dû à l'addition de SOD n'est décelable sur l'intensité des spectres VI et VII. Ce résultat peut être expliqué de deux manières différentes.

Ou bien  $\text{O}_2^-$  ne réagit pas avec la méthémoglobine où la réaction de  $\text{O}_2^-$  avec  $\text{HbFe}^{\text{III}}$  est plus rapide que sa réaction avec la SOD.

L'hypothèse d'une telle réaction supposerait une constante de vitesse  $> 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  afin de pouvoir entrer en compétition avec la réaction de dismutation de  $\text{O}_2^-$ . Cette valeur de constante de vitesse semble peu vraisemblable.

Ainsi dans les conditions de la radiolyse pulsée ( $(\text{O}_2^-)_0 = 10^{-4} \text{ M}$ ) la réaction de  $\text{O}_2^-$  avec la protéine ne peut donc entrer en compétition avec la réaction de dismutation  $\text{O}_2^- + \text{HO}_2^-$  réaction de disparition de  $\text{O}_2^-$  la plus probable à ce pH.

Afin de voir si la réaction  $\text{e}_{\text{aq}}^- + \text{HbFe}^{\text{III}}$  est prépondérante dans le mécanisme d'apparition des spectres VI et VII, cette réaction sera défavorisée par la présence d'un accepteur d'électron hydraté en l'occurrence l'oxygène.

*c. Solution saturée en oxygène*

La figure 24 rend compte de l'influence sur le spectre VI de la variation de la concentration en oxygène dans les solutions. Il apparaît que l'intensité du spectre de l'espèce VI diminue d'un facteur 2,1 quand la concentration en oxygène augmente.

Ce rapport est différent de celui de 3,8, rapport des pourcentages théoriques d'électrons qui disparaissent par la réaction  $\bar{e}aq + HbFe^{III}$ . Ce calcul grossier tient compte des concentrations  $(\bar{e}aq)_0$ ,  $(O_2)_0$ ,  $(HbFe^{III})_0$ ,  $(H^+)_0$ ,  $(H_2PO_4^-)_0$  et des constantes de vitesse des réactions de disparition de l'électron.

La réaction  $\bar{e}aq + HbFe^{III}$  n'est alors pas la réaction prépondérante à l'apparition du spectre VI. On pouvait s'en douter connaissant la réactivité de  $CO_2^-$  avec cette protéine.

L'apparition du spectre VI est donc due à une compétition entre les réactions de  $CO_2^-$  et  $eaq$  avec  $HbFe^{III}$ .

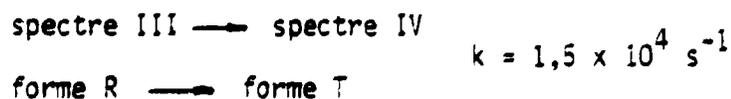
La figure 25 rend compte de l'influence de la concentration en  $O_2$  sur le spectre VII. Celui-ci diminue comme le spectre VI dans un rapport 2.

Cela suppose que la transition VI  $\rightarrow$  VII correspond à l'oxygénation totale de l'espèce (VI).

La cinétique de cette réaction aux différentes longueurs d'ondes étudiées (430, 540, 555 et 575nm) est du pseudo premier ordre.

$$k' = k(O_2) = 6,8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$$

Il apparaît ainsi, compte tenu du temps nécessaire pour que la transition forme R  $\rightarrow$  forme T se produise, que c'est la forme T qui s'oxygène lors de l'irradiation des solutions aérées de méthémoglobine



La figure 26 montre la superposition des spectres III, IV, VI et VII les spectres III et VI ayant été normalisés. Dans ce cas l'absorption du spectre IV à 560nm et du spectre VII à 575nm est peu différente. Ces faits semblent confirmer que c'est bien la forme T, la plus stable, qui s'oxygène.

#### Identification du spectre VIII

Les mécanismes réactionnels donnant les espèces VI et VII ayant été identifiés, il n'en est pas de même pour la réaction qui aboutit à la formation de l'espèce VIII.

Les espèces OH et H ayant réagi avec le formiate, l'eau et CO<sub>2</sub><sup>-</sup> avec la méthémoglobine en compétition avec l'oxygène, les ions superoxydes s'étant dismutés en quelques centaines de microsecondes, seule une réaction de l'eau oxygénée (formée par radiolyse) sur les espèces présentes HbFe<sup>III</sup> ou HbFe<sup>II</sup>O<sub>2</sub> peut expliquer l'apparition du spectre VIII.

Un moyen de mettre en évidence l'éventualité d'une telle réaction consiste à détruire l'eau oxygénée formée dans les solutions par l'addition préalable de catalase, protéine hémique connue pour décomposer catalytiquement l'eau oxygénée selon :



#### 1. Solution aérée contenant de la catalase

Une faible concentration en catalase ( $3 \times 10^{-8}\text{M}$ ) permet la décomposition de l'eau oxygénée sans que la catalase ne réagisse avec les espèces primaires.

La figure 27 montre l'influence de la catalase sur le spectre VIII. Cela confirme que la réaction qui aboutit à la formation de l'espèce VIII fait intervenir l'eau oxygénée.

Le temps de demi-vie de cette réaction étant supérieur à la minute, il est donc possible de faire le mélange  $\text{HbFe}^{\text{III}}-\text{H}_2\text{O}_2$  et de suivre spectrophotométriquement la variation d'absorption de ce mélange en fonction du temps afin de voir si l'espèce n° VIII est due à une réaction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  avec  $\text{HbFe}^{\text{III}}$  ou  $\text{HbFe}_{\text{RED}}^{\text{III}}-\text{O}_2$ .

Cette réaction est décrite dans ce chapitre bien que ce ne soit pas une réaction de radiolyse pulsée.

e. Etude spectrophotométrique de la réaction de l'eau oxygénée sur la méthémoglobine

Deux solutions étaient mélangées, la concentration juste après le mélange était :  $\text{HbFe}^{\text{III}} = 3,2 \times 10^{-5} \text{N}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2 = 1,2 \times 10^{-3} \text{M}$ ,  $\text{pH}=7,8$

A 550nm on peut observer un accroissement de l'absorption dans les temps de 6mn après le mélange (Fig. 28); cet accroissement aboutit à un palier correspondant à l'absorption du spectre IX (Fig. 29).

Ce spectre est tout à fait comparable au spectre VIII.

Les conditions expérimentales, voir ci-dessus, permettent d'expliquer la cinétique du pseudo premier ordre trouvée pour cette réaction.

$$k' = k(\text{H}_2\text{O}_2) = 8.10^{-3} \text{s}^{-1}$$

$$k(\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HbFe}^{\text{III}}) = 6,6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$$

Cette réaction semble être une complexation de  $\text{HbFe}^{\text{III}}$  par  $\text{H}_2\text{O}_2$ (47) donnant  $(\text{HbFe}^{\text{III}}-\text{OOH})$ .

Le spectre de cette espèce  $\text{HbFe}^{\text{III}}\text{OOH}$  évolue en quelques heures (Fig. 30) vers celui d'une autre forme connue de l'hémoglobine, l'hémichrome(48).

L'hémichrome est une forme irréversible de la méthémoglobine dans laquelle  $\text{Fe}^{\text{III}}$  échange directement une liaison avec l'histidine E<sub>7</sub> de la globine (Fig. 31).

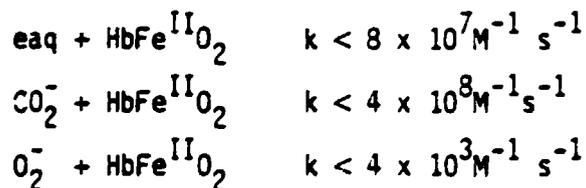
La réaction qui aboutit à la formation de l'espèce VIII est donc une complexation lente de la méthémoglobine par l'eau oxygénée.

## 2°) - Radiolyse de solutions aérées contenant de l'oxyhémoglobine

L'irradiation (20krad) de solutions aqueuses  $2,7 \times 10^{-5} \text{N}$  d'oxyhémoglobine ne conduit à aucun changement d'absorption aux longueurs d'ondes étudiées (430, 540, 560 et 575nm) dans les temps compris entre  $10^{-6}$  et 1s ainsi qu'il a déjà été signalé<sup>(4)(5)</sup>.

Il est donc possible de conclure que les espèces  $\text{eaq}$ ,  $\text{CO}_2^-$  et  $\text{O}_2^-$  disparaissent autrement que par leurs réactions avec la protéine.

Un calcul permet de déterminer la valeur maximale des constantes de vitesses des réactions  $\text{eaq}$ ,  $\text{CO}_2^-$ ,  $\text{O}_2^-$  avec  $\text{HbFe}^{\text{III}}$  en supposant que celles-ci puissent avoir lieu



Cette valeur limite est en accord avec celle trouvée par H.C Sutton<sup>(49)</sup> et al. et C. Winterbourn et al.<sup>(50)</sup> à pH7  $k(\text{O}_2^- + \text{HbFe}^{\text{III}}) = 4 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$

## B. Etude en radiolyse continue

Une précédente étude a été faite en ce qui concerne la réactivité de  $\text{O}_2^-$  avec la méthémoglobine<sup>(4)</sup> mais l'eau oxygénée formée dans les solutions a rendu difficile l'interprétation de ces résultats.

L'étude à une seule longueur d'onde utilisée à cette occasion demande à être complétée.

Pour cette nouvelle étude nous avons enregistré après chaque expérience le spectre différentiel de la solution irradiée. Le spectre différentiel est obtenu en plaçant sur le faisceau de référence du spectrophotomètre à double faisceau l'échantillon non irradié.

Compte-tenu de la vitesse de déroulement du spectre (2nm par seconde) il serait possible de penser que les éléments reproduits par le spectre à 650nm et à 450nm correspondent à des temps différents d'analyse ( $\Delta t = 2\text{mn}$ ).

Or ceci n'est pas juste car en présence de catalase il n'y a pas d'effet prolongé (dû à l'eau oxygénée).

Dans un premier paragraphe nous exposerons les résultats concernant la méthémoglobine, dans le second nous donnerons certains résultats obtenus dans les solutions aqueuses d'oxyhémoglobine.

#### 1°) - Irradiation de solution contenant de la méthémoglobine

La figure 32 donne les spectres obtenus pour des irradiations à différentes doses de solutions aérées de méthémoglobine contenant de la catalase.

Le débit de dose utilisé était constant au cours de ces irradiations.

Remarquons qu'il n'est pas possible de voir l'espèce correspondant au spectre VI, les mesures ne pouvant être effectuées que 3mn après la fin des irradiations.

La figure 33, donne les spectres obtenus sous les mêmes conditions expérimentales ( $[\text{HbFe}^{\text{III}}]$ , pH, dose) mais avec une concentration plus grande en oxygène dans les solutions.

Le rapport des spectres d'oxyhémoglobine (VII) pour une même dose et pour des concentrations en oxygène différentes ( $2,3 \times 10^{-4}\text{M}$  et  $1,35 \times 10^{-3}\text{M}$ ) est de 1,8 dans le cas de la radiolyse continue alors qu'il est de 2,1 dans le cas de la radiolyse pulsée.

Afin de voir si les ions superoxydes ont une contribution dans l'apparition des spectres en radiolyse continue, de la SOD a été ajoutée à la solution.

L'effet de la SOD est net (Fig 34): en effet même la différence de concentration ( $4,5 \times 10^{-5}N$ ,  $3,1 \times 10^{-5}N$ ) ne peut expliquer le rapport 2,5 trouvé entre le spectre A et le spectre C pour une même dose absorbée.

En radiolyse continue il est donc possible d'envisager la réaction  $O_2^- + HbFe^{III}$  dans le mécanisme de réduction de méthémoglobine.

Il faut toutefois remarquer que l'effet de l'oxygène est plus important en présence de SOD (rapport voisin de 3) qu'en son absence (rapport voisin de 1,8) (Fig. 35).

Ceci s'explique par le fait que dans l'apparition des spectres A et B il y a une contribution de la réaction  $O_2^- + HbFe^{III}$ , réaction qui est peu sensible à cette variation de concentration en oxygène. Le rapport s'en trouve donc affecté si l'on considère qu'en présence de SOD seul la réaction de l'électron hydraté avec la méthémoglobine explique l'apparition des spectres C.

Connaissant la valeur des constantes de vitesse des réactions  $\bar{e}aq + O_2$ ,  $\bar{e}aq + HbFe^{III}$ ,  $\bar{e}aq + H_2PO_4^-$  ainsi que les concentrations  $(O_2)_0$ ,  $(HbFe^{III})_0$ ,  $(H_2PO_4^-)_0$  il est possible de trouver le pourcentage d'électrons qui passe par la réaction  $\bar{e}aq + HbFe^{III}$ . Dans nos conditions expérimentales (pH=7,8,  $(HbFe^{III}) = 3,1 \times 10^{-5}N$ ,  $H_2PO_4^- = 8 \times 10^{-3}M$ ) les pourcentages sont les suivants :

$$[O_2] = 2,8 \times 10^{-4}M \quad 5,95\%$$

$$[O_2] = 1,35 \times 10^{-3}M \quad 1,35\%$$

Dans l'hypothèse de la seule réaction  $\bar{e}aq + HbFe^{III}$ , le rapport des intensités des spectres C et D devrait être celui des pourcentages précédemment calculés.

Dans ce calcul le rapport est de 4,4 alors que le rapport d'absorption est de 3.

Il y a donc une autre réaction qui participe à l'apparition de ces spectres; d'après les résultats obtenus en radiolyse pulsée ce doit être la réaction  $CO_2^- + HbFe^{III}$ .

En conclusion il a été possible par radiolyse gamma de mettre en évidence la réaction de  $O_2^-$  avec la méthémoglobine.

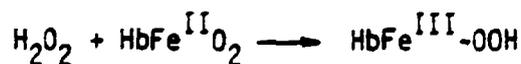
2°) - Irradiation de solution aqueuse contenant de l'oxyhémoglobine en présence de catalase

Dans cette étude une seule irradiation a été faite, les résultats de cette expérience semble montrer qu'il y a une oxydation de l'oxyhémoglobine par une des espèces produites au cours de la radiolyse de l'eau ( $\bar{e}aq$ ,  $CO_2^-$ ,  $O_2^-$ ). Ce fait a été observé au cours d'une irradiation d'oxyhémoglobine concentration =  $(2,5 \times 10^{-5}M)$ .

La réaction thermique  $HbFe^{II}O_2 + H_2O_2$ , réaction qui gêne l'interprétation des résultats<sup>(4)</sup> en radiolyse continue en absence de catalase, a ainsi été étudiée.

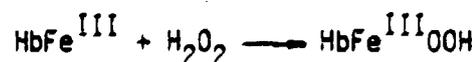
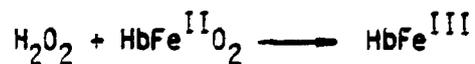
Quand de l'eau oxygénée ( $6 \times 10^{-4}M$ ) est ajoutée à des solutions d'oxyhémoglobine ( $2,5 \times 10^{-5}M$ ) il y a une évolution pendant 20mn du spectre de l'oxyhémoglobine (Fig. 36) vers un spectre qui ressemble à celui du complexe  $HbFe^{III}-OOH$  décrit au paragraphe précédent (IV, A, 2, d). Une évolution plus lente est observée entre 20 et 200mn : celle-ci correspond à l'apparition de l'hémichrome<sup>(51)</sup>.

La constante de vitesse de la réaction :



a été trouvée égale à  $1,5M^{-1}s^{-1}$ .

Il est difficile actuellement de savoir si cette réaction passe par le stade de la formation de méthémoglobine



## CONCLUSION.-

Ce travail a permis la mise en évidence des réactions de la méthémoglobine avec certains radicaux formés par radiolyse de solution contenant du formiate et en particulier, les réactions avec  $\bar{e}aq$ ,  $CO_2^-$ . Les mécanismes réactionnels de ces deux espèces avec la méthémoglobine sont totalement différents quoique le produit final soit identique ( $HbFe^{II}$  forme R).

En effet l'un correspond à une réduction directe du site actif pour donner une forme instable de la déoxyhémoglobine (forme T) ( $k=1,2 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$ ): celle-ci évolue ensuite vers la forme stable R. ( $k=1,5 \times 10^4 s^{-1}$ ), dans l'autre cas il y a fixation directe de  $CO_2^-$  sur la globine ( $k=2 \times 10^{11} M^{-1} s^{-1}$ ) suivie d'un transfert de charge le long de celle-ci ( $k=2 \times 10^3 s^{-1}$ ).

Les irradiations effectuées en présence de l'enzyme superoxyde dismutase tant en radiolyse gamma qu'en radiolyse pulsée ont permis de montrer la faible réactivité de l'ion superoxyde  $O_2^-$  vis-à-vis de  $HbFe^{III}$  ( $k=4 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$ ).

Les études faites en présence de catalase font apparaître que l'eau oxygénée réagit avec la méthémoglobine pour former un complexe dont l'évolution ultérieure aboutit à une espèce proche de l'hémichrome.

En conclusion la faible réactivité de  $O_2^-$  avec  $HbFe^{III}$  et  $HbFe^{II}O_2$  permet de dire que l'oxyhémoglobine par son autoxydation "in vivo" joue donc le rôle de donneur d'ion superoxyde.

REMERCIEMENTS.—

Je remercie toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail. D'abord, Monsieur le Professeur J. Rosa et Melle. J. Thillet qui ont eu la patience de me supporter dans leurs locaux quand je venais séparer l'oxyhémoglobine. Ensuite Melle. Ferradini et M. Sutton qui ont eu le courage de me relire et la gentillesse de me corriger.

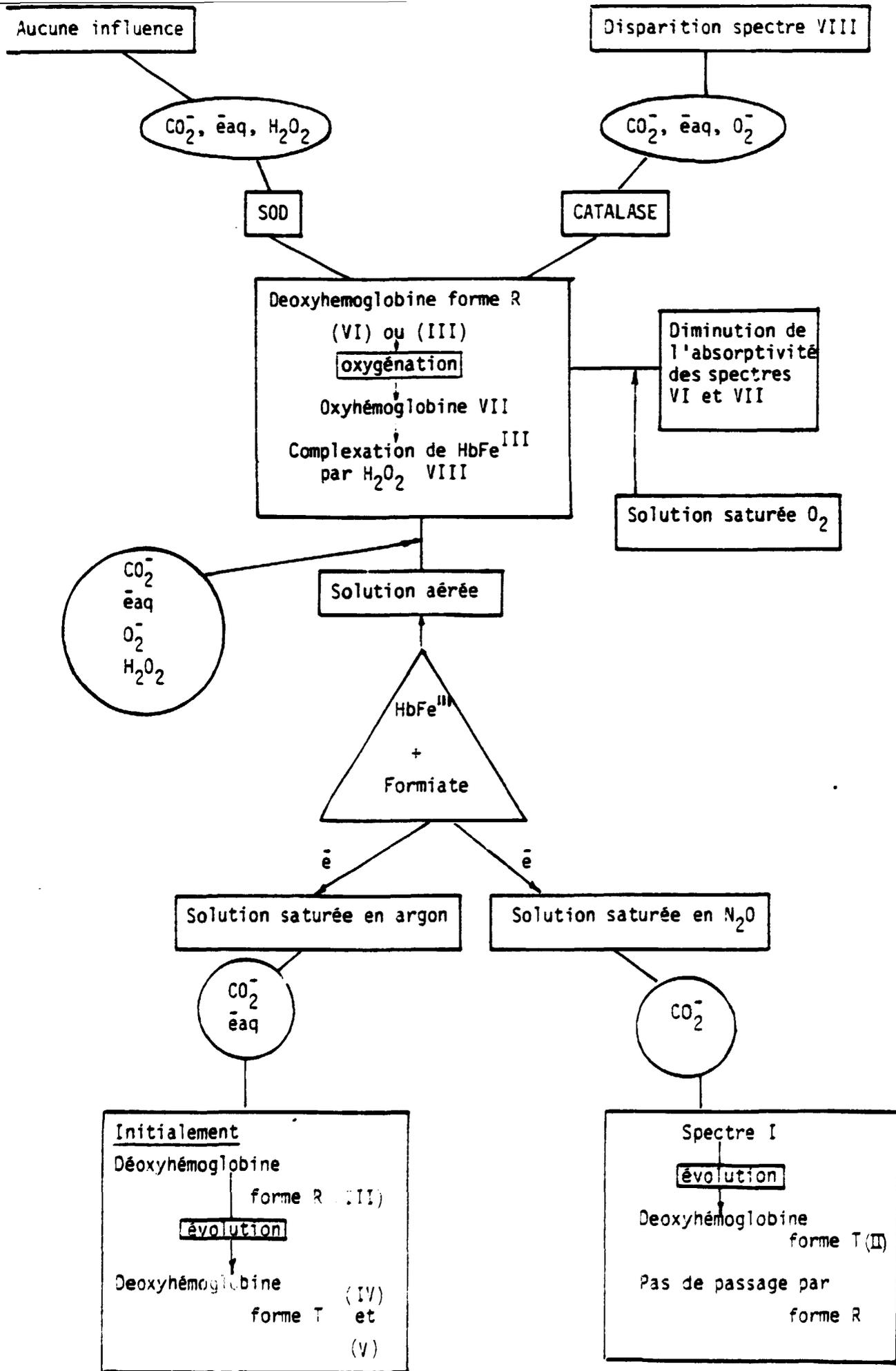
Merci aussi à toi J. Potier pour ton aide technique au Fébétron. Mais la personne que je voudrais remercier tout spécialement est M. L. Gilles pour l'aide scientifique et la diplomatie qu'il a su m'inculquer au cours des quelques années où nous avons travaillé ensemble.

REFERENCES.-

- 1 I. Fridovich, P. Handler, J. Biol. Chem, 236, (1961) 1836.
- 2 G. Rotilio, L. Calabresse, A. Finazzi Agro, B. Mondovi, Biochem. Biophys. Acta. 198, (1970), 618.
- 3 H.P. Misra, I. Fridovich, J. Biol. Chem. 247, (1972), 6960.
- 4 D. Haristoy, Thèse 3ème cycle.
- 5 C. Ferradini, J. Foos, L. Gilles, D. Haristoy, J. Pucheault Photochem. Photobiol. 28, (1978), 851.
- 6 A. Arnone, Nature, 247, (1974), 143.
- 7 R.J. Hill, W. Konigsberg, J. Biol. Chem., 237, (1962), 3151.
- 8 G. Braunitzer, R. Gehing-Miller, N. Hilschann, K. Hilse, G. Hobon, V. Rudoff, B. Wittmann-Liebold, Z. Physics. Chem. 325, (1961), 283.
- 9 A.L. Lehninger, Biochimie, 6ème Ed. Flammarion Médecine (1963).
- 10 Professeur, J. Rosa. cours de Biochimie. CHR Henri Mondor
- 11 M.F. Perutz, H. Murhead, J.M. Cox, LCG Goaman, Nature, 219, (1968), 1.
- 12 J. Monod, J. Wyman, J.P. Changeux, J. Mol. Biol. 12, (1965), 88.
- 13 R.E. Dickerson, J. Geiss, The Structure and action of protein, London, (1969), Harper and Row Ed.
- 14 O.W Van Assendelft, W.G. Zylstra, Anal. Biochem, 69, (1975), 43.
- 15 D.L. Drabkin, J.H. Austin, J. Biol. Chem. 112, (1935) 51.
- 16 D.L. Drabkin, (1961), Haematin Enzymes (Falk J.E. Lemberg E. Morton K Eds) p. 144 Pergamon Press, New-York.
- 17 International Committee for standardization in Haematology 1967, Brit, J. Haemat 13
- 18 D.L. Drabkin, Arch. Biochem. 21, (1949), 224.
- 19 J.K. Thomas, E.J. Hart, Rad Res, 17, (1962) 408.
- 20 H.A. Schwartz, J. Phys. Chem. 66, 225, (1962).
- 21 J.W. Boyle, J.A. Ghormley, C.J. Hochanadel, J.F. Riley, J. Phys. Chem. 73 (9) 2886, (1969).
- 22 J.K. Thomas, J. Phys. Chem. 68, 2593, (1963).
- 23 H. Anbar, M. Bambenek, A.B. Ross, NSRDS-NBS 43, (1973) 67.
- 24 M.S. Matheson, J. Rabani, J. Phys. Chem. 69, (1965) 1324.

- 25 L.M. Dorfman, I.A. Taube, J. Am. Chem. Soc. 85, 2370 (1963).
- 26 M. Hallman, I. Platzner, J. Phys. Chem. 70 (1966) 2291.
- 27 J. Rabani, J. Phys. Chem. 66, (1962) 331.
- 28 M.S. Matheson, W.A. Mulac, J.L. Weeks, J. Rabani, J. Phys. Chem. 70 (1966) 2092.
- 29 P. Neta, H. Simic, E. Hayon, J. Phys. Chem. 73 (12) 4207 (1969).
- 30 J.P. Keene, Rad. Res. 22 (1) (1964).
- 31 S. Gordon, E.J. Hart, M.S. Matheson, J. Rabani, J.K. Thomas J. Am. Chem. Soc. 85, 1375 (1963).
- 32 G.E. Adams, R.L. Wilson, Trans. Farad Soc. 65, 2981 (1969).
- 33 D. Behar, C. Czapski, L.M. Dorfmann, J. Rabani, H.A. Schwartz, J. Phys. Chem. 74, (3209) 1970.
- 34 A.M. Koulik-Pujo, B.D. Michael, E.J. Hart. Int. J. Rad. Phys. Chem. 3 (3) 333 (1970).
- 35 Field Emission Corporation, Technical Bulletin, B21-B Febetron 707.
- 36 B. Lesigne, R. Sauneuf, Rev. Sci. Instrum 47 (1063) (1976).
- 37 L. Gilles, C. Lemoine, B. Lesigne, P. Nacass, G. Sutter, Rapport CEA 4645 (1975).
- 38 J.W. Hunt, J.K. Thomas, Rad Res. 32, 149 (1967).
- 39 L. Gilles, A.W. Boyd, Can. J. Chem. 54, 531 (1976).
- 40 H. Fricke, A.J. Hart, Radiation Dosimetry, Vol. 2 Instrumentation (F.H. Attix and We Roesch Ed.) Accademic Press. New York (1966).
- 41 A. Shafferman, G. Stein, Science 183-428 (1974).
- 42 M.G. Simic, I.A. Taub. Faraday Discussion G3, Radiation Effects 63/22 Simic.
- 43 J.R. Clement, N.T. Lee, M.H. Klapper, L.M. Dorfman, J. Biol. Chem. 251, 7, 2077 (1976).
- 44 Y.A. Ilan, J. Rabani, G. Czapski, Biochim. Biophys. Acta, 446, 275 (1976).
- 45 A. Raap, J.W. Van Leeuwen, H.S. Rolleman S.H. de Bruin, F-EBS Letters 81, 1, 111 (1977).
- 46 J.M. McCord, I. Fridovich, J. Biol. Chem. 244, (2049) (1969).
- 47 D. Keilin, E.F. Hartree, Biochem. J. (1951), 49, 38.
- 48 E.A. Rachmilworts, E. Harari, Synthèse, Structure und fonction des Hämoglobins (H. Martin, L. Nowicki Ed.) p. 241.

- 49 H.C. Sutton, P.B. Roberts, C.C. Winterbourn, *Biochem. J.* 155, 503(1976).
- 50 C.C. Winterbourn, B.H. Mc Grath, R.W. Carrel, *Biochem. J.* 155, 493 (1976)
- 51 Akio Tomoda, Kazu Sugimoto, Hasakiko Suhara , Masazumi Takeshita,  
Yashimasa yonegama. *Biochem. J.* 171, 329 (1978).



TABEAU :

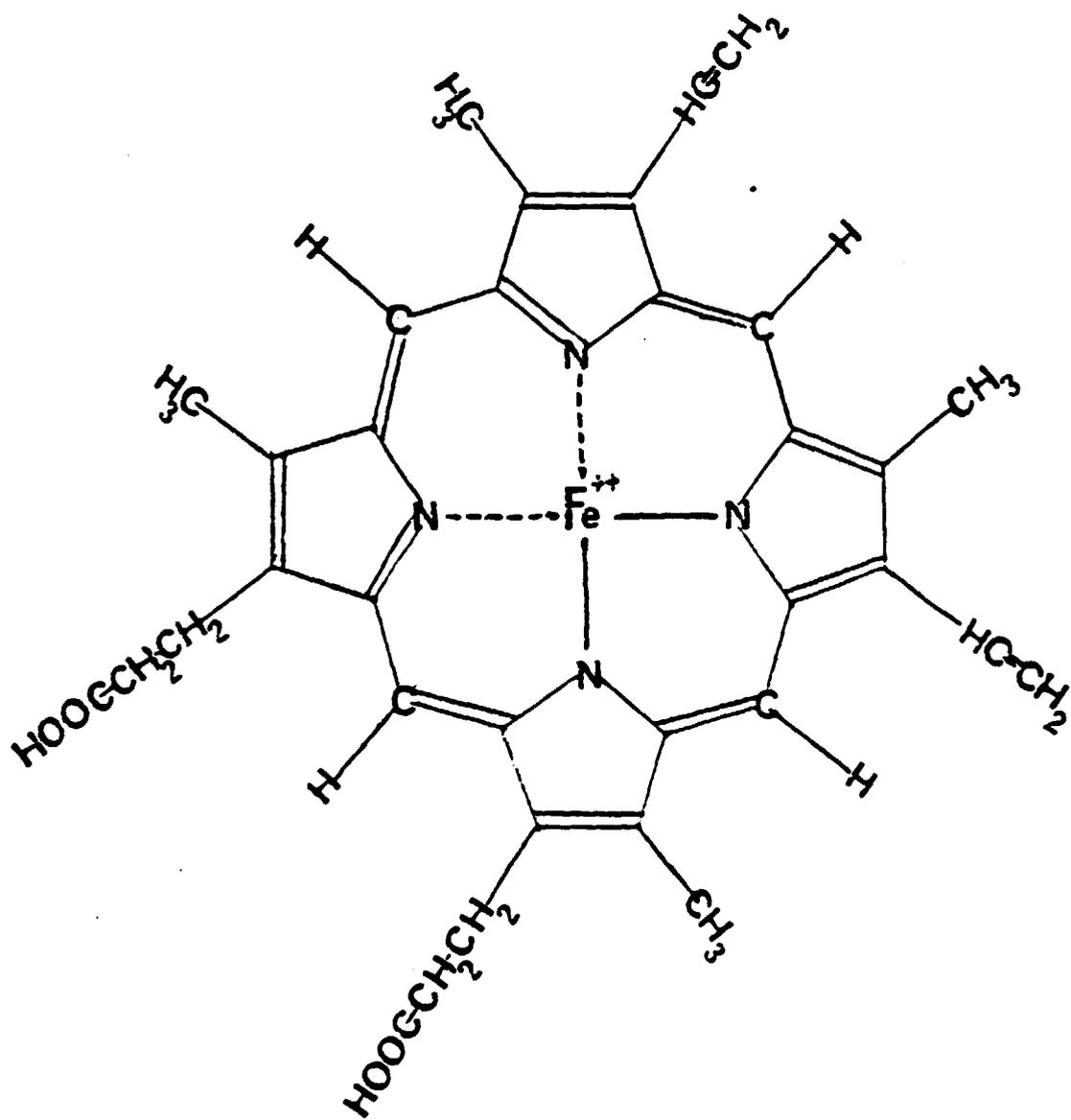


Figure 1 : Structure de l'hème.



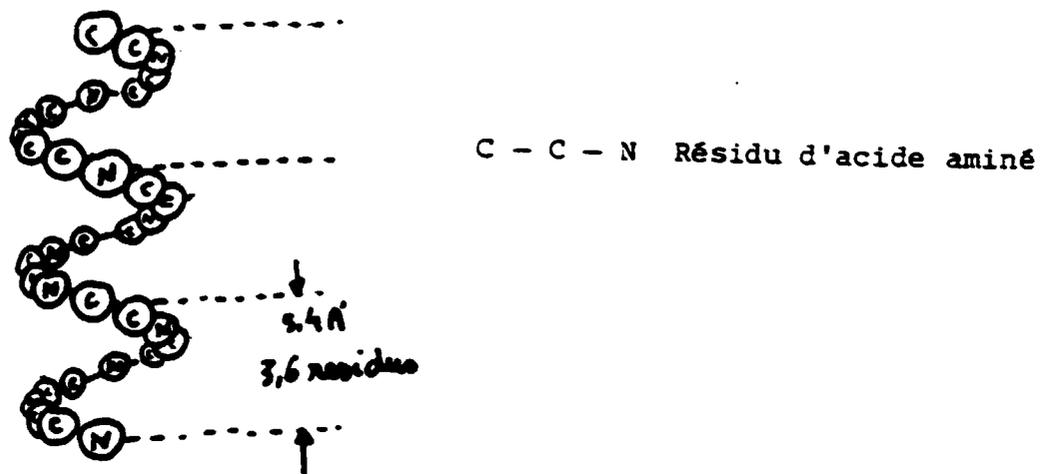


Figure 3 : Structure hélicoïdale.

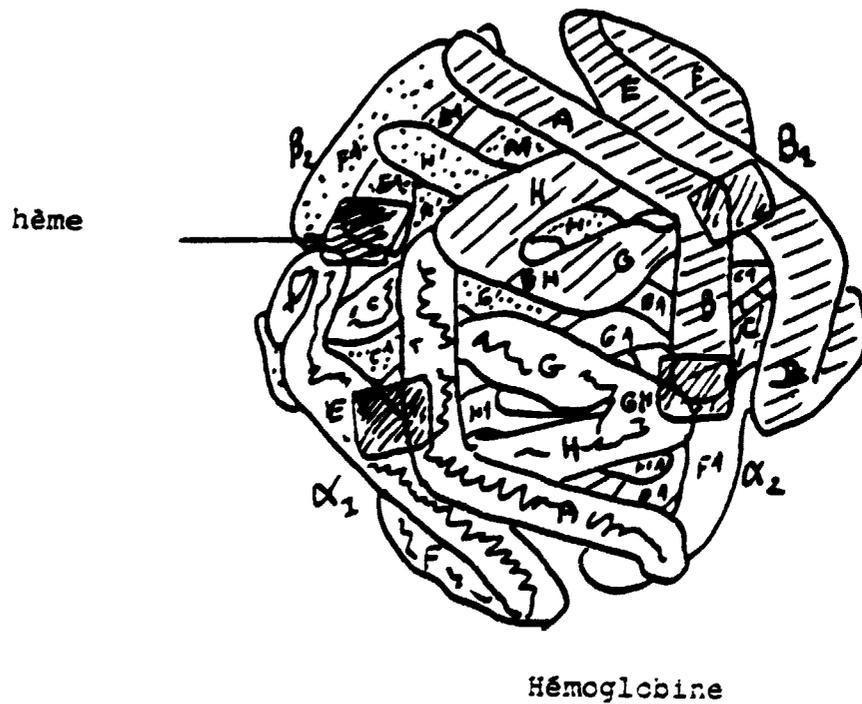


Figure 4 : Représentation de la structure quaternaire de la deoxyhémoglobine (13).

A, B, C, D, E, F, G, H structures hélicoïdales  
 AB, CD, EF, FG, GH segments interhélicoïdaux.

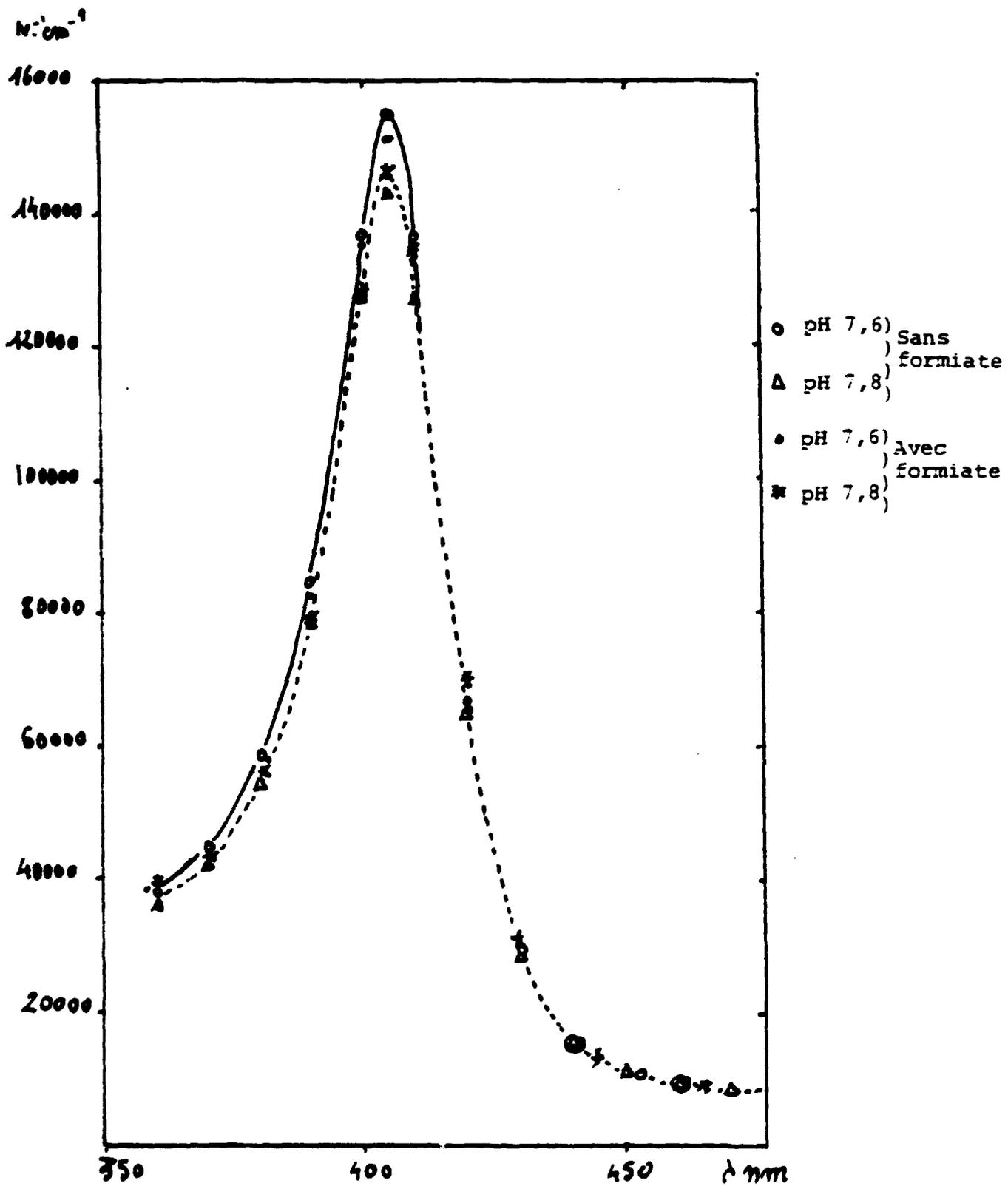


Figure 3 : Spectre de la méthémoglobine.

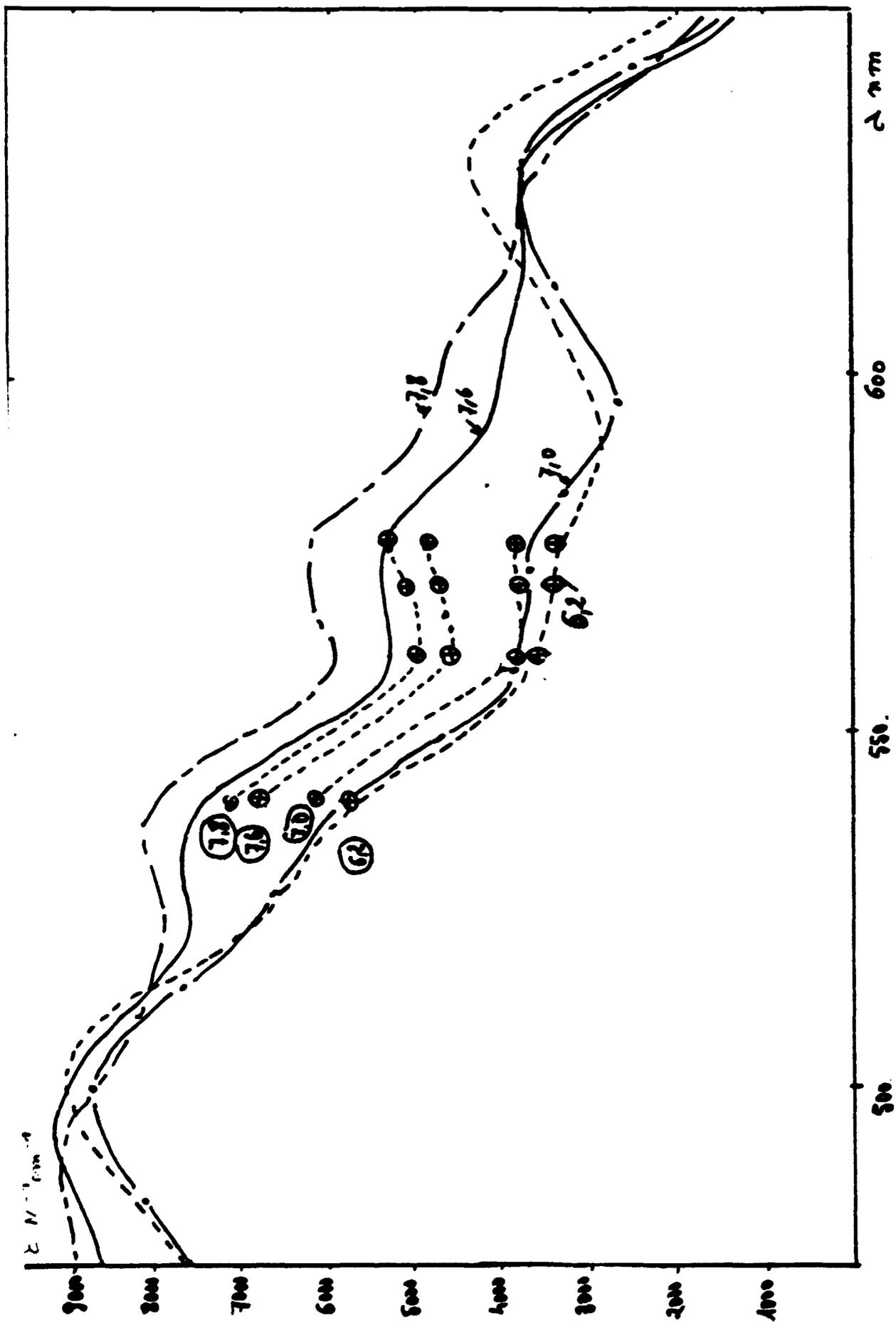


Figure 6 : Variation en fonction du pH du spectre de la méthémoglobine humaine en absence de formiate [P...q] d'après Van Assendelft (14) |

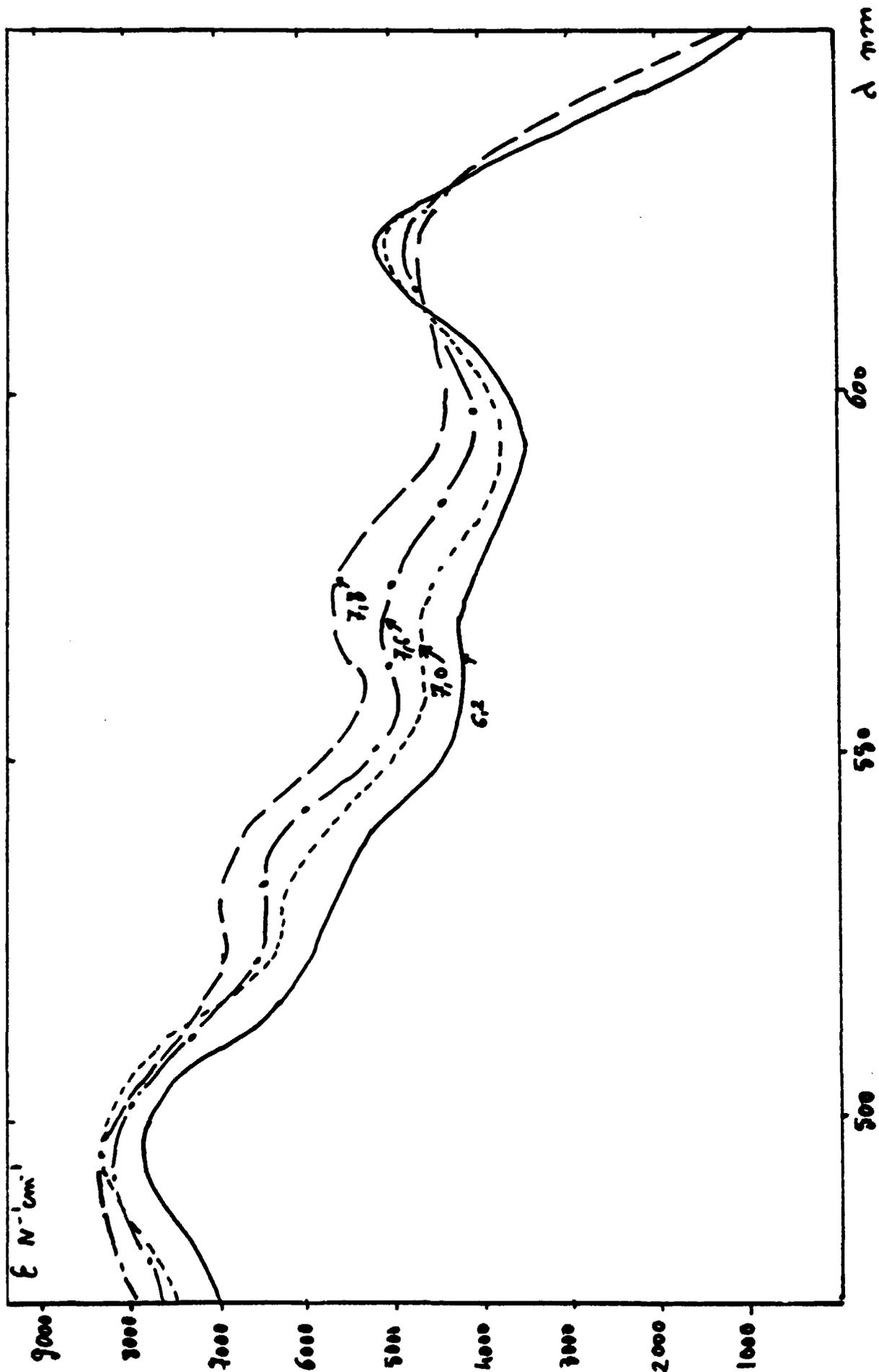
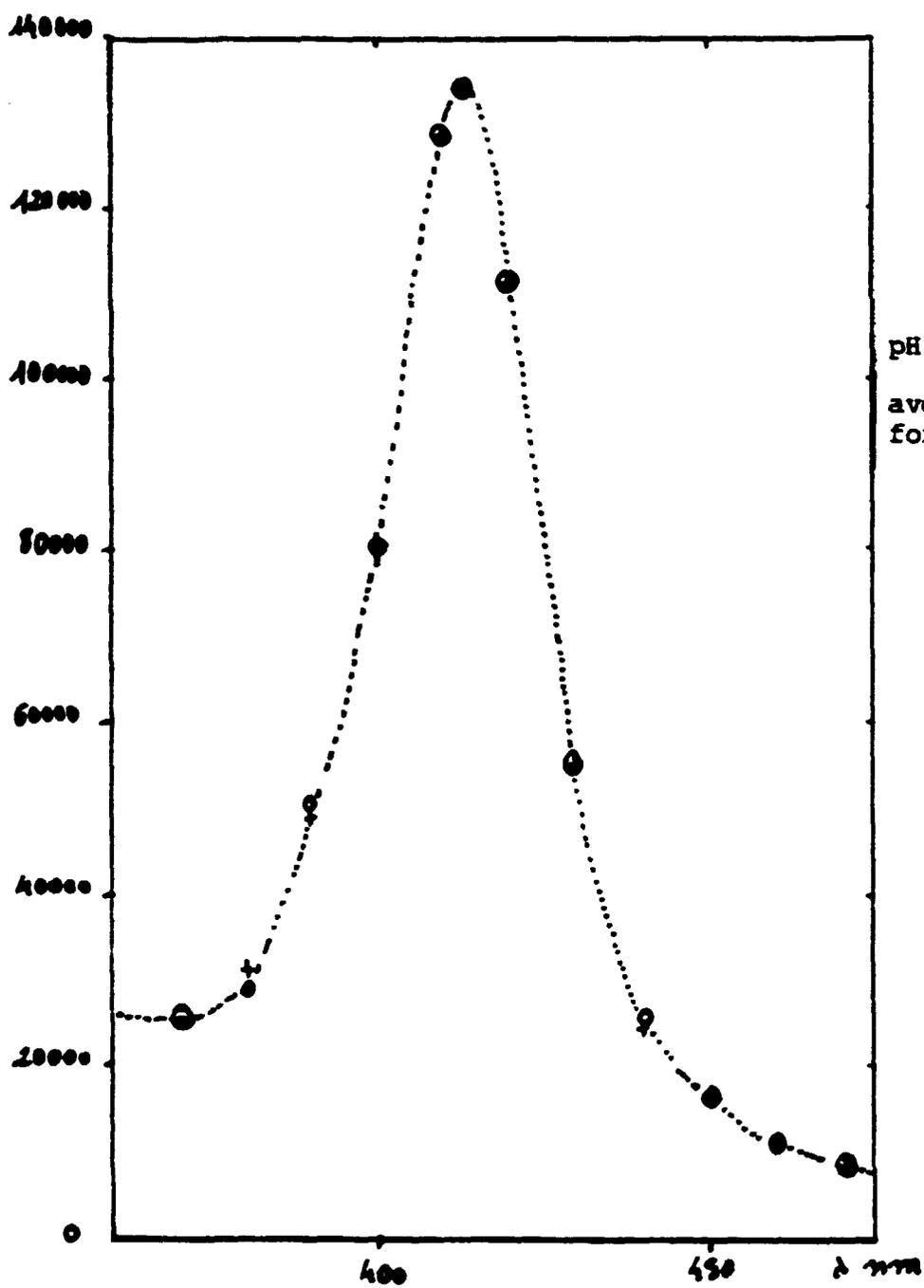


Figure 7 : Variation du spectre de la méthémoglobine humaine en fonction du pH en présence de formiate (0,16 M).

$E \text{ N}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



pH : 7,6, pH : 7,8  
avec ou sans  
formiate.

Figure 3 : Spectre de l'oxyhémoglobine.

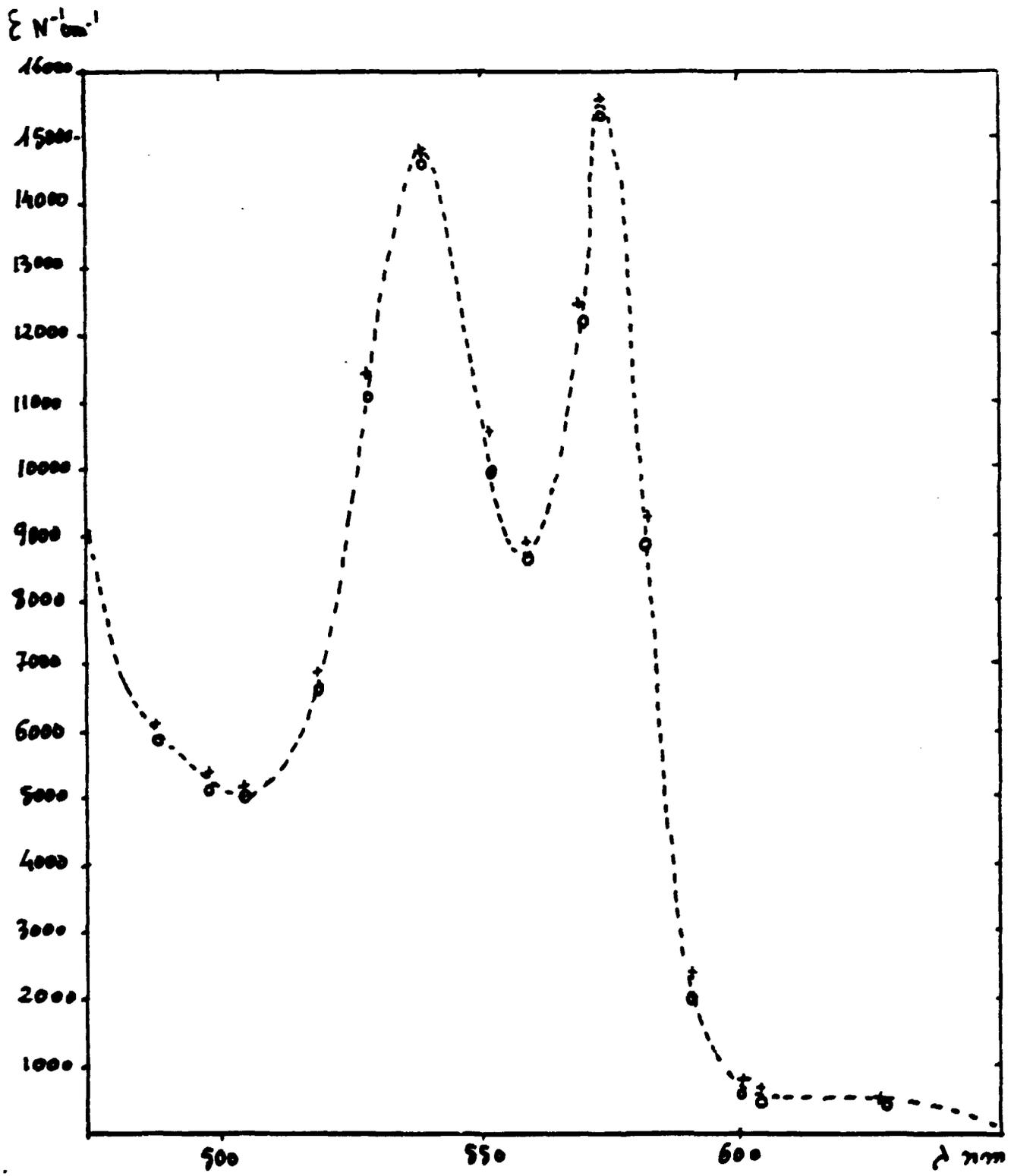
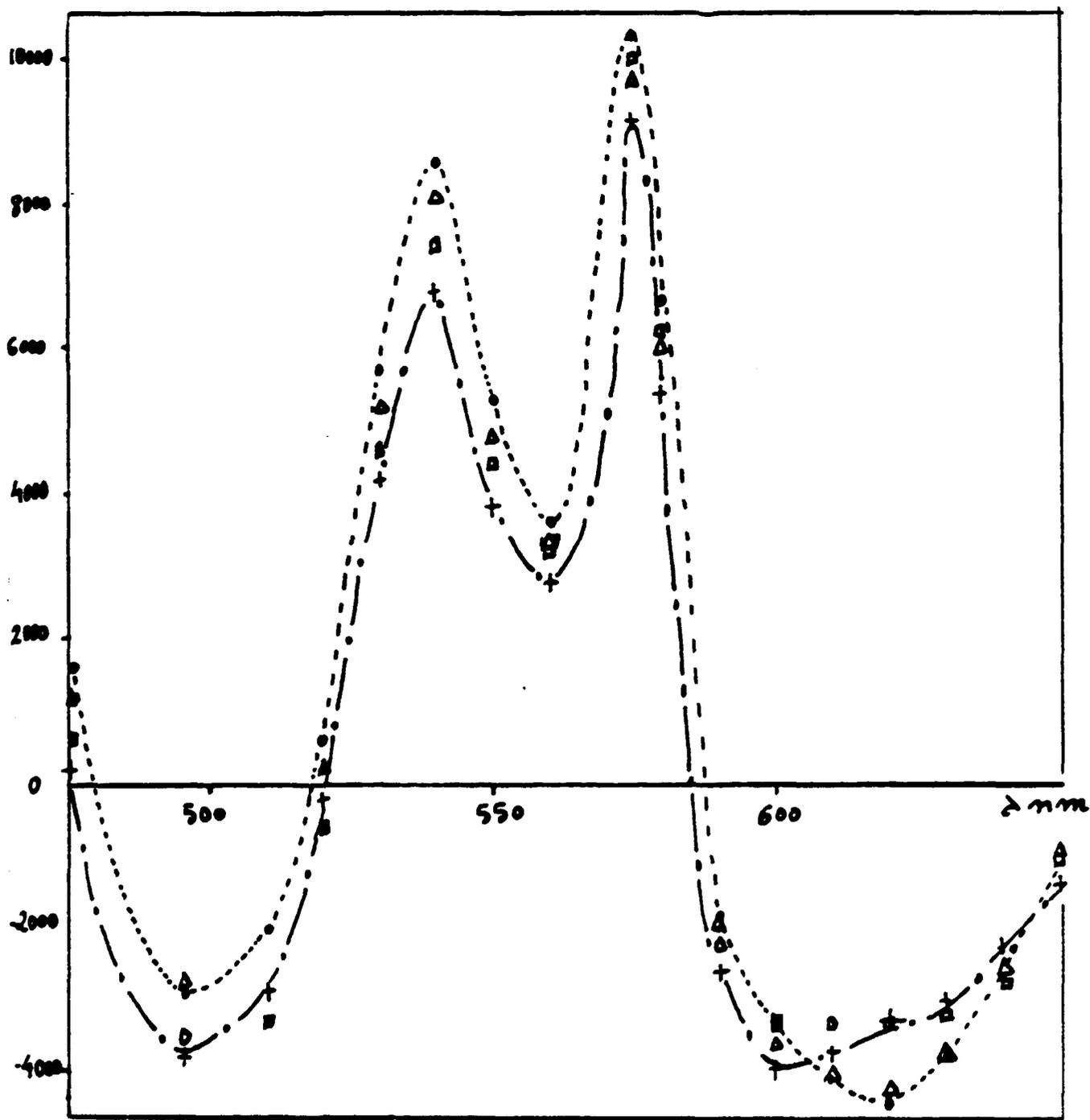


Figure 9 : Spectre de l'ox<sub>2</sub> hémoglobine.  
 (pH : 7,6, pH : 7,8, avec ou sans formiate).

$\Delta \epsilon \text{ N}^{-1} \text{cm}^{-1}$



• pH = 7,6 )  
 △ pH = 7,8 ) avec formiate  
 ○ pH = 7,6 )  
 + pH = 7,8 sans formiate

Figure 10 : Variation en fonction du pH de  $\Delta \epsilon (\text{HbFe}^{\text{II}}\text{O}_2 - \text{HbFe}^{\text{III}})$

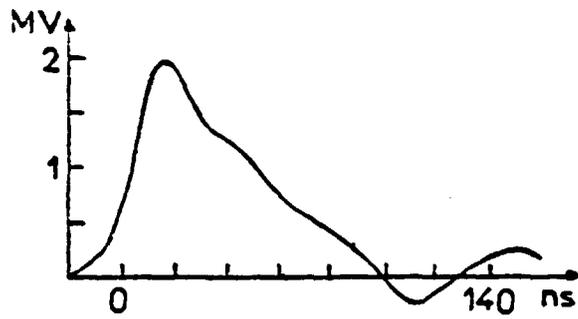


Figure 11 : Forme de l'impulsion d'électrons à la sortie du Febetron 707. (35)

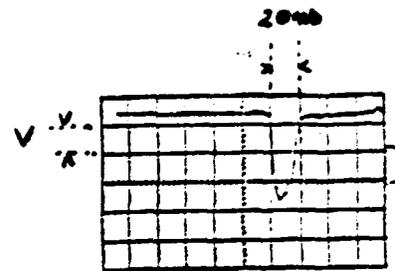


Figure 12 : Forme de l'impulsion d'électrons après passage par le champ magnétique défecteur. (36)

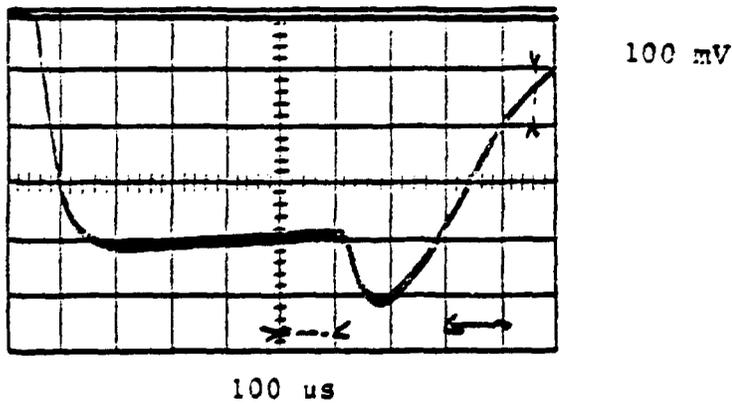


Figure 13 : Forme de la surtension de l'arc au xénon. (37)

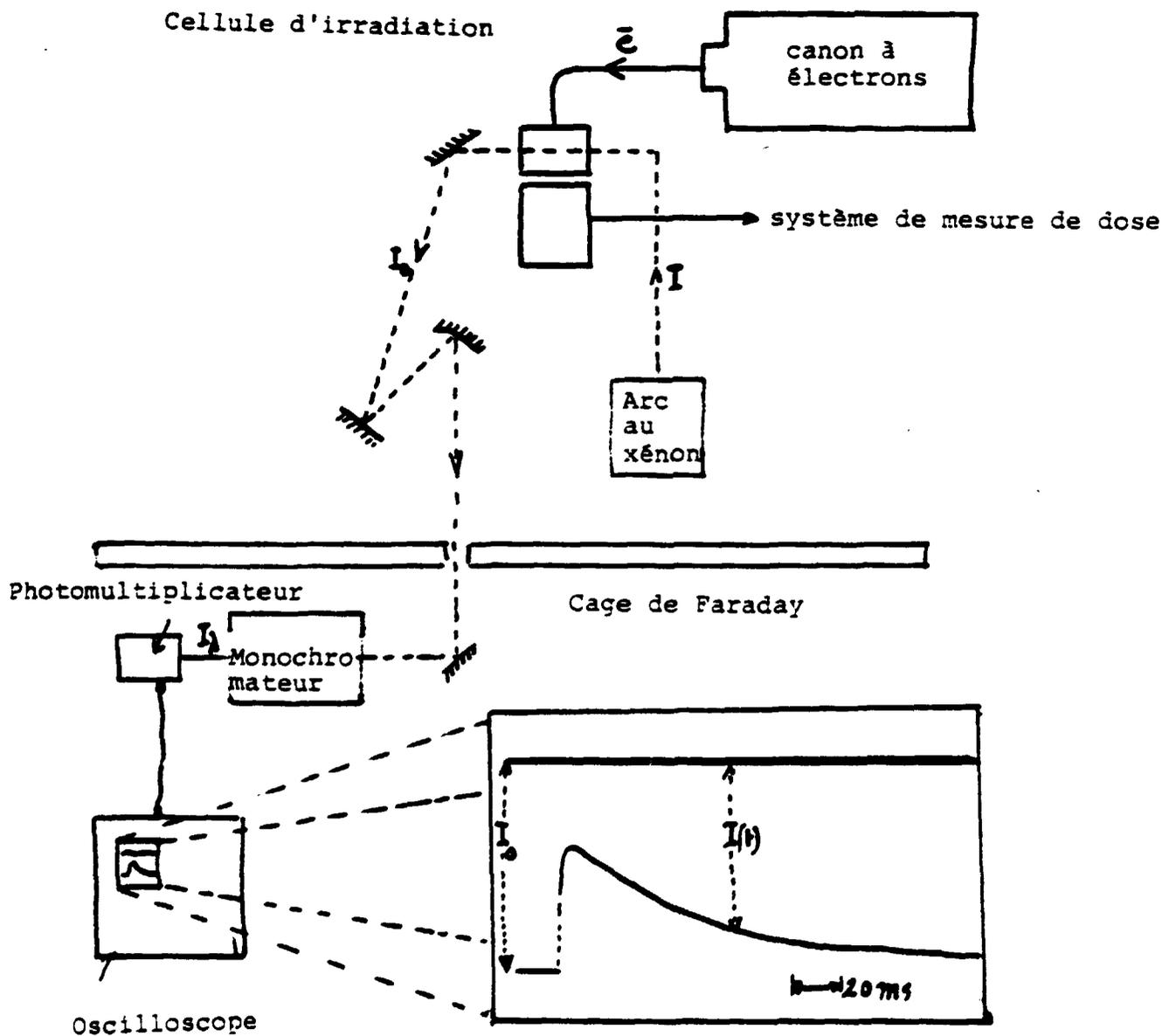
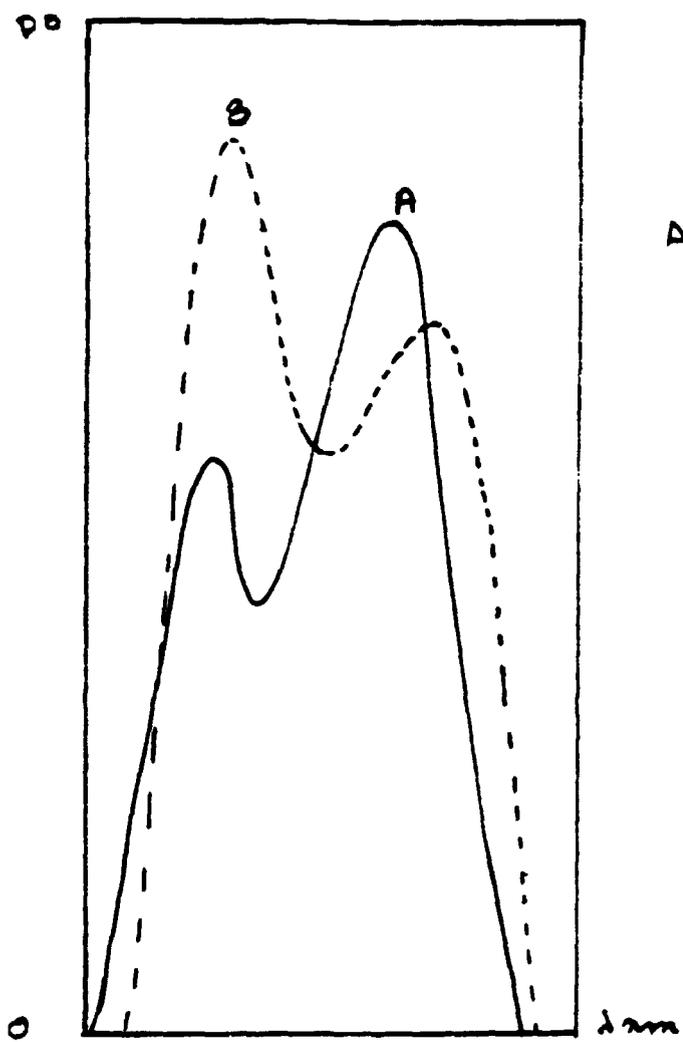
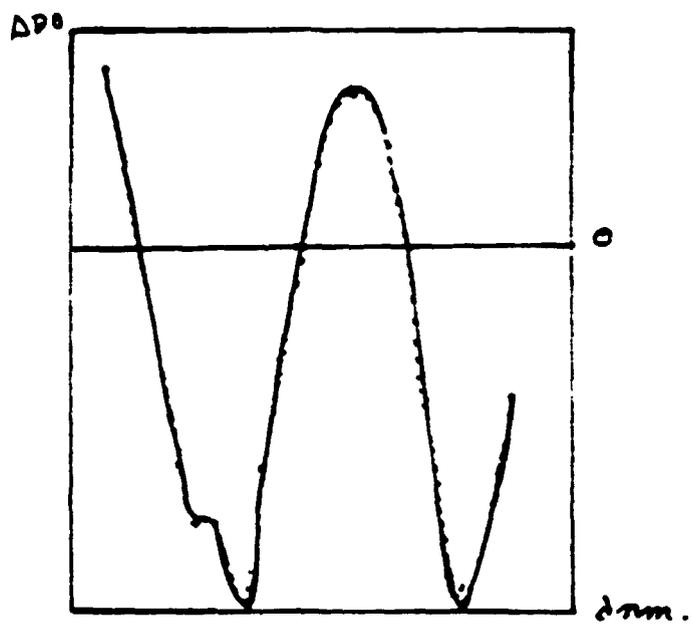


Figure 14 : Schéma d'implantation du dispositif d'analyse.



Spectre de A et de B.



Spectre différentiel de A par rapport à B.

Figure 15.

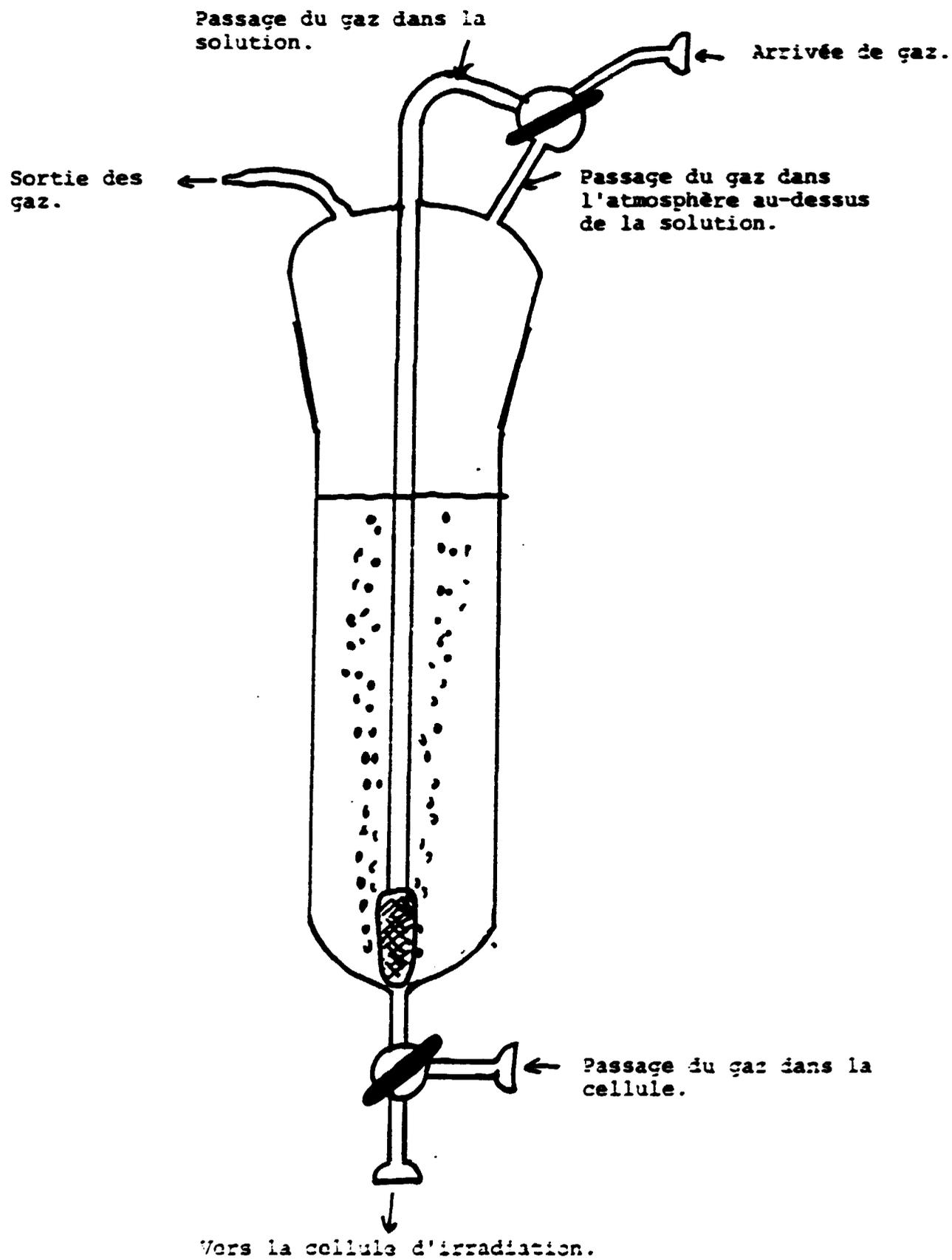
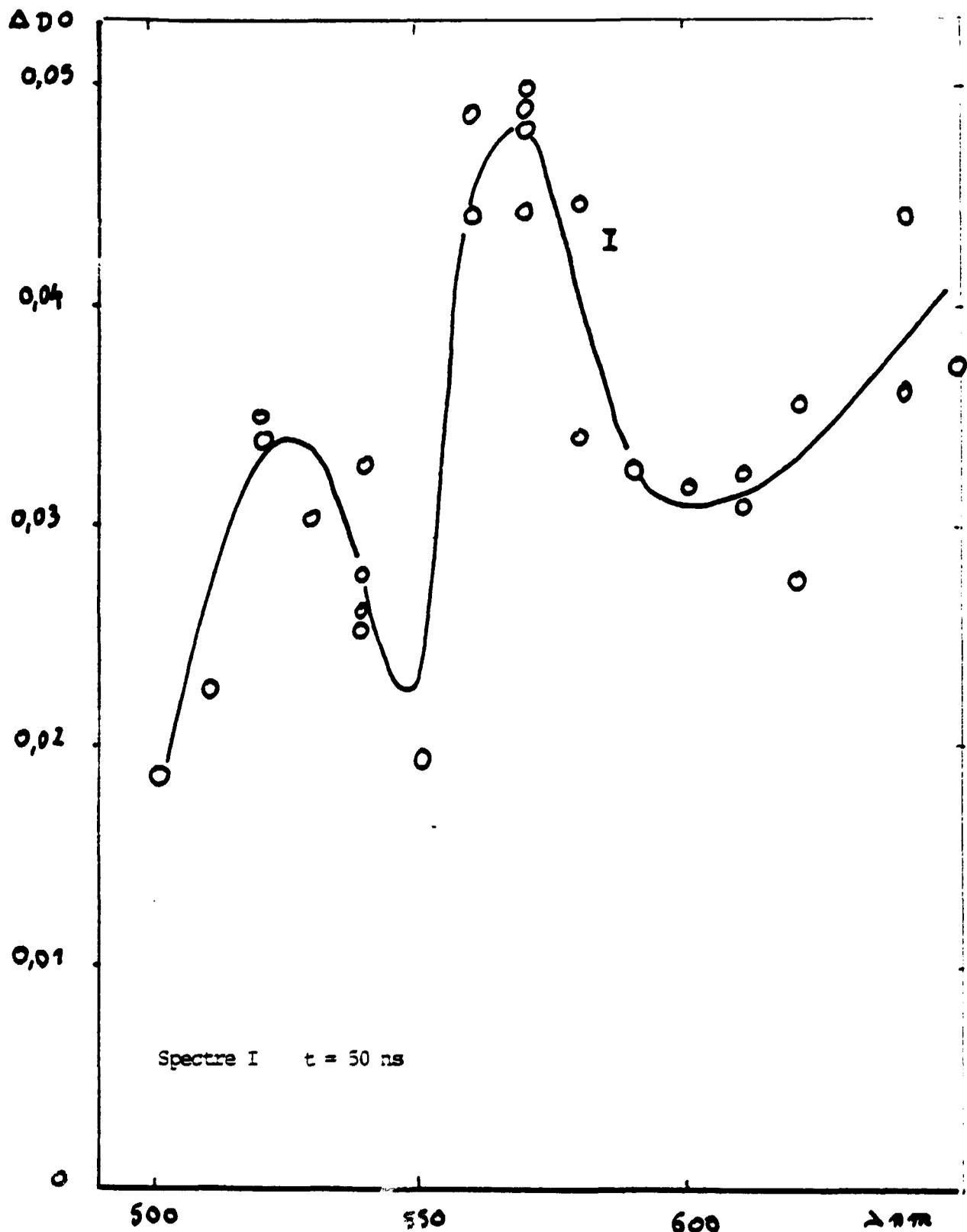
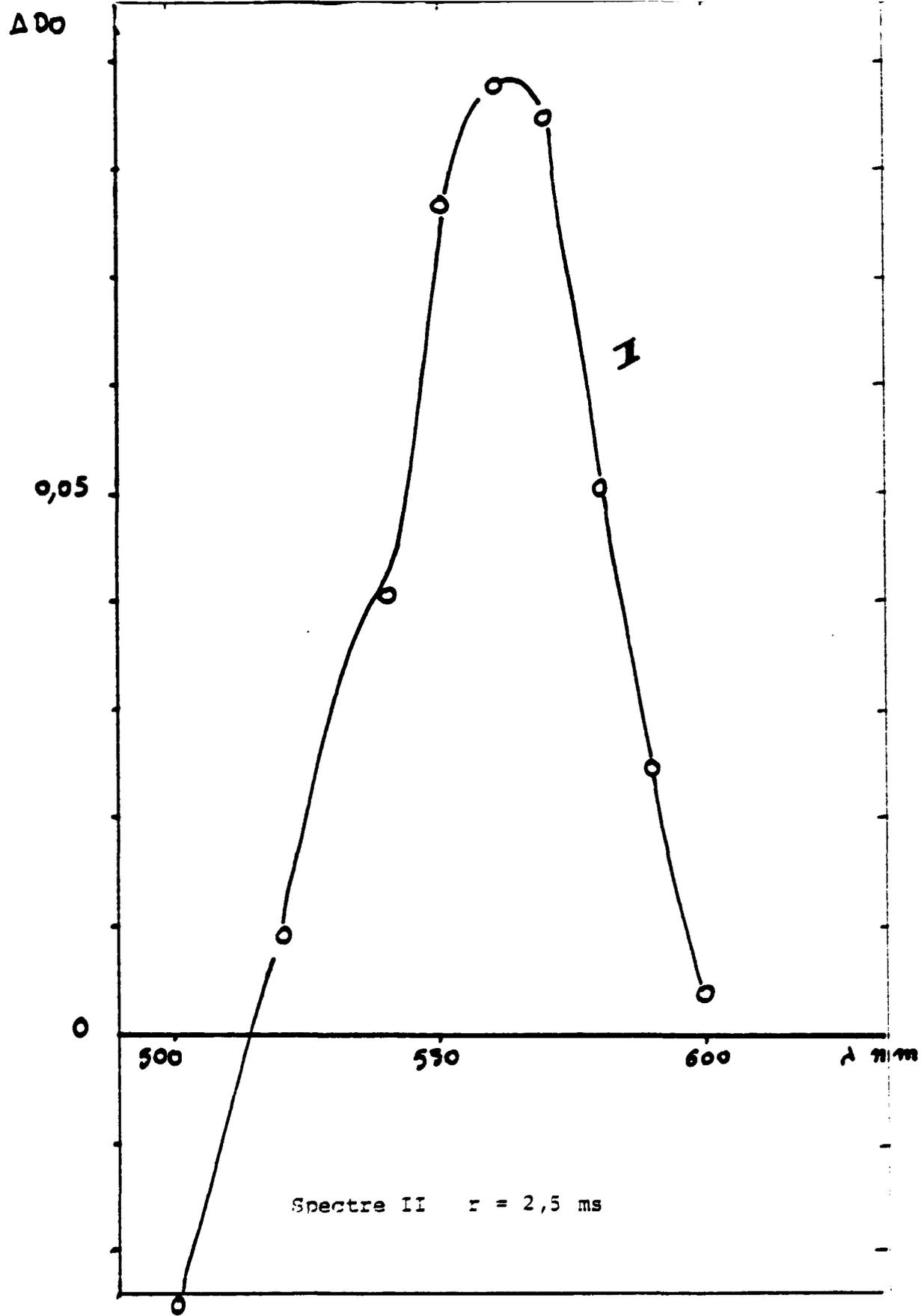


Figure 16 : Dispositif de gazaçe des solutions.



$(\text{HbFe}^{\text{III}}) = 4.00 \times 10^{-5} \text{ N}$      $\text{pH} = 7,8$      $\text{Dose} = 30 \text{ K rad}$      $(\text{N}_2\text{O}) = 10^{-2} \text{ M}$   
 $\text{Formiate} = 0,16 \text{ M}$

Figure 17 : Spectra à 50 ns correspondant à  
 l'irradiation de méthémoglobine  
 en présence de  $\text{N}_2\text{O}$ .



$(\text{HbFe}^{\text{III}}) = 5,3 \times 10^{-5} \text{N}$ ,  $\text{N}_2\text{O} = 10^{-2} \text{M}$ ,  $\text{pH} = 7,8$  Dose = 25 K rad  
 FORMIATE = 0,16 M

Figure 18 : Spectre à 2,5 ms après l'impulsion d'électrons.  
 (Méthémoglobine en présence de  $\text{N}_2\text{O}$ ).

$k (s^{-1})$

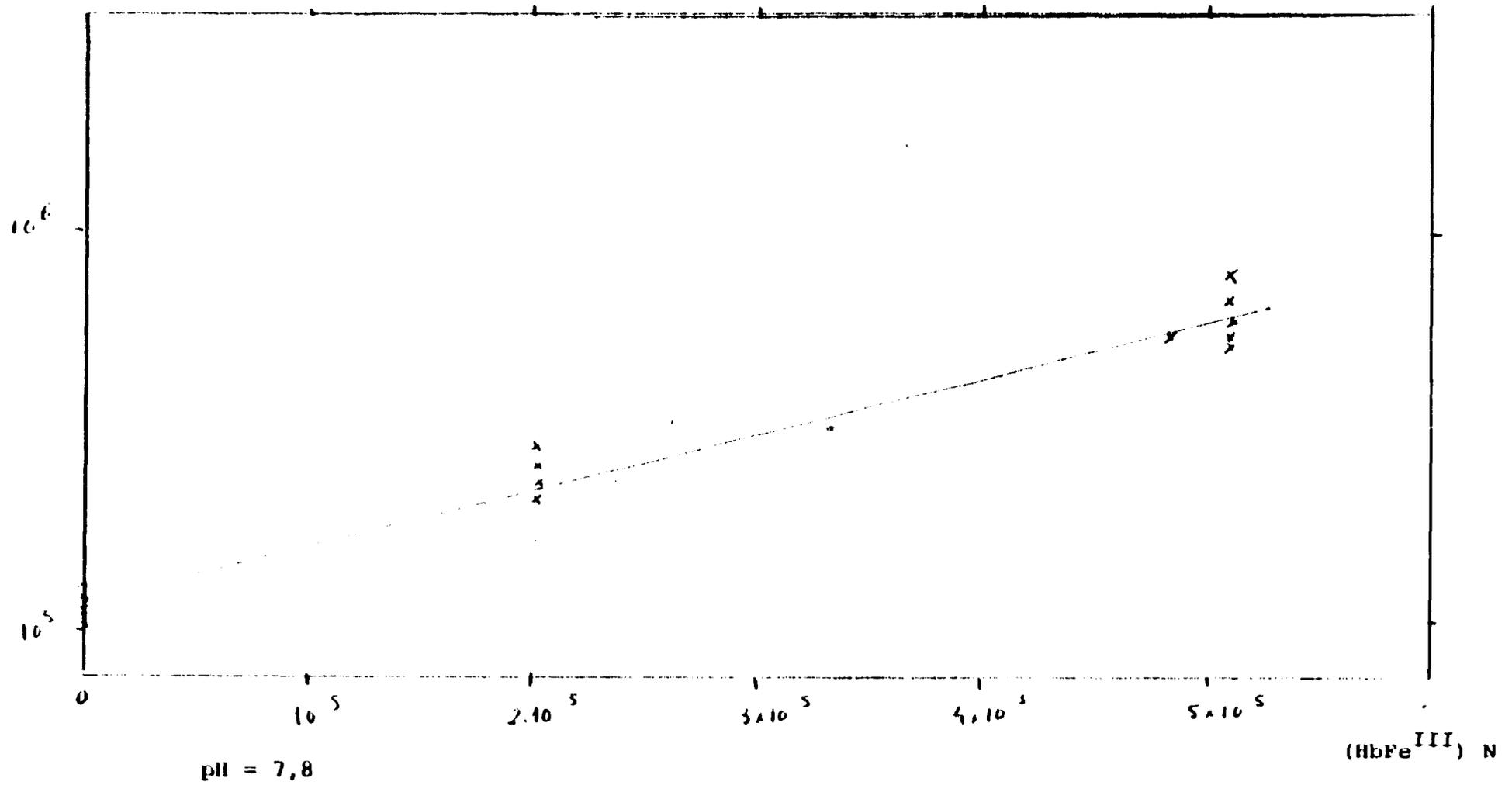


Figure 19 : Variation de la constante de vitesse du pseudopremier ordre

en fonction de la concentration en HbFe<sup>III</sup>.

$\Delta DO$

0,4

0,3

0,2

0,1

0

550

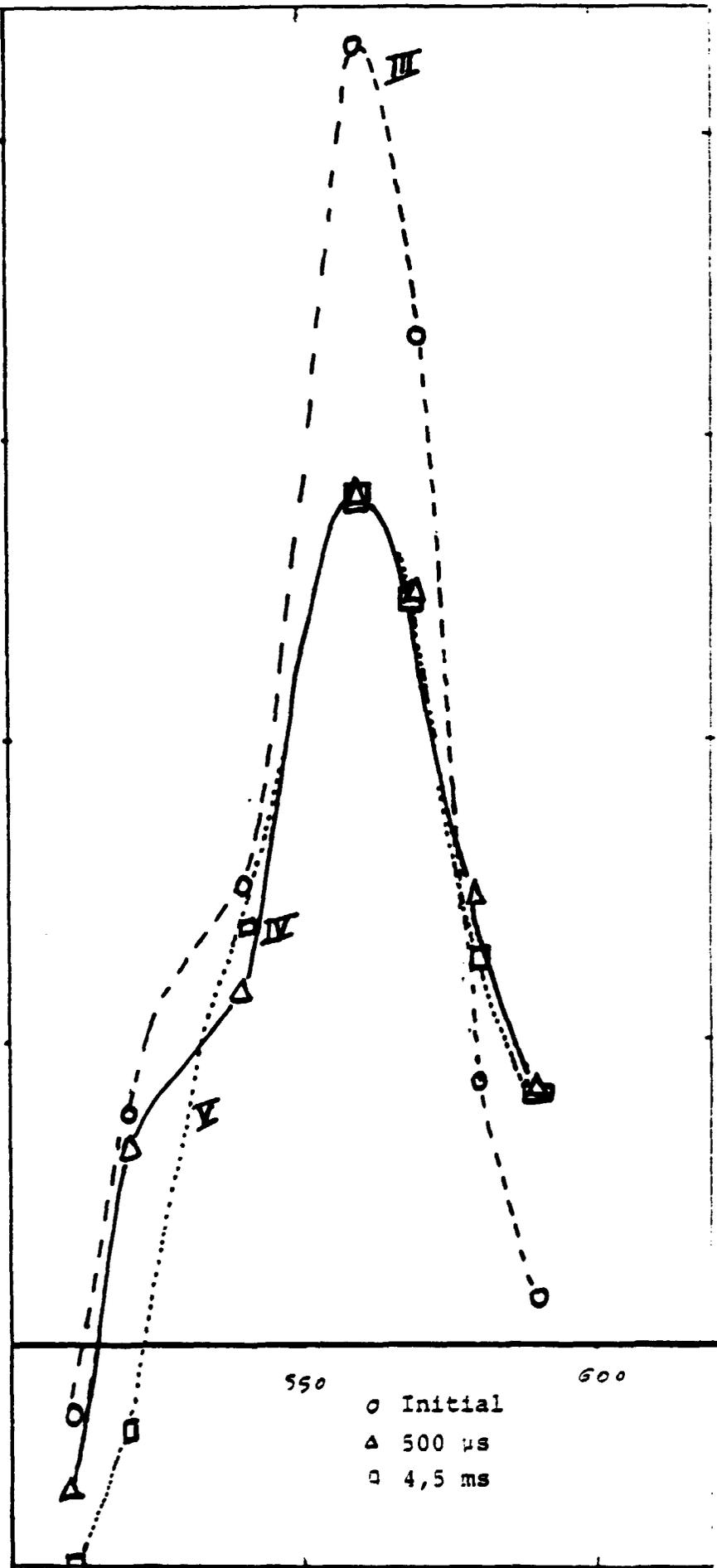
600

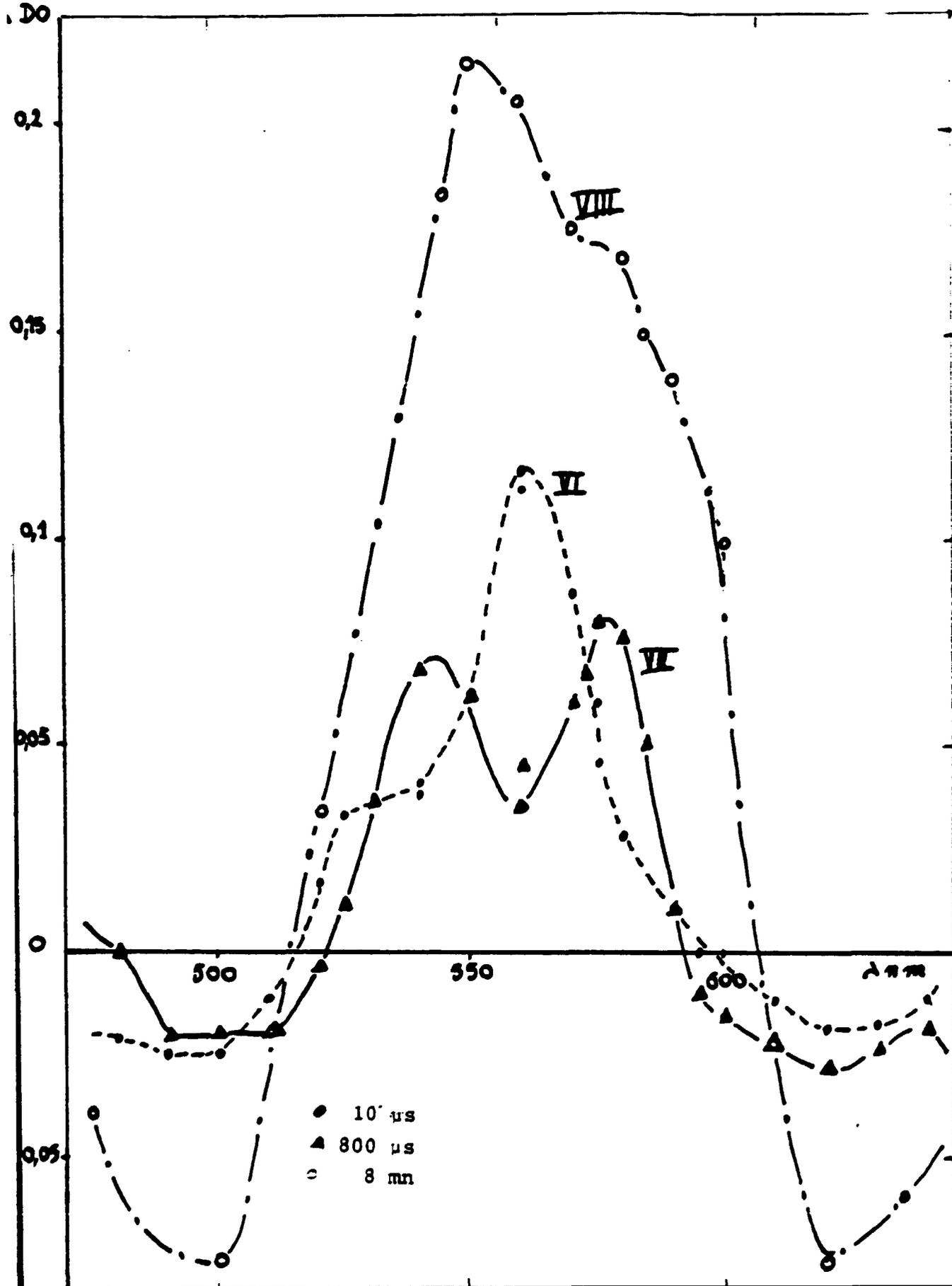
$\lambda$  nm

○ Initial  
△ 500  $\mu$ s  
□ 4,5 ms

$(HbFe^{III}) = 4,7 \times 10^{-5} N$ , pH = 7,82, FORMIATE = 0,16 M

Figure 20 : Evolution en fonction du temps d'une irradiation en milieu sans  $N_2O$  ni  $O_2$ .





HbFe<sup>III</sup>) =  $3,3 \times 10^{-5}$  N, pH = 7,76, FORMIATE = 0,16 M, Dose = 25 Krad,  
 $2 = 2,8 \times 10^{-4}$  M.

Figure 21 : Irradiation d'une solution de méthémoglobine en présence d'oxygène. Evolution en fonction du temps.

$\Delta DO$   
 $UA$

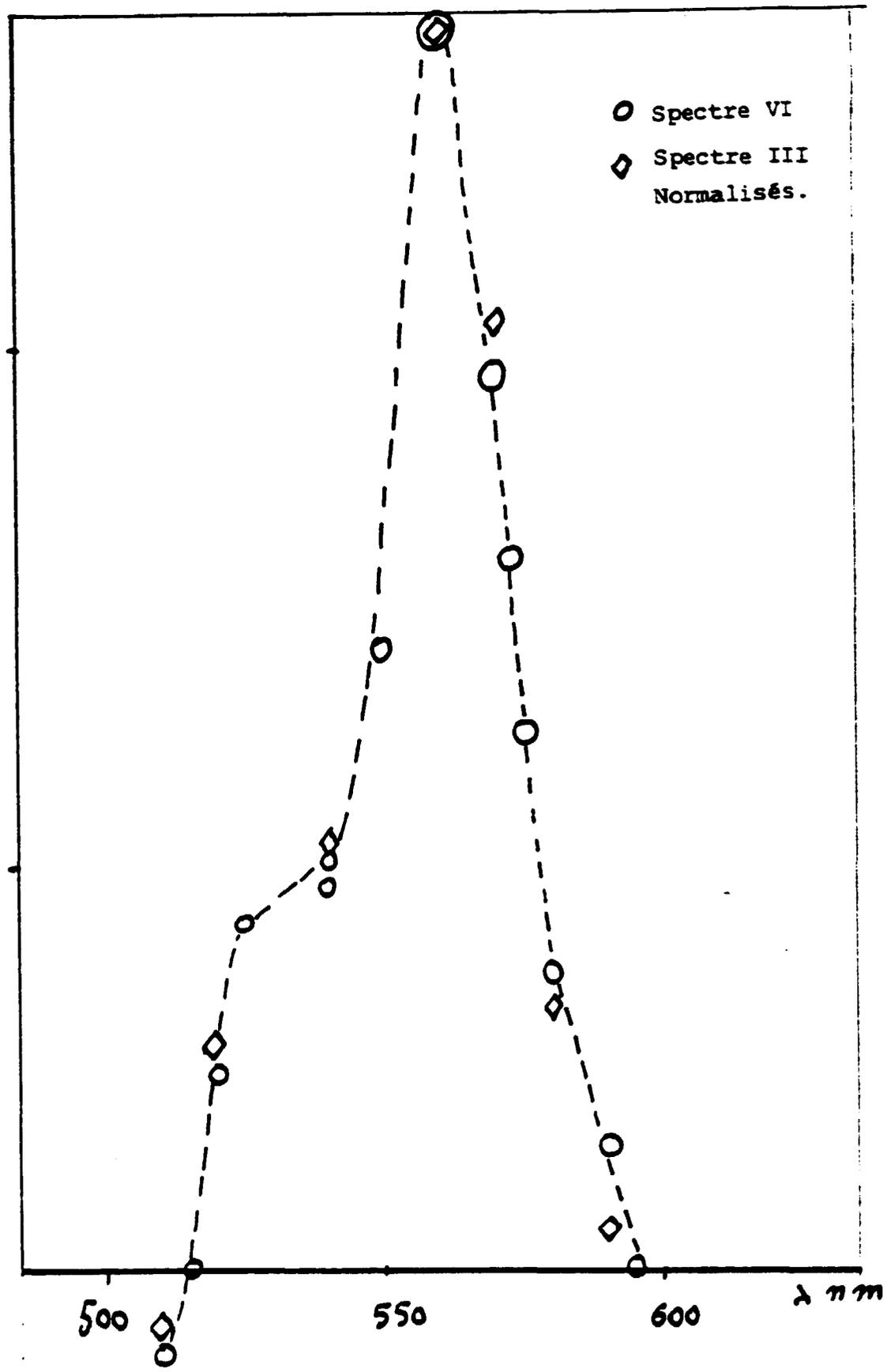
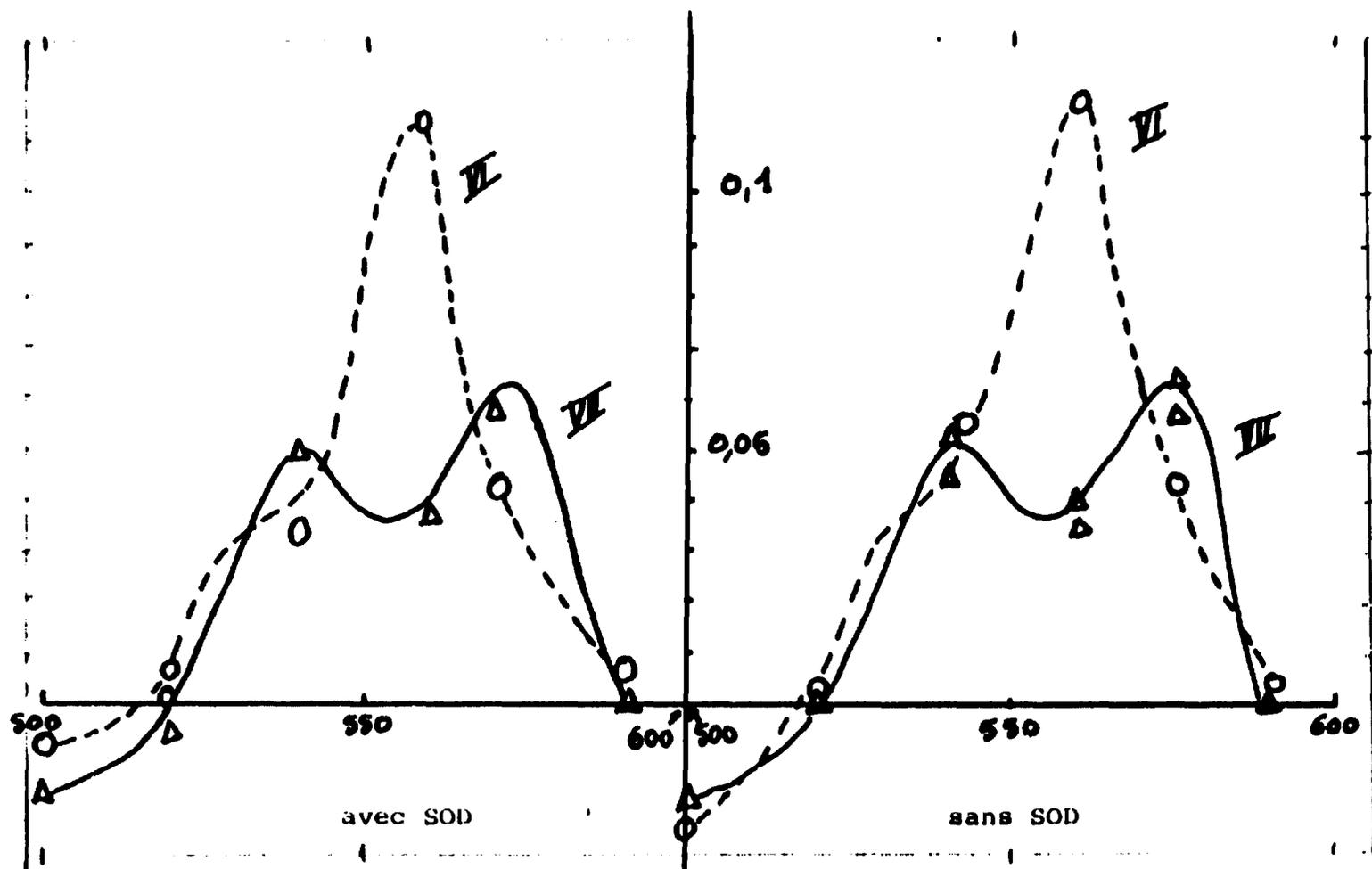
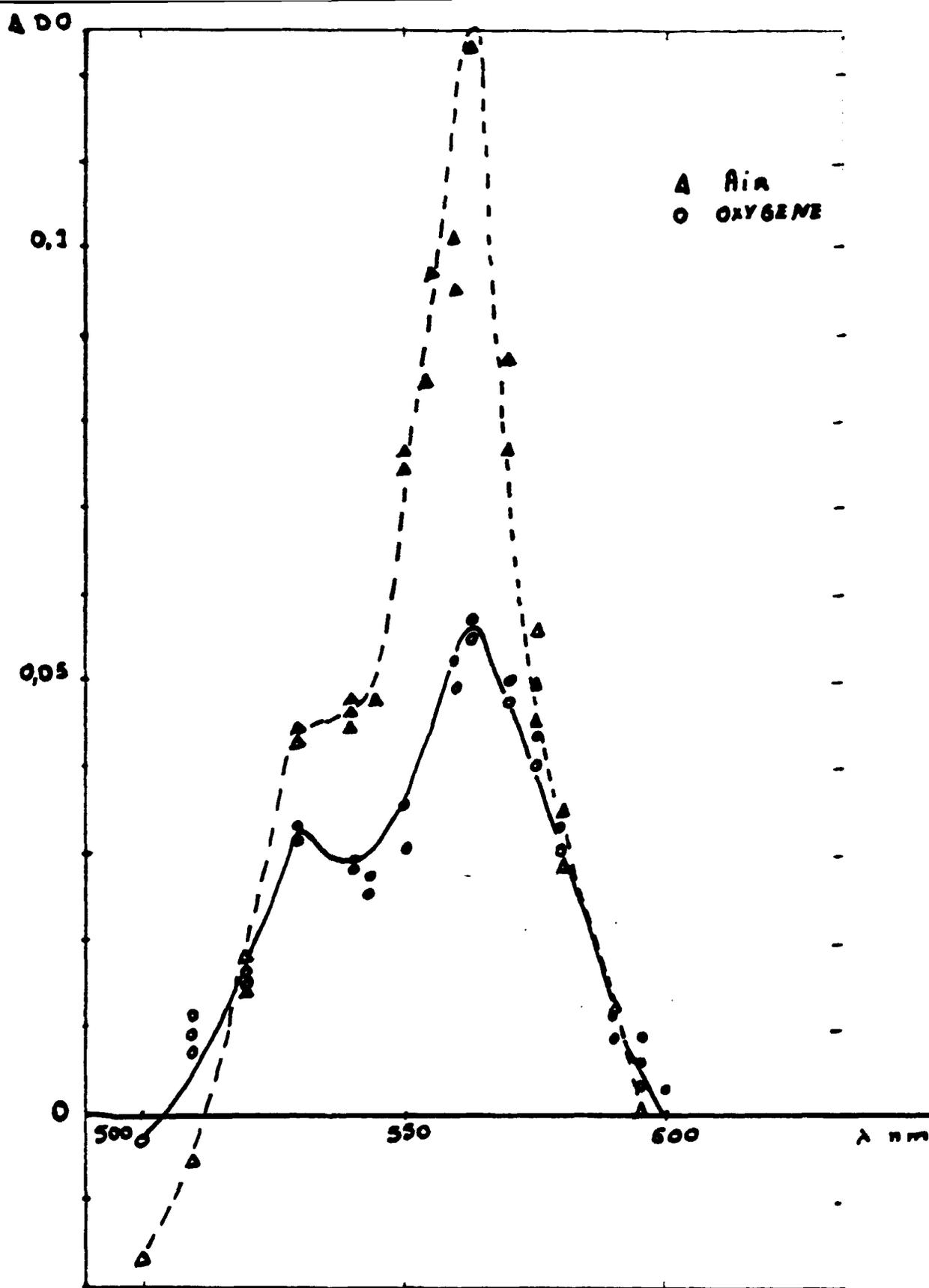


Figure 22 : Spectres VI et III normalisés.



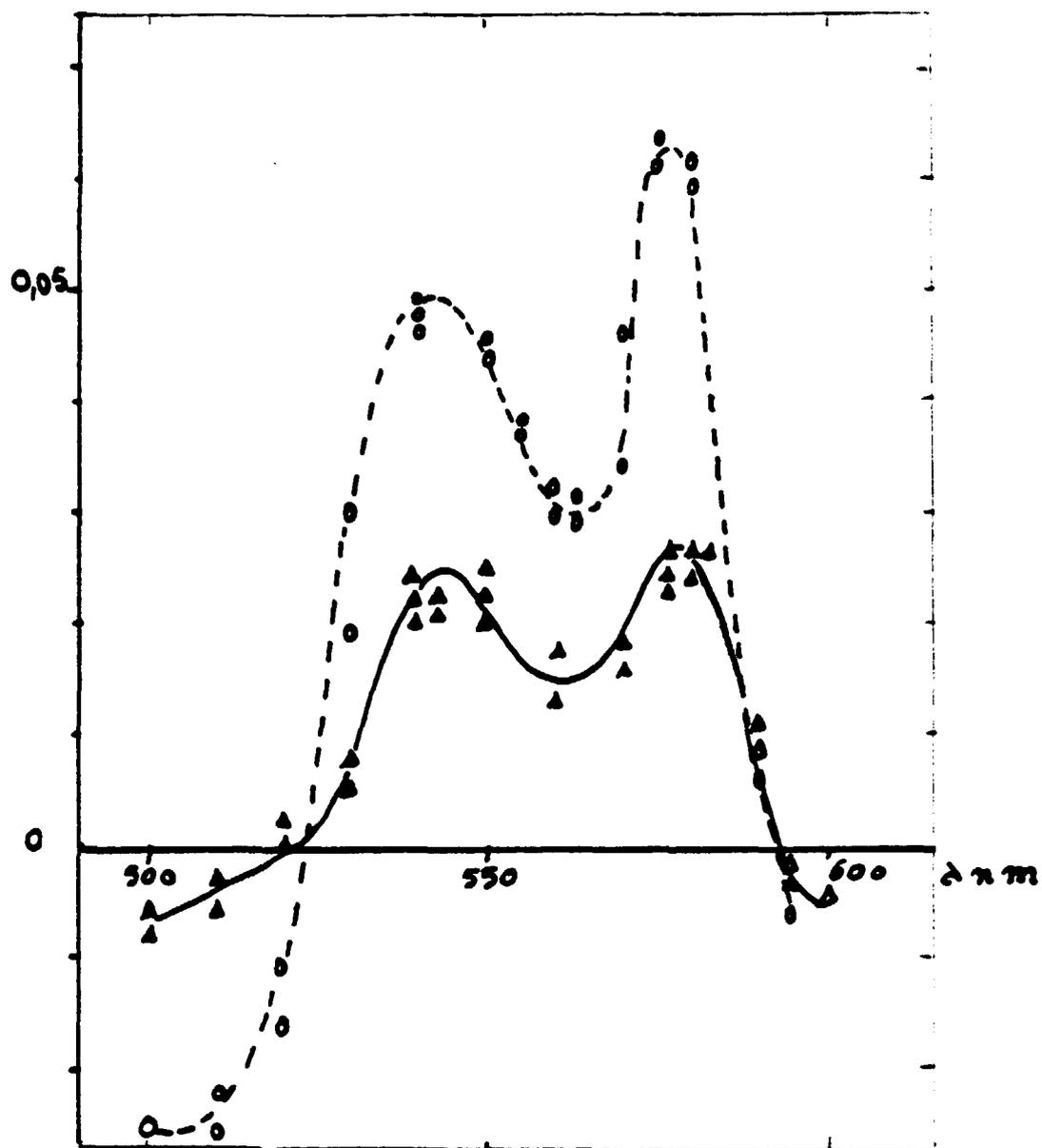
$(\text{HbFe}^{\text{III}}) = 4,1 \times 10^{-5} \text{N}$ ,  $\text{pH} = 7,7$ ,  $\text{O}_2 = 2,8 \times 10^{-4} \text{M}$ ,  $\text{SOD} = 2 \times 10^{-8} \text{M}$ , Dose = 25 Krad.

Figure 23 : Influence de la SOD sur les spectres VI et VII.



$(\text{HbFe}^{\text{III}}) = 4,7 \times 10^{-5} \text{N}$ ,  $\text{pH} = 7,8$ ,  $(\text{FORMIATE}) = 0,16 \text{M}$ , Dose = 25 Krad.  
 $\Delta (\text{O}_2) = 2,8 \times 10^{-4} \text{M}$ ,  $\circ (\text{O}_2) = 1,35 \times 10^{-3} \text{M}$ .

Figure 24 : Influence de la concentration en oxygène sur le spectre VI.



$(\text{HbFe}^{\text{III}}) = 4,7 \times 10^{-5} \text{ N}$ ,  $\text{pH} = 7,8$ ,  $\text{FORMIATE} = 0,16 \text{ M}$   
 Dose = 25 Krad.  
 $\text{O}(\text{O}_2) = 4,8 \times 10^{-4} \text{ M}$      $\Delta(\text{O}_2) = 1,35 \times 10^{-3} \text{ M}$

Figure 25 : Influence de la concentration en oxygène sur le spectre VII.

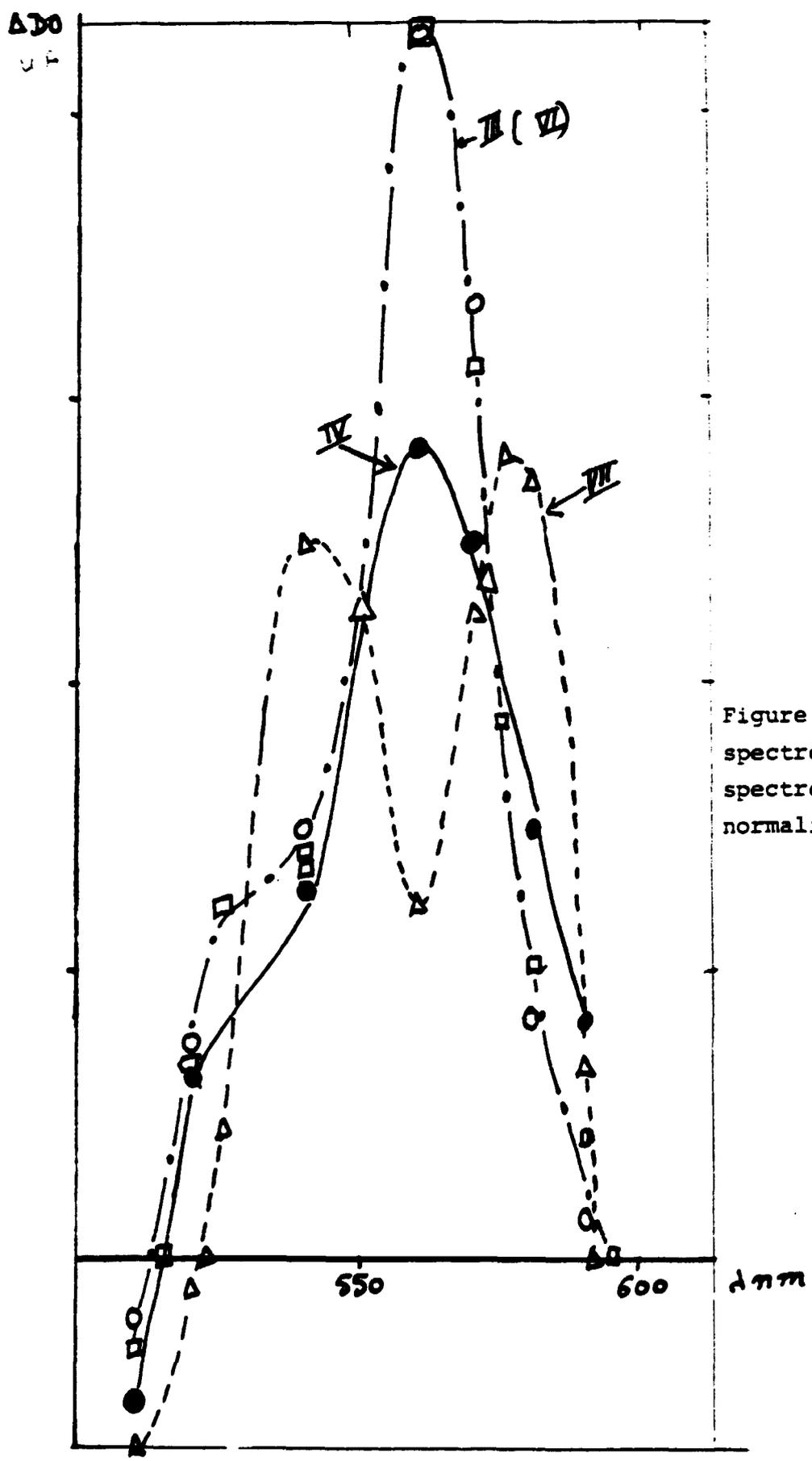
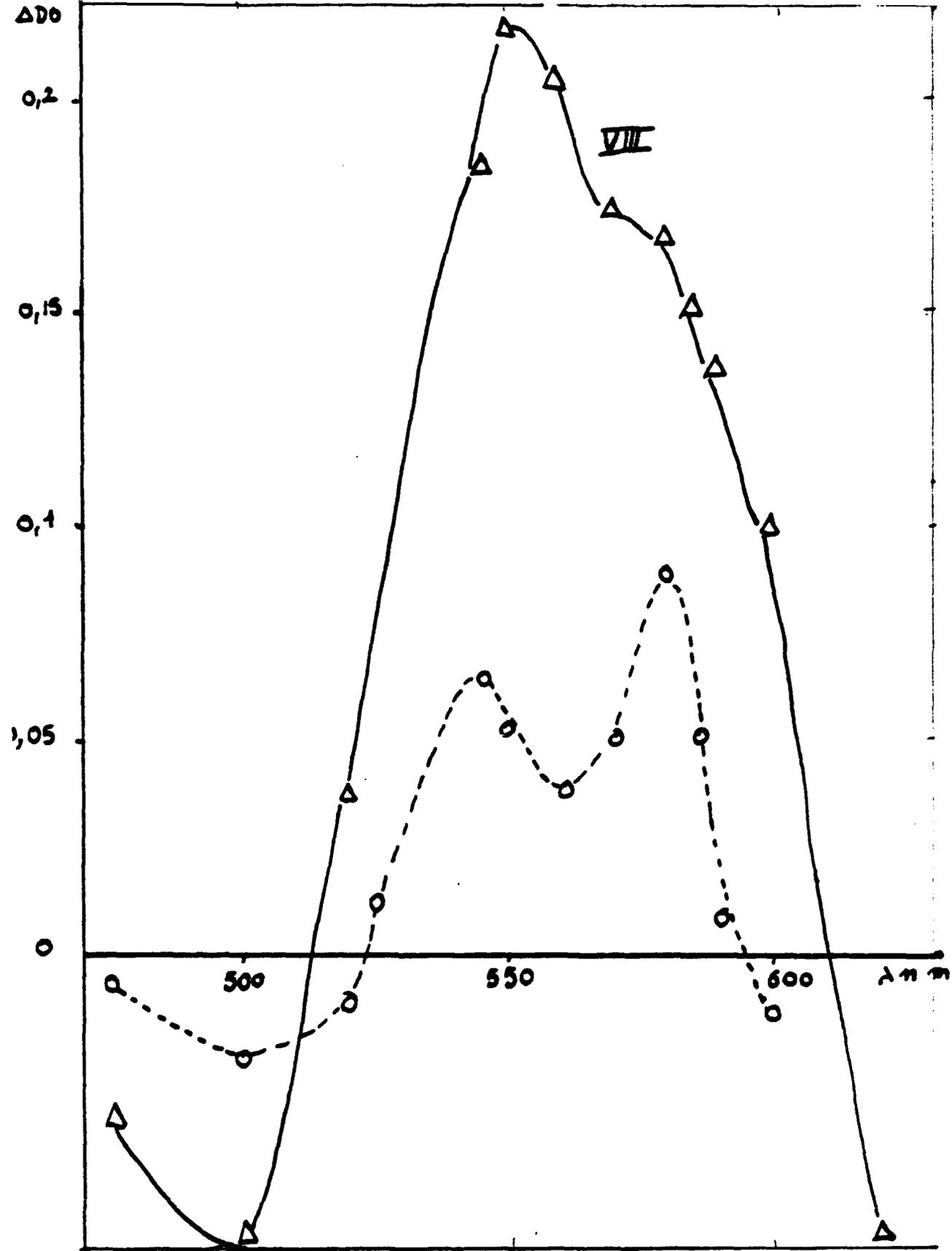
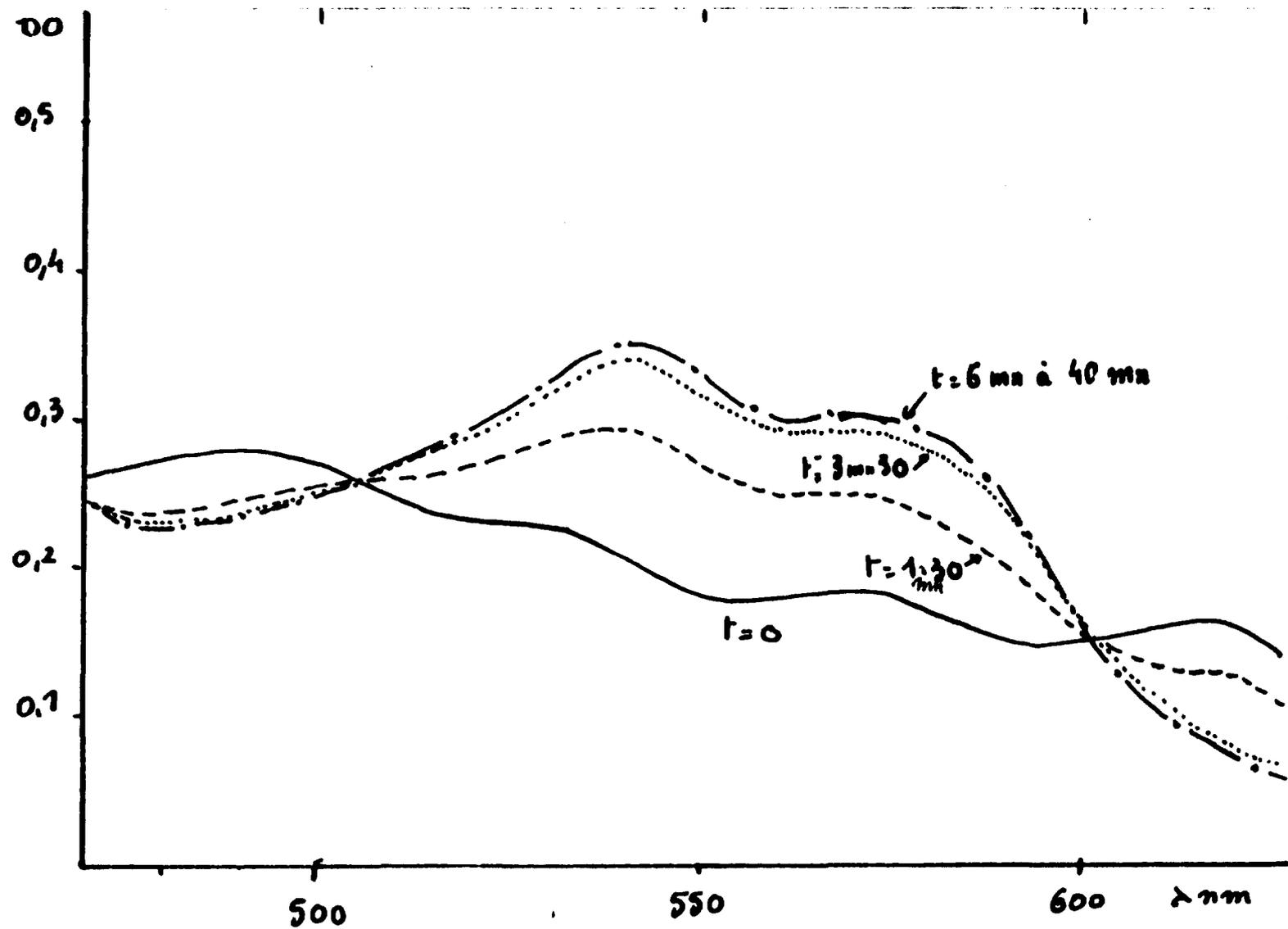


Figure 26 : Comparaison des spectres IV et VII, les spectres III et VI étant normalisés (figure 22).



$(\text{HbFe}^{\text{III}}) = 3,3 \times 10^{-5} \text{ N}$ ,  $\text{pH} = 7,76$ ,  $\text{FORMIATE} = 0,16 \text{ M}$ ,  $\text{Dose} = 25 \text{ Krad}$   
 $(\text{O}_2) = 2,8 \times 10^{-4} \text{ M}$      $\Delta$  sans catalase     $\circ$  catalase =  $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ .

Figure 27 : Influence de la présence de la catalase sur l'apparition du spectre VIII.



$(\text{HbFe}^{\text{III}}) = 3,2 \times 10^{-5} \text{N}$ ,  $\text{pH} = 7,8$ ,  $\text{FORMIATE} = 0,16 \text{ M}$ ,  $(\text{H}_2\text{O}_2) = 1,2 \times 10^{-3} \text{ M}$

Figure 28 : Action de l'eau oxygénée sur une solution de méthémoglobine.

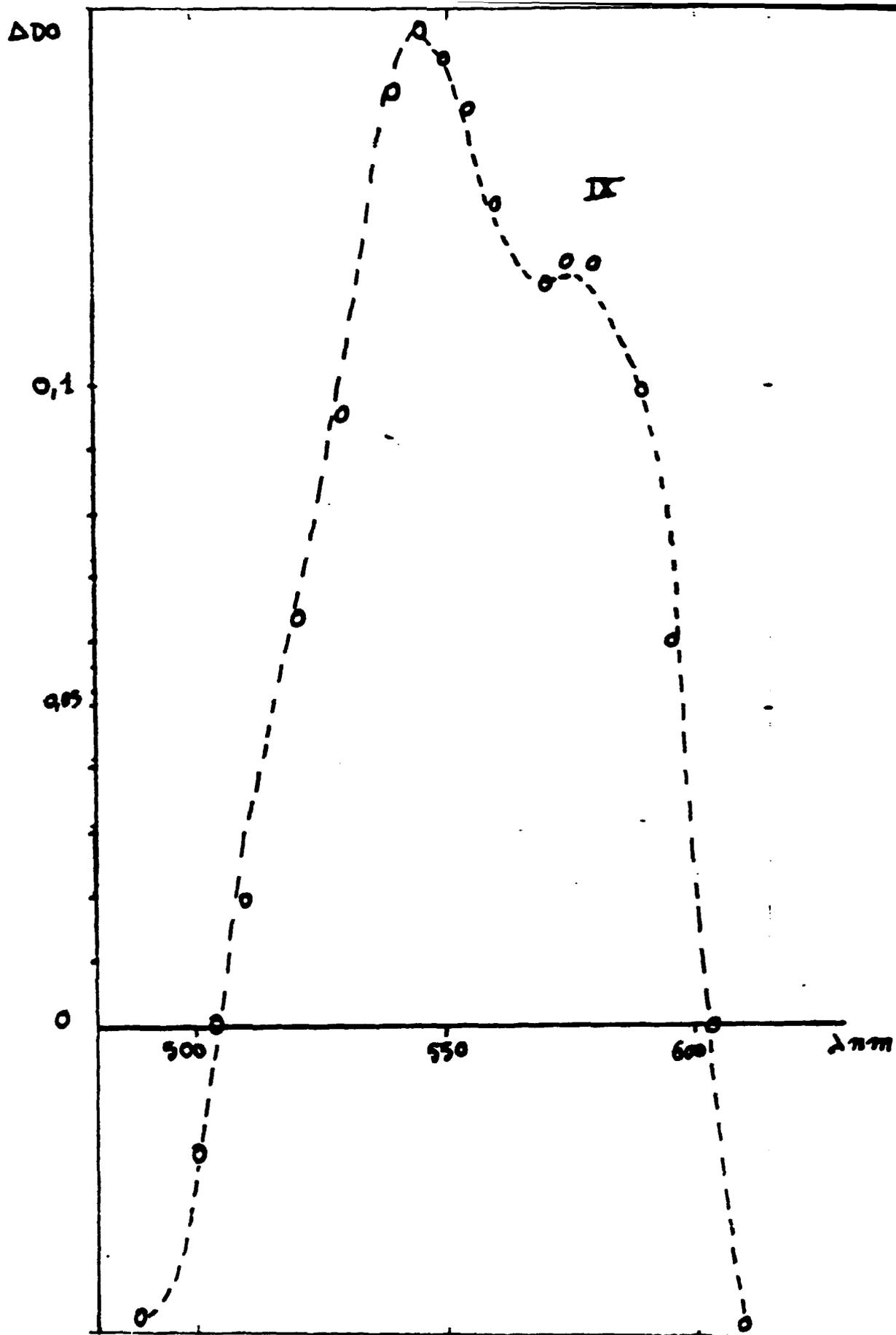
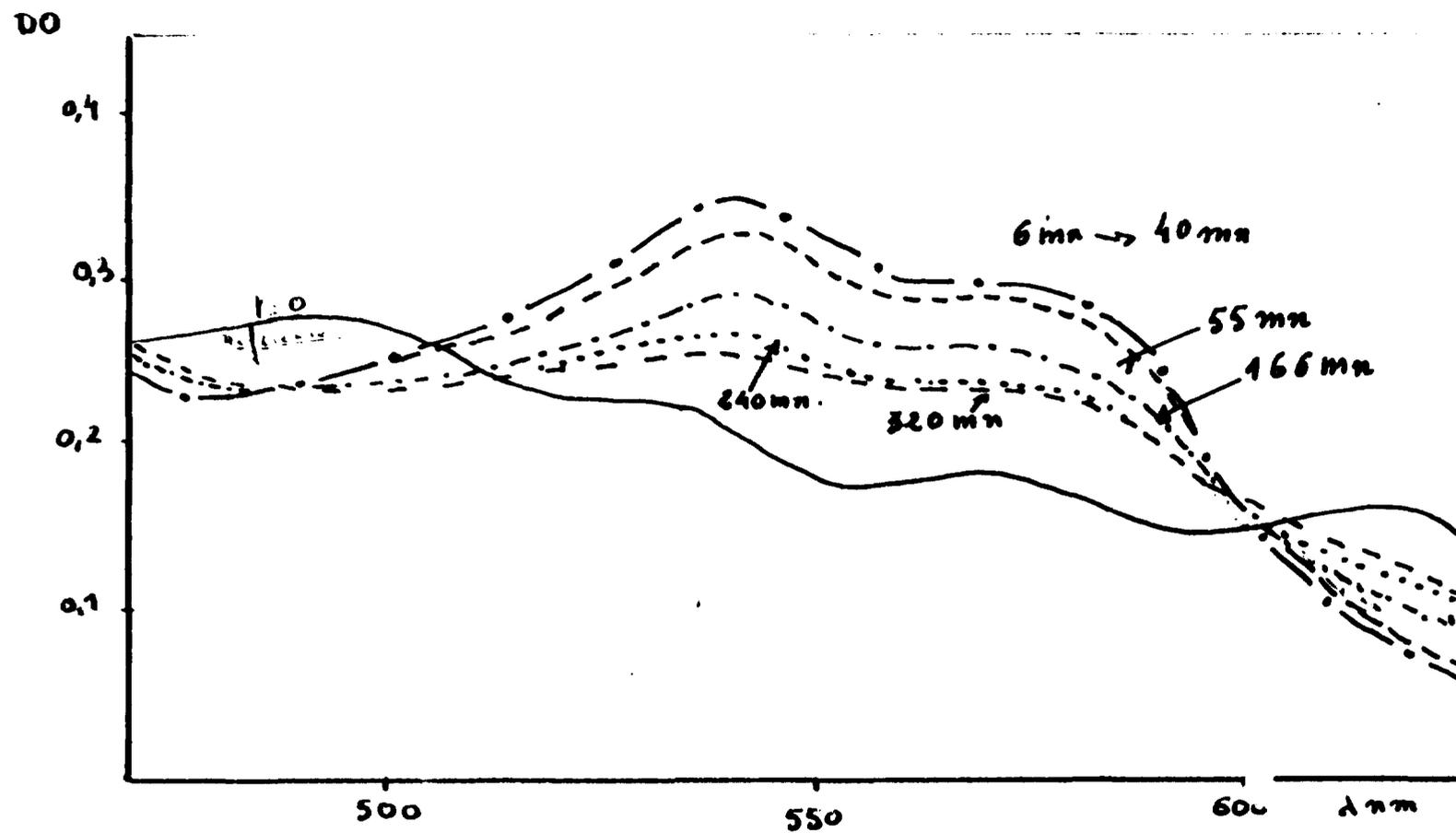


Figure 29 : Spectre correspondant au palier (6 mn - 40 mn) dans l'action de l'eau oxygénée sur la méthémoglobine (fig. 23).



$(\text{HbFe}^{\text{III}}) = 3,2 \times 10^{-5} \text{ N}$ ,  $\text{pH} = 7,8$ ,  $(\text{O}_2) = 2,8 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $\text{FORMIATE} = 0,16 \text{ M}$ ,  $(\text{H}_2\text{O}_2) = 1,2 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

Figure 30 : Evolution entre 6 mn et 320 mn de l'action de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sur  $\text{HbFe}^{\text{III}}$ .

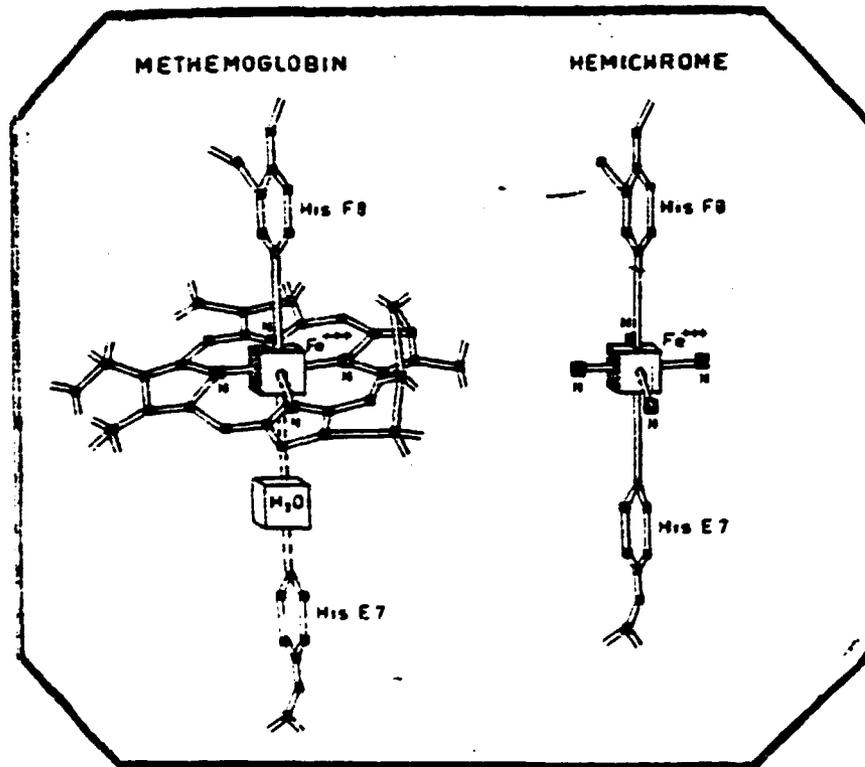


Figure 31 : Illustration des changements d'environnement du fer entre les formes méthémoglobine et hémichrome d'après Rachmilewitz. (43).

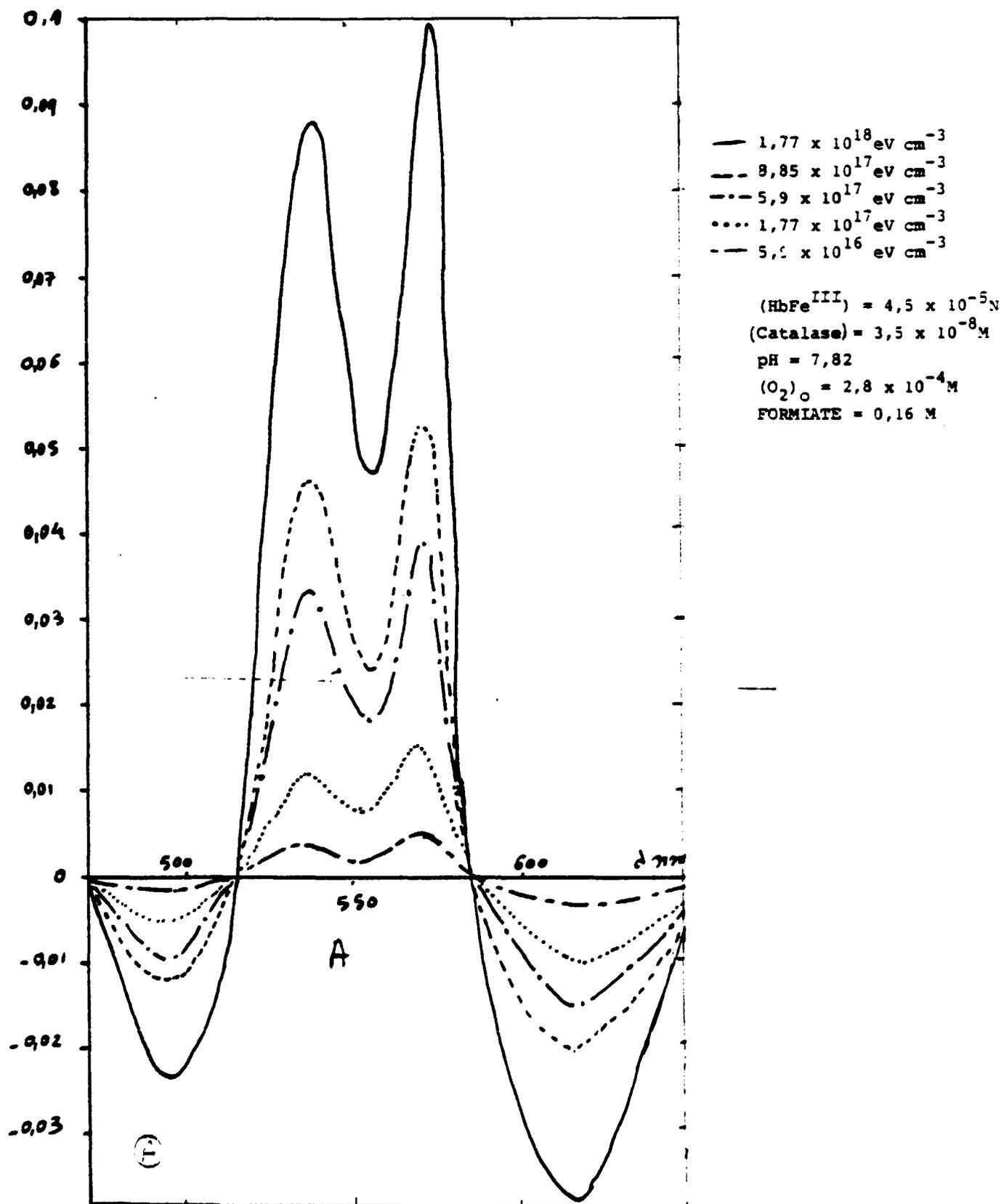
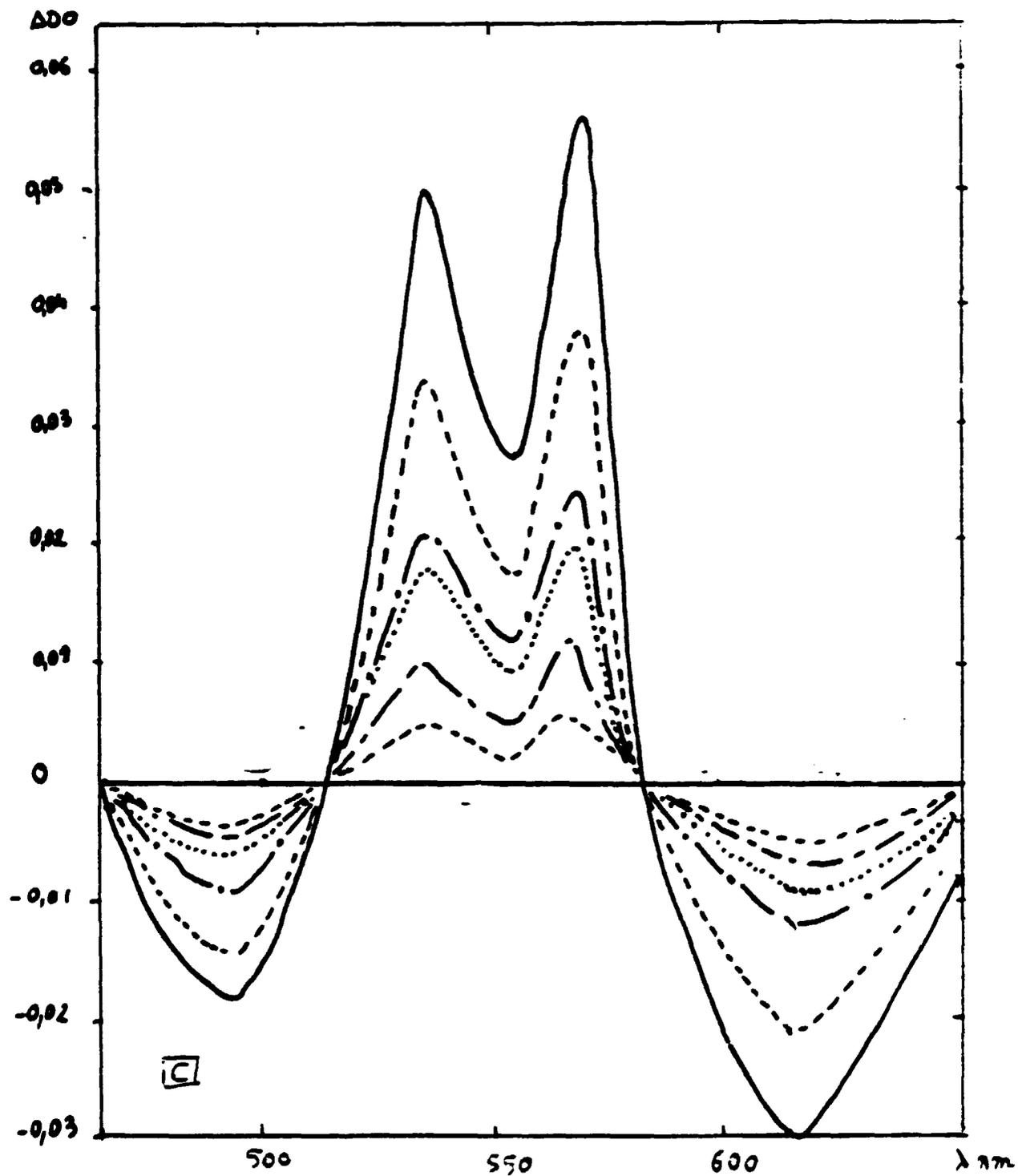


Figure 32 : Radiolyse continue d'une solution de méthémoglobine.

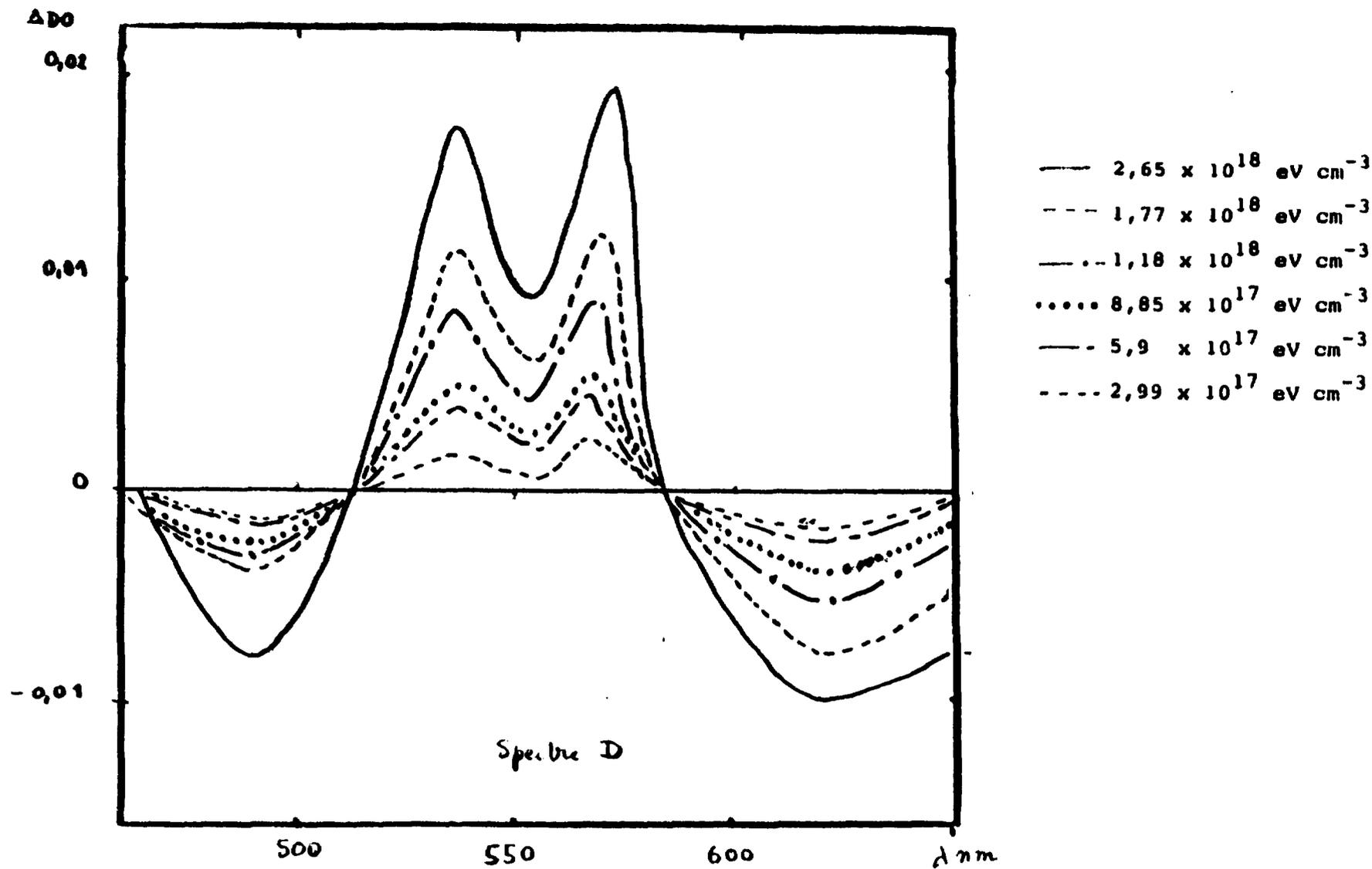




—  $2,65 \times 10^{18} \text{ eV cm}^{-3}$     ---  $1,77 \times 10^{18} \text{ eV cm}^{-3}$   
 - - -  $1,18 \times 10^{18} \text{ eV cm}^{-3}$     .....  $8,85 \times 10^{17} \text{ eV cm}^{-3}$   
 - - -  $5,9 \times 10^{17} \text{ eV cm}^{-3}$     - - - -  $2,95 \times 10^{17} \text{ eV cm}^{-3}$

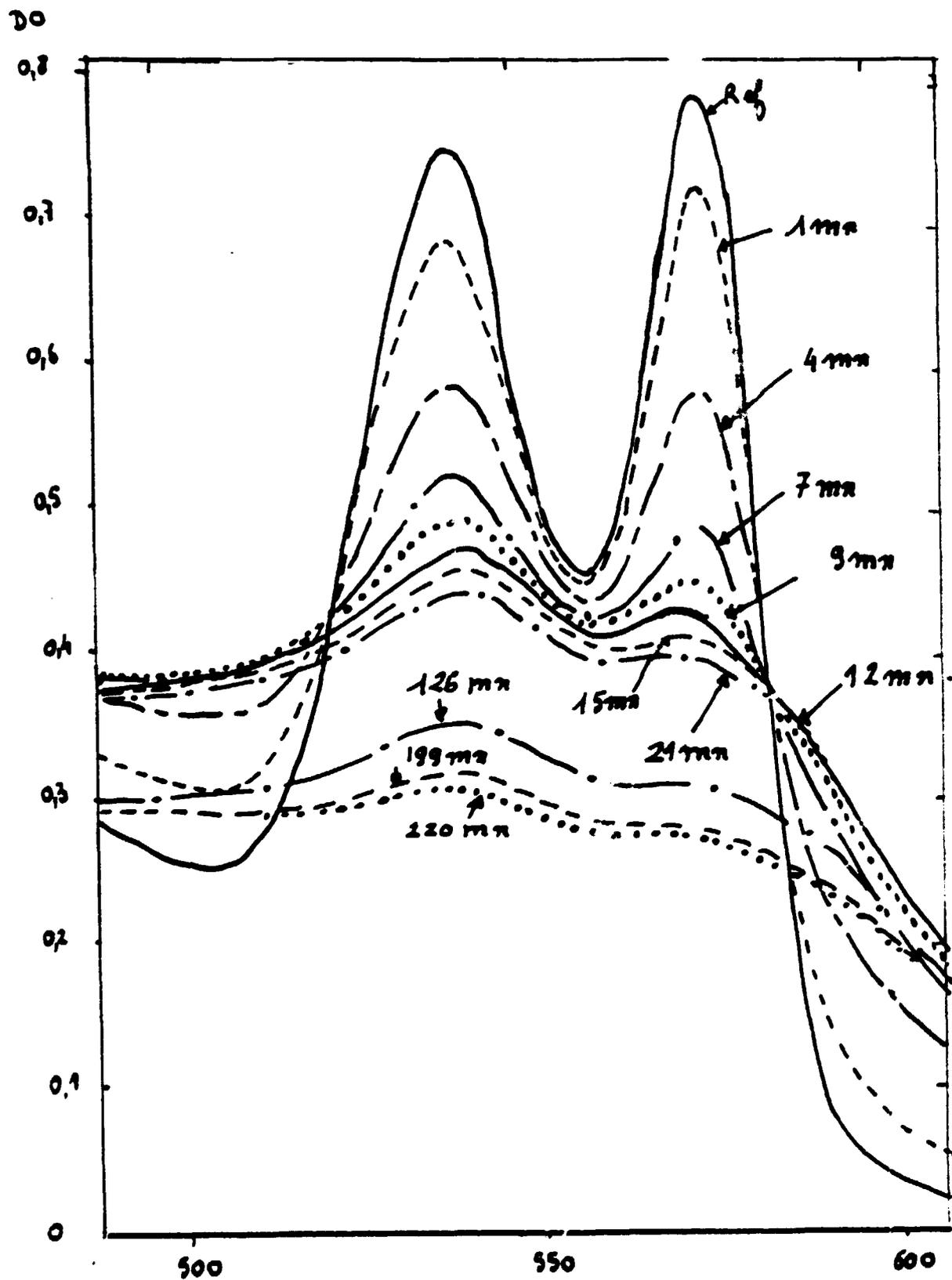
$(\text{HbFe}^{\text{III}}) = 3,1 \times 10^{-5} \text{ N}$ ,     $(\text{Catalase}) = 3,5 \times 10^{-8} \text{ N}$ ,  
 $(\text{O}_2)_0 = 2,8 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,     $\text{pH} = 7,82$ ,     $(\text{SOD}) = 10^{-8} \text{ M}$   
 $\text{FORMIATE} = 0,16 \text{ M}$ .

Figure 34 : Influence de la SOD sur l'irradiation d'une solution aérée de méthémoglobine. (C)



$(\text{MbFe}^{\text{III}}) = 3,1 \times 10^{-5} \text{ N}$ ,  $(\text{Catalase}) = 3,5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $(\text{SOD}) = 10^{-8} \text{ M}$ ,  $(\text{O}_2) = 1,35 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  
 $\text{pH} = 7,82$ ,  $\text{FORMIATE} = 0,16 \text{ M}$ .

Figure 35 : Influence de l'augmentation de concentration en oxygène sur l'irradiation d'une solution de méthémoglobine en présence de SOD.



$(\text{HbFe}^{\text{II}}\text{O}_2) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ N}$   
 $(\text{H}_2\text{O}_2) = 6 \times 10^{-4} \text{ M}$   
 $\text{pH} = 7,8$   
 $\text{FORMIATE} = 0,16 \text{ M.}$

Figure 36 : Action de l'eau oxygénée sur une solution d'oxyhémoglobine.

*Edité par*  
*le Service de Documentation*  
*Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay*  
*91191 GIF-sur-YVETTE Cédex (France)*