

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES



DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES DE CHIMIE ET BIOCHIMIE
DES PRODUITS NATURELS

SUJET

CONTRIBUTION A L'ETUDE BIOCHIMIQUE DES
MEMBRANES ERYTHROCYTAIRES DU
DREPANOCYTAIRE :
COMPOSITION ET TENEUR EN PHOSPHOLIPIDES

MEMOIRE

Présenté publiquement le 03 octobre 1994

Par

Monsieur Ndéné Gaston SARR
Docteur d'Etat en Médecine

MEMBRES DU JURY

Président : Abdoulaye SAMB (Maître de Conférences Agrégé/UCAD)
Examineurs : Moussoukhoye DIOP/CISSOKO (Maître Assistante / UCAD)
Niama DIOP SALL (Maître-Assistant / UCAD)

S O M M A I R E

<u>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</u>	<u>1</u>
I - Généralités sur la Drépanocytose.....	1
II - Rappel sur les phospholipides membranaires.....	3
III - Méthodes d'études des phospholipides membranaires.....	9
IV - Présentation du travail.....	13
<u>MATERIEL ET METHODES.....</u>	<u>15</u>
I - Choix des sujets.....	15
II - Recueil et traitement des spécimens.....	15
III - Exploitation des résultats.....	27
<u>RESULTATS OBTENUS ET DISCUSSION.....</u>	<u>29</u>
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	<u>32</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	<u>34</u>

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I - Généralités sur la Drépanocytose

La drépanocytose est une maladie moléculaire héréditaire du globule rouge, se transmettant selon le mode autosomique récessif et caractérisée par la présence d'hématies falciformes en cas de diminution de la pression en oxygène. Elle atteint une proportion relativement importante de certaines populations africaines avec des taux variant de 5 à 20 % ; au Sénégal cette fréquence est d'environ 6 % (3) ce qui en fait un véritable problème de santé publique.

On décrit habituellement deux formes :

- Une forme homozygote (SS) sévère appelée encore anémie falciforme, avec une mortalité de 55 % avant un an, 25 % entre un et sept ans et 15 % entre sept et quinze ans.

- Une forme hétérozygote (AS) moins grave appelée trait drépanocytaire (4, 15) gênante surtout par sa morbidité.

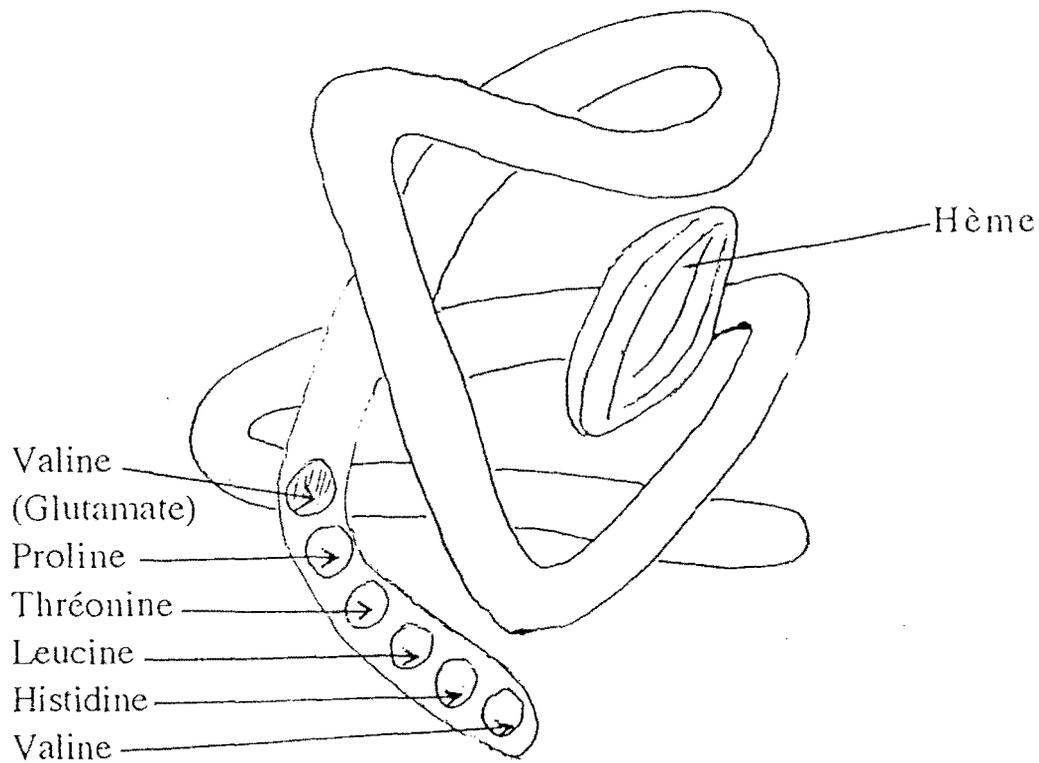
On peut observer des associations entre l'hémoglobine S et d'autres anomalies de l'hémoglobine telles que le double hétérozygotisme SC, l'association HbS-Hb Lepore, l'association HbS-Hb D Pundjad, l'association drépanocytose et thalassémie et enfin l'association HbS-HbF entres autres. Certaines de ces associations sont bénéfiques (HbS-HbF), alors que d'autres sont aussi sévères que la forme homozygote SS (HbS-HbD).

Au plan biochimique, un résidu glutamate en position 6 de la chaîne β de l'hémoglobine normale A est remplacé par un résidu valine dans l'hémoglobine S (Fig. 1). Cette mutation génère une « pièce adhésive » à l'extérieur de la chaîne β favorisant la polymérisation de la désoxyhémoglobine S en de longs précipités fibreux qui altèrent mécaniquement (faucille) le globule rouge (15). Cette altération est à l'origine de l'hyperhémolyse et des effets cliniques multiples constatés au niveau de la rate, des os, des poumons, du cerveau, du méésentère et du rein entre autres.

Certains auteurs évoquent de plus en plus l'existence d'autres facteurs jusque là peu explorés. Ce sont des facteurs métaboliques, immunologiques et membranaires, qui permettraient d'expliquer le déclenchement et la gravité très inégale pour une même forme de la maladie (4).

Dans ce travail réalisé chez des sujets présentant un trait drépanocytaire (AS), nous nous intéresserons essentiellement aux facteurs membranaires, notamment aux phospholipides constitutifs.

Figure 1 : Structure de la chaîne bêta (β) de l'hémoglobine S (HbS)



Hémoglobine A : Val-His-Leu-Thr-Pro-*Glu*-Glu-Lys

Hémoglobine S : Val-His-Leu-Thr-Pro-*Val*-Glu-Lys

B1 2 3 4 5 6 7 8

II - Rappel sur les phospholipides membranaires

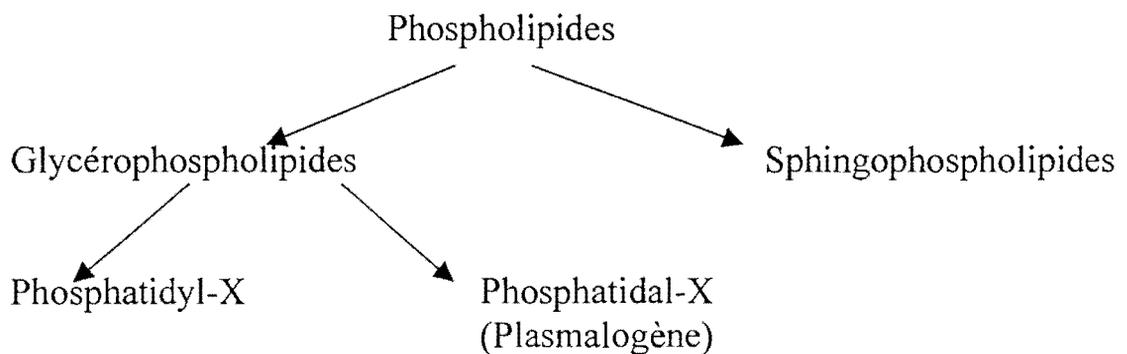
Les membranes biologiques constituent des solutions visqueuses bidimensionnelles, composées de lipides, de protéines et de glucides maintenus ensemble par des interactions non covalentes. Elles créent des compartiments clos qui peuvent être soit un organe à l'intérieur d'une cellule, soit une cellule entière. La membrane du globule rouge, comme du reste la plupart des autres membranes biologiques, est essentiellement composée de lipides dont les plus représentatifs sont les phospholipides, les glycolipides et les stérols (15).

Quantitativement les phospholipides sont majoritaires (plus de 60 % des lipides) et jouent un rôle structural fondamental. En effet, grâce à leur caractère amphipathique, ils constituent une structure en bicouche expliquant et permettant les fonctions essentielles des membranes biologiques (7, 8, 12).

Deux groupes principaux de phospholipides sont présents dans les membranes du globule rouge : les glycérophospholipides et les sphingophospholipides.

II - 1 - Les glycérophospholipides

II - 1 - 1 - Classification



A partir de l'acide phosphatidique et selon la nature du radical X, on obtient :

X = HOCH₂-CHOH-CH₂OH : phosphatidyl glycérol

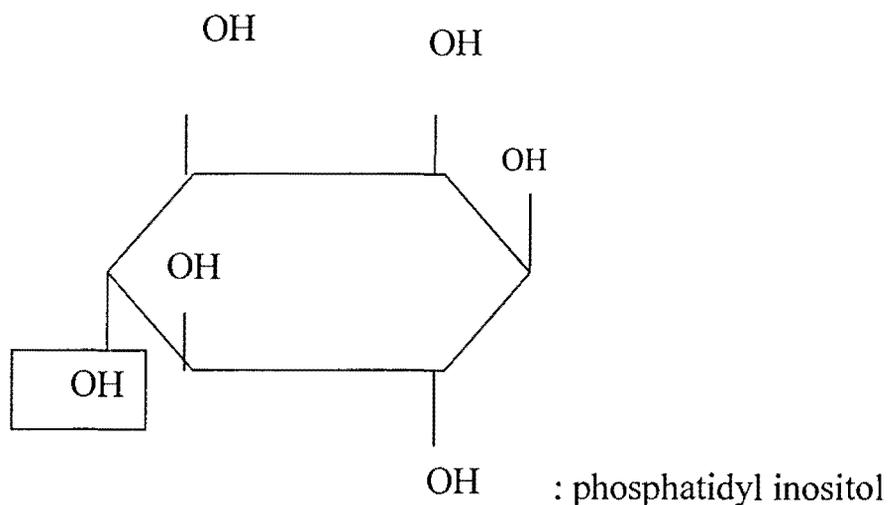
X = HOCH₂-CH₂-NH₂ : phosphatidyl éthanolamine (céphaline)

X = H₂N-CH-CH₂-OH : phosphatidyl sérine



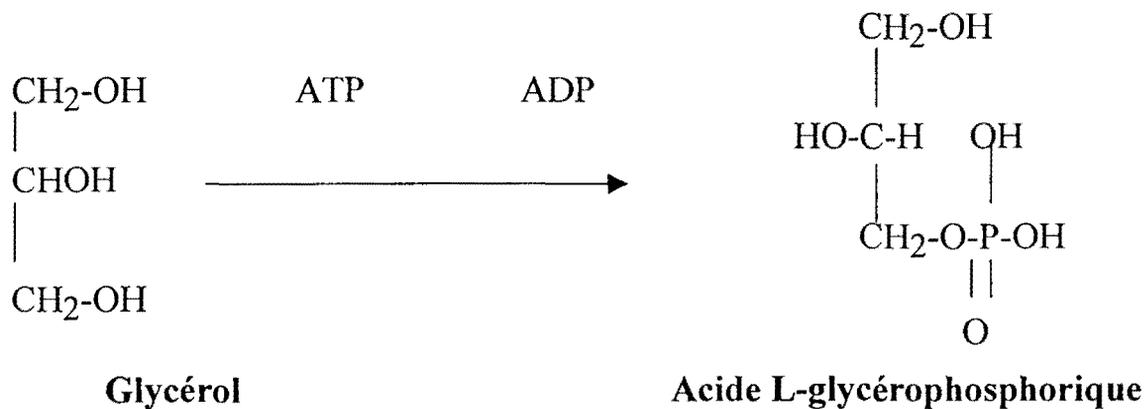
X = HOCH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃ : phosphatidyl choline (lécithine)

X =



II - 1 - 2 - Structure

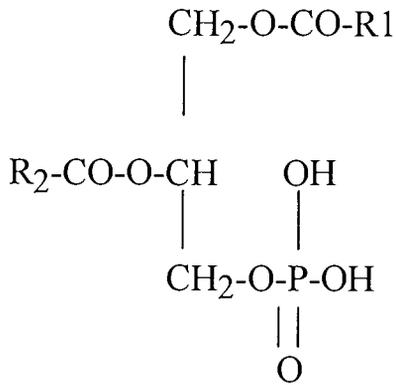
Ils dérivent de l'acide L-glycérophosphorique :



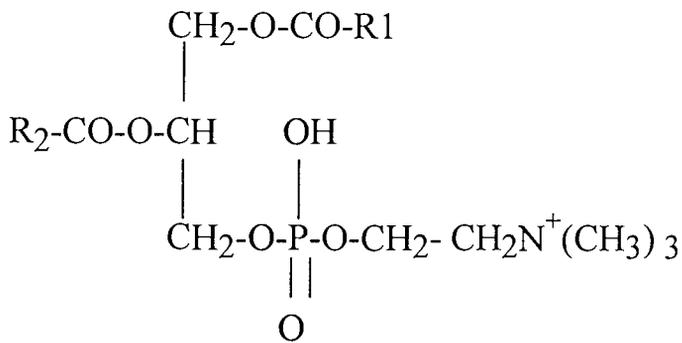
L'acide L-glycérophosphorique est estérifié au niveau des carbones 1 et 2 par des acides gras R1 et R2, pour donner l'acide phosphatidique qui est le glycérophospholipide le plus simple.

R1 = Acide gras saturé

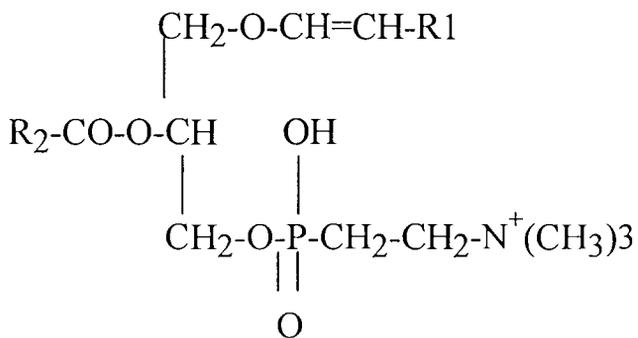
R2 = Acide gras non saturé



Acide phosphatidique



Exemple de phosphatidyl-X = phosphatidyl choline



Exemple de phosphatidal-X = phosphatidal choline

On distingue par ailleurs les dérivés lyso de ces glycérophospholipides résultant d'une action chimique ou enzymatique libérant l'acide gras estérifiant l'alcool secondaire du glycérol. On obtient ainsi les lysophosphatidyl cholines et les lysophosphatidyl éthanolamines. D'autres classes de dérivés lyso sont obtenues dans les mêmes conditions.

II - 1 - 3 - Métabolisme et rôle physiologique

La biosynthèse des glycérophospholipides est possible dans la plupart des cellules. Il existe deux voies principales de biosynthèse qui sont celle de la CDP-diglycéride et celle de la CDP-X (X= choline, éthanolamine etc...) (15).

Les glycérophospholipides sont dégradés en glycérol, phosphate et acide gras, après hydrolyse par des enzymes spécifiques : les phospholipases (fig. 2).

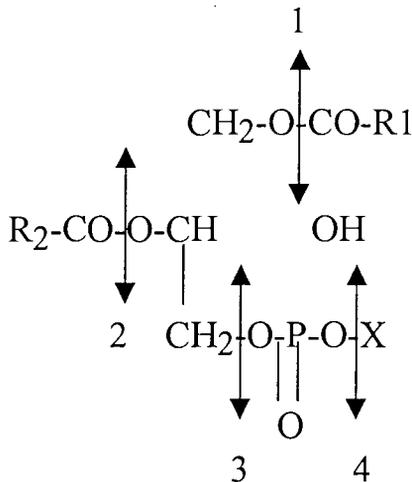


Figure 2 : Site d'action des différentes phospholipases.

- 1 = Phospholipase A1
- 2 = Phospholipase A2
- 3 = Phospholipase C
- 4 = Phospholipase D

Le rôle des glycérophospholipides est essentiellement structural, cependant des rôles spécifiques ont été reconnus pour certains d'entre eux.

- Les acides phosphatidiques constituent des intermédiaires communs à la synthèse des phospholipides et des triglycérides.

- Les phosphatidyl sérines ont une forte affinité pour les ions Ca^{++} . Ils sont spécifiquement responsables des liaisons avec les protéines du cytosquelette au niveau des feuillettes externes des membranes cellulaires.

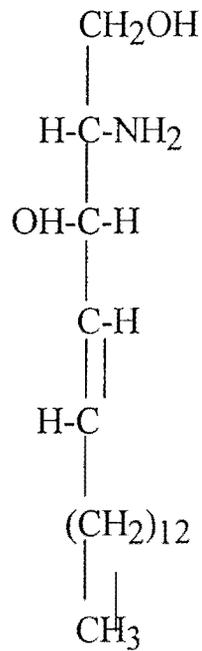
- Les phosphatidyl inositols se comportent comme de véritables médiateurs en contrôlant les mouvements du calcium cytoplasmique et membranaire et en activant les protéines kinases C. Par ailleurs ils contribuent à l'enracinement des protéines dans les membranes.

- Les phosphatidyl éthanolamines sont présents dans toutes les cellules mais leur rôle physiologique n'est pas encore clairement identifié.

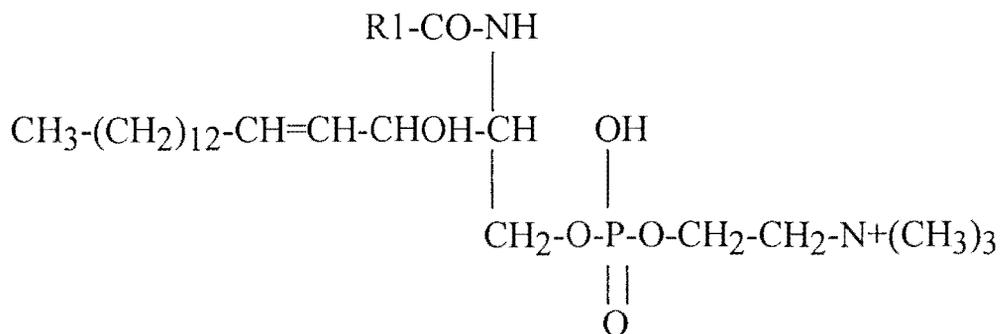
II - 2 - Les sphingolipides

II - 2 - 1 - Structure

Dans ce groupe, le glycérol des glycérophospholipides est remplacé par la sphingosine :



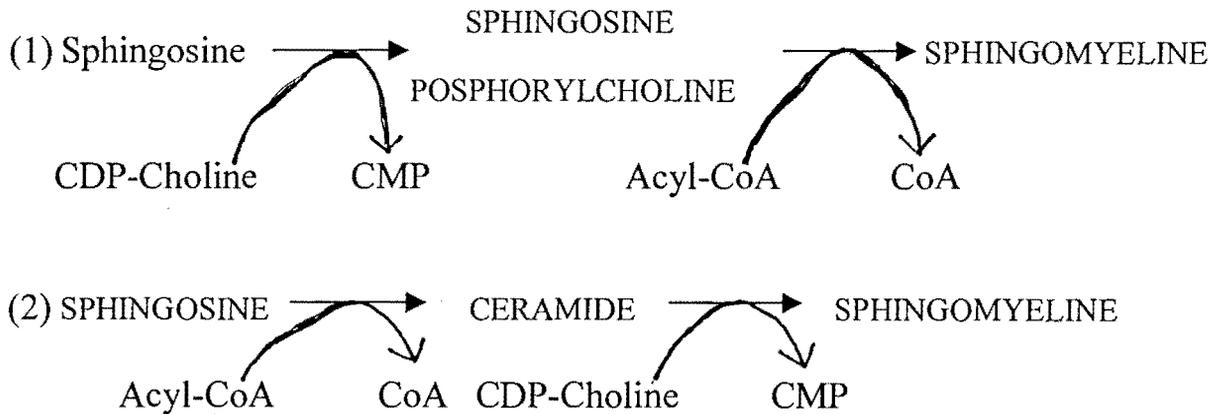
Sphingosine



Structure de la sphingomyéline

II - 2 - 2 - Métabolisme et rôle physiologique

Deux voies de biosynthèse sont décrites :



La dégradation des sphingolipides est essentiellement hépatique, grâce aux sphingomyélinases qui sont des enzymes lysosomiques hydrolytiques spécifiques (15).

Les sphingolipides sont surtout présents au niveau de la gaine de myéline des fibres nerveuses. Dans les membranes biologiques, ils jouent un rôle important dans la communication et le contact entre les cellules ; certaines ont un rôle antigénique (12, 15).

III - Méthodes générales d'étude des phospholipides membranaires

III - 1 - Extraction et identification des lipides

L'extraction des lipides commence par l'isolement des membranes érythrocytaires encore appelées stroma ou « ghost » (fantôme). Ces membranes peuvent être débarrassées de leur contenu soluble en particulier l'hémoglobine, selon deux types de procédés (25).

- **Hémolyse hypotonique** : En solutions fortement hypotoniques, les hématies s'hémo lysent et laissent échapper l'hémoglobine. Après plusieurs lavages, on obtient des stromas blancs pratiquement dépourvus d'hémoglobine.

- **Fragmentation mécanique** : rarement utilisé du fait des altérations considérables qu'elle peut engendrer.

Une fois les membranes isolées, deux types de méthodes sont couramment utilisées pour l'étude des lipides.

III - 1 - 1 - Les méthodes physiques

* La microscopie électronique à haute résolution par ses méthodes (cryodécoupage, réplique) en éliminant les artefacts de déshydratation, de fixation et de coloration, permet le clivage de la membrane érythrocytaire dans son épaisseur montrant deux feuillettes et quatre surfaces.

* La résonance magnétique nucléaire étudie l'interaction de la molécule avec le champ vecteur magnétique de l'onde électromagnétique.

* La résonance paramagnétique électronique utilise des sondes ou marqueurs de spin. Son intérêt réside dans l'objectivation des différences entre les spectres d'hématies normales et d'hématies modifiées.

* L'infrarouge : à l'aide d'une source lumineuse, on envoie sur une molécule ou une solution des radiations électromagnétiques dont certaines seront absorbées. Un système de détection associé à un système de mesure et d'enregistrement, permet de tracer un spectre utilisé pour l'étude des structures moléculaires et des substances chimiques.

* Les sondes fluorescentes, la vidéo-microscopie et la vélocimétrie associées à la microscopie électronique, permettent actuellement d'obtenir des images à trois dimensions de la structure des différentes molécules étudiées.

III - 1 - 2 - Les méthodes chimiques

Elles sont peu spécifiques. L'extraction des lipides par des solvants organiques est suivie de leur séparation et de leur identification par les principales méthodes d'analyse suivantes :

- Chromatographie sur couche mince (CCM) : permet la séparation et l'identification des différentes classes de lipides. Sur des couches d'adsorbant (silice) d'environ 250 μ d'épaisseur étalées convenablement sur des plaques de verre, on dépose les substances à séparer et à identifier. A l'aide de solvants appropriés, ces substances sont entraînées à des vitesses différentes ; et à la fin de la migration vont avoir chacun un coefficient de migration propre appelé R_f qui sera comparé au R_f de substances connues et traitées dans les mêmes conditions (21).

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$

- Chromatographie en phase gazeuse (CPG) : permet également une bonne séparation et une identification des classes de lipides après leur transformation en dérivés volatils. Elle consiste à faire passer un mélange d'esters méthyliques à l'état gazeux sur une colonne de poudre chauffée à très haute température. La quantité de substances qui sortent successivement de la colonne à un temps T donné est mesurée automatiquement. Les substances sont identifiées grâce à la comparaison de leur temps de rétention par rapport à celui de standards connus et traités dans les mêmes conditions (27).

- Chromatographie liquide haute performance (CLHP) : C'est l'une des dernières-nées des méthodes de séparation, de purification et d'analyse des composés organiques. Dans cette méthode, la phase mobile est entraînée par une forte pression hydrostatique. Les séparations obtenues sont nettement meilleures qu'avec les précédentes méthodes ; en plus, de plus petits échantillons peuvent être analysés (22).

III - 2 - Composition lipidique des membranes (7, 12)

Les lipides totaux représentent environ 44 % du poids des membranes totales. Les principaux constituants sont :

- Les phospholipides, 65 à 70 % des lipides totaux.
 - lécithines (phosphatidyl cholines) # 30 %
 - céphalines (phosphatidyl éthanolamines # 27 %
 - sphingomyélines # 22 à 25 %
 - phosphatidyl sérine et inositol # 13,5 %
 - lysolécithines 1,2 à 2,5 %
- Le Cholestérol 20 à 25 %

III - 3 - Dosage des phospholipides

III - 3 - 1 - Méthode minérale

Dans cette méthode, les phospholipides sont estimés après minéralisation et dosage du phosphore lipidique. Approximativement, le poids des phospholipides est égal à 25 fois le poids du phosphore dosé (20).

En présence d'un excès d'acide molybdique, l'acide orthophosphorique forme un complexe de couleur bleue d'acide phospho-duodécimomolybdique (PO_4H_3 , 12 MoO_3). Le dosage est effectué après défécation trichloracétique suivie de la minéralisation par un mélange d'acide sulfurique et d'acide perchlorique (11).

III - 3 - 2 - Méthode au Naphtol blue black (18)

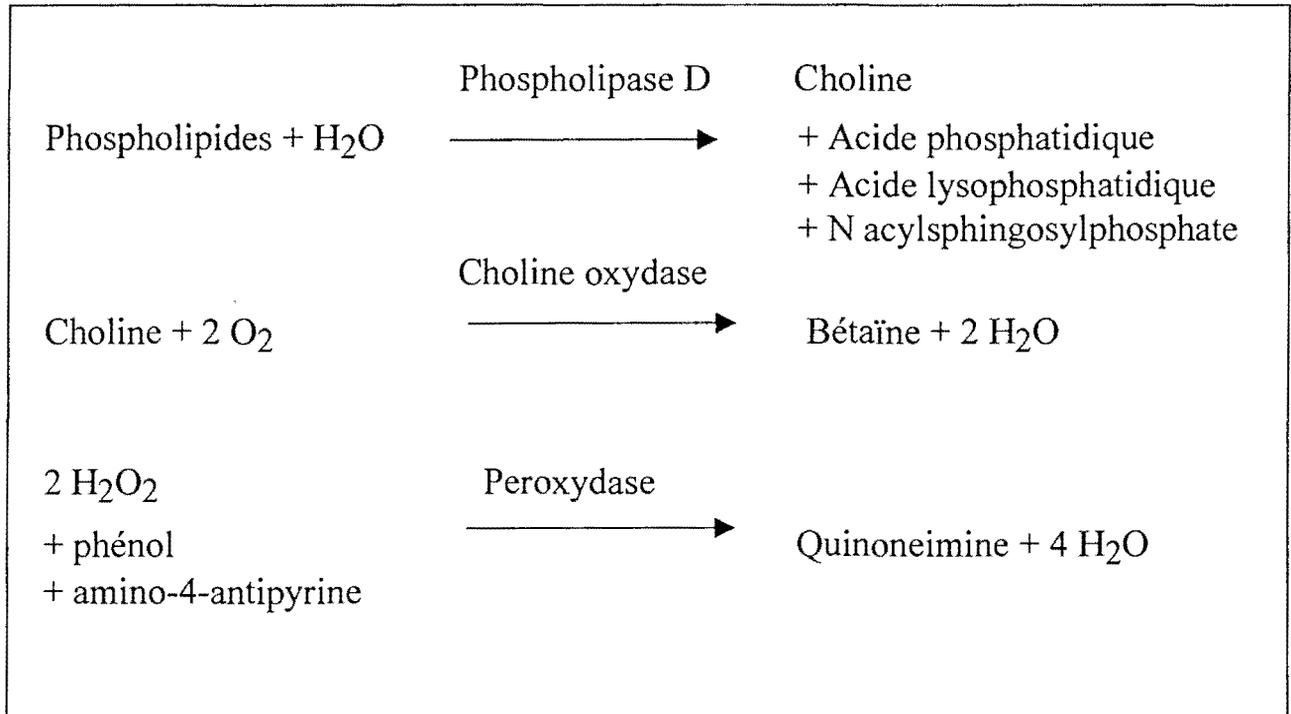
Après développement et séchage, les plaques sont immergées pendant 5 minutes dans une solution de naphtol blue black à 5 g/l dans de l'acide acétique à 20 %.

Les plaques sont ensuite lavées abondamment à l'eau pour éliminer l'excès de colorant et séchées à l'étuve à 100°C pendant 10 minutes.

Les différentes tâches repérées sont grattées et transférées dans des tubes contenant 2 ml de diméthylformamide. Après 15 minutes d'éluion, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 578 nm. La quantité de phospholipides est déduite à partir d'une droite d'étalonnage établie dans les mêmes conditions.

III - 3 - 3 - Méthode enzymatique (26)

Cette méthode n'intéresse que les phospholipides choliniques : lécithines, lysolécithines et sphingomyélines. Le principe est le suivant :



IV - Présentation du travail

Après cette première partie consacrée à un rappel bibliographique, notre travail expérimental consistera :

- A sélectionner des sujets non drépanocytaires et des sujets drépanocytaires hétérozygotes, par la pratique d'une électrophorèse de l'hémoglobine.

- A extraire les phospholipides membranaires totaux des sujets normaux AA et des drépanocytaires hétérozygotes AS.

- A identifier les différentes classes de phospholipides des extraits, par chromatographie sur couche mince, par comparaison avec des standards connus purs (98 à 99 %) traités dans les mêmes conditions.

- A évaluer quantitativement les teneurs des phospholipides totaux et les proportions relatives de différentes classes de phospholipides chez nos deux catégories de sujets.

MATERIEL ET METHODES

I - Choix des sujets

I - I - Sujets témoins

Ce sont des sujets sains (sans manifestation pathologique apparente), leur hémoglobine est normale quantitativement et qualitativement. Pour chacun, ont été pratiqués une numération formule sanguine, un taux d'hémoglobine et une électrophorèse de l'hémoglobine ; tous les sujets ayant présenté un résultat pathologique ont été éliminés de l'étude. Dans la suite de l'étude, nous les appellerons sujets AA par référence à l'hémoglobine normale AA.

I - 2 - Sujets malades

I - 2 - 1 - Critères d'inclusion

Seuls sont pris en compte les sujets présentant à l'électrophorèse de l'hémoglobine un tracé du type AS (drépanocytose hétérozygote).

I - 2 - 2 - Critères d'exclusion

A posteriori, ont été exclus tous les sujets présentant une autre hémoglobinopathie, ou une anémie relevant d'autres causes. Ont été également exclus les sujets AS, mais sous traitement. Les sujets homozygotes SS et les doubles hétérozygotes SC ont également été exclus.

II - Recueil et traitement des spécimens

II - 1 - Prélèvements

Les prélèvements sont effectués sur EDTA après pose d'un garrot au-dessus du pli du coude chez les sujets à jeun depuis une douzaine d'heures, en général entre 8h et 9h du matin. Après centrifugation à 3000 tours/mn pendant 10 minutes, le surnageant est éliminé et le culot globulaire récupéré dans du sérum physiologique pour les étapes ultérieures. Ce traitement est effectué au maximum dans les trois heures suivant le prélèvement.

II - 2 - Préparation du culot globulaire

Le culot globulaire est lavé quatre fois au sérum physiologique. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à 3000 tours/mn pendant cinq minutes et le surnageant renfermant des traces de protéines plasmatiques est éliminé.

II - 3 - Electrophorèse de l'hémoglobine

II - 3 - 1 - Hémolyse :

Elle est réalisée dans un tube à hémolyse en pyrex dans les conditions suivantes :

- 1 volume de culot globulaire
- + 1/2 volume de chloroforme
- + 1 volume et demi d'eau distillée.

Le mélange est laissé au repos 30 minutes à température ambiante. Après homogénéisation, on procède à 4°C, à une centrifugation à 7000 tours/mn pendant 45 minutes. Le surnageant est récupéré pour réaliser les dépôts d'électrophorèse.

III - 3 - 2 - Electrophorèse proprement dite :

Cette technique permet la séparation des différentes variétés d'hémoglobine par leur différence de migration sur un support déterminé et à l'aide d'un tampon et d'un champ électrique adéquats.

-> Réactifs :

- Tampon barbital Ph 8,6
 - Barbital sodique -----> 20,60 g
 - Barbital (diéthylmalonylurée)-----> 3,6 g
 - Eau distillée, qsp -----> 1000 ml

Ce mélange sera dilué extemporanément au quart avec de l'eau distillée.

- Bandes d'électrophorèse Cellogel (bandes d'acétate de cellulose commercialisées par la firme Sébia).

- Eau physiologique
- Chloroforme
- Ethanol
- Acide acétique
- Diacétone alcool

-> **Appareils et petit matériel :**

- Plaques en verre
- Pinces en plastique
- Cuve d'électrophorèse
- Applicateur 4 dépôts
- Portoir de bandes cellogel
- Générateur d'électrophorèse (200 volts).
- Densitomètre

-> **Mode opératoire :**

- Les surnageants obtenus dans la phase d'hémolyse, sont déposés à l'aide d'un applicateur semi-micro Sébia, sur le côté cathodique de la bande de cellogel fixée sur un portoir.

- Le portoir et la bande sont ensuite placés dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon basique.

- On applique une tension de 200 V entre les deux bornes de la cuve et on laisse la migration s'effectuer de la cathode vers l'anode pendant 1 heure 30 minutes.

- A la fin de la migration, les différentes fractions sont révélées et colorées par le Rouge Ponceau.

- Les bandes sont ensuite rendues transparentes et séchées à l'étuve à 50 ° pendant une heure.

- On procède enfin à une première appréciation des différentes fractions à l'œil nu, et ensuite à une lecture densitométrique avec le Profil 2 Sébia. Dans les planches 1, 2 et 3 nous reproduisons des exemples de tracés électrophorétiques et de lectures densitométriques de quelques-uns de nos prélèvements.

Planche I : Exemples de tracés électrophorétiques obtenus.

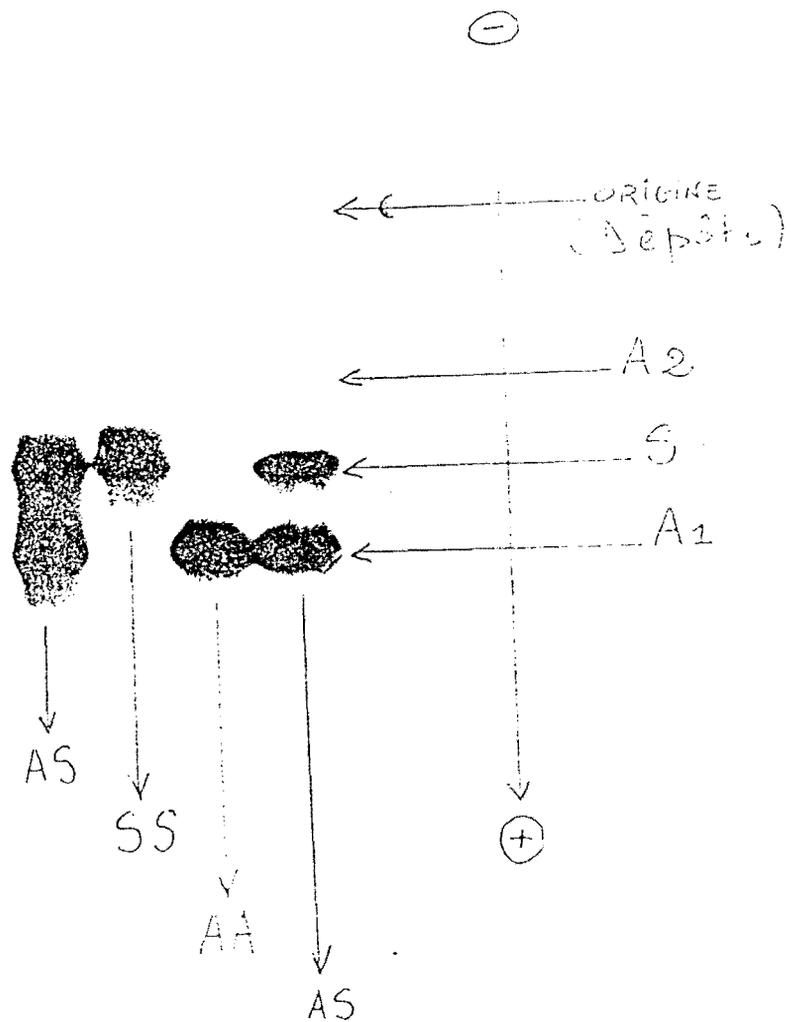
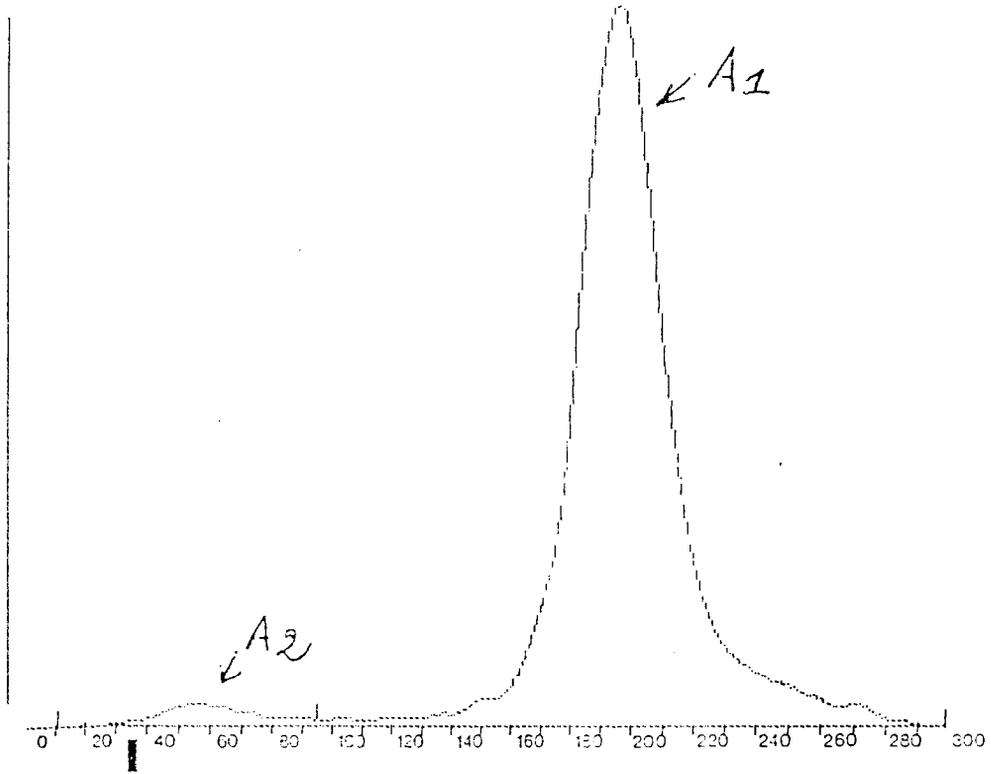


Planche 2 : Enregistrement densitométrique des tracés (AA, AS).

France - Profil - réf.: 1510
 BIOCHIMIE MEDICALE FACULTE DE MEDECINE DAKAR

18-02-94 0

2 ECH: 2
TRACE NORMAL AA



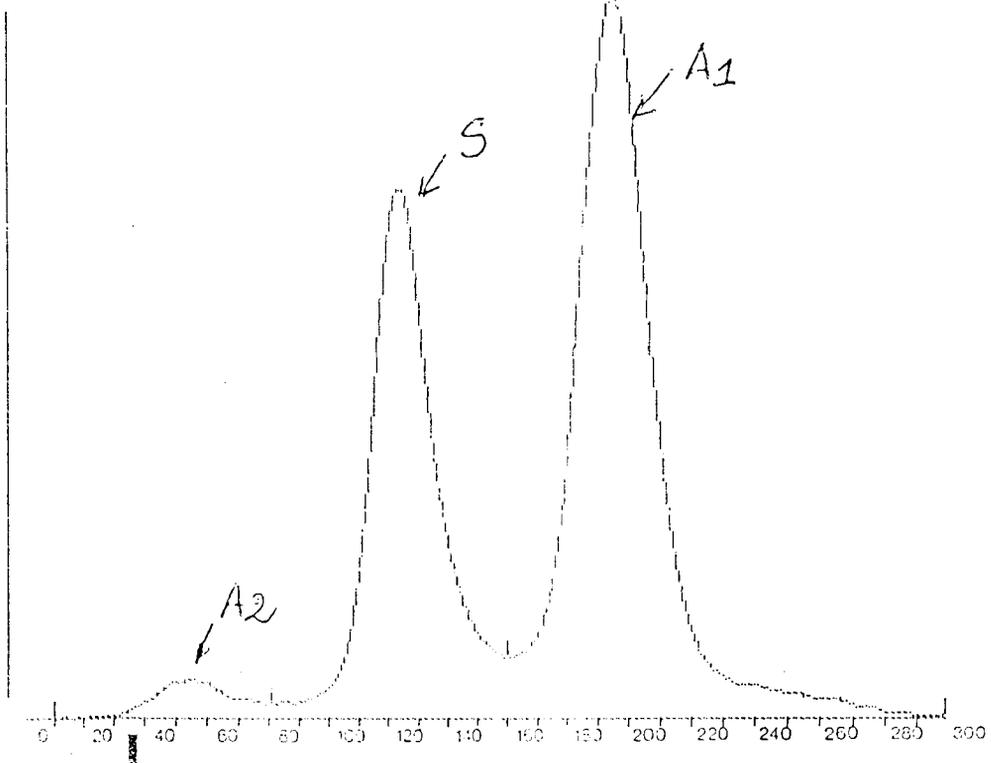
0.0
 96.8
 3.2

RESULTAT % HB
 HB A1 = 96,8
 HB A2 = 3,2
 HB S = 0
 HB I = 0
 HB II = 0

France - Profil - réf.: 1510
 BIOCHIMIE MEDICALE FACULTE DE MEDECINE DAKAR

18-03-94 0

3 ECH: 3
TRACE TYPE AS



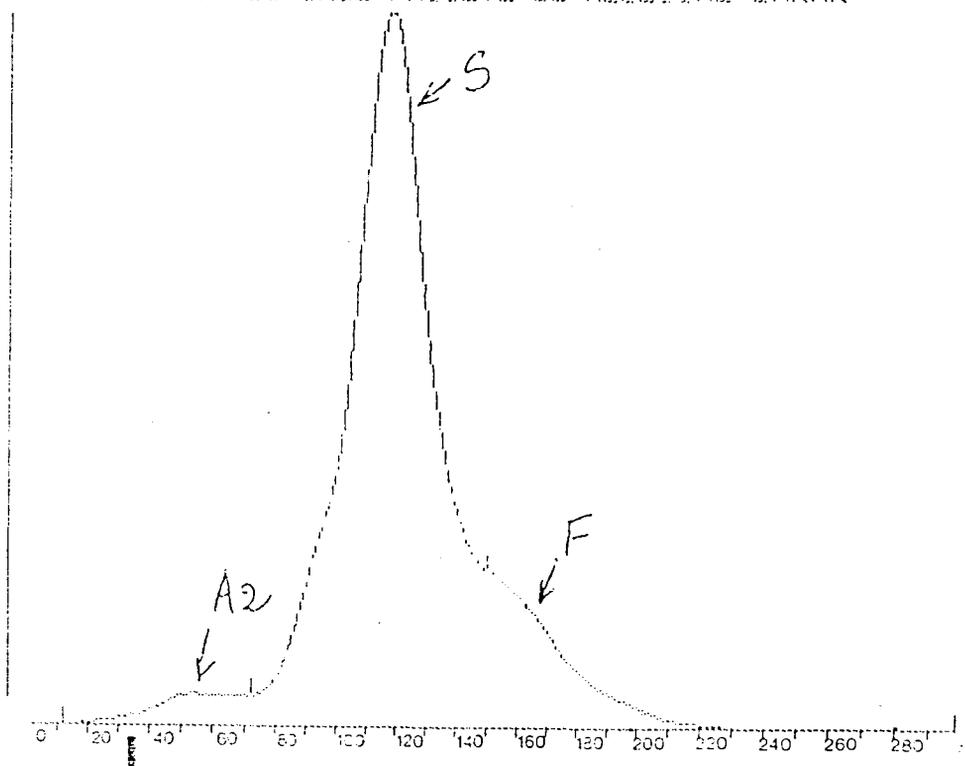
0.0
 58.9
 37.7
 3.4

RESULTAT % HB
 HB A1 = 58,9
 HB A2 = 3,4
 HB S = 37,7
 HB I = 0
 HB II = 0

Planche 3 : Enregistrement densitométrique des tracés (SS, SC).

France - Profil - réf.: 1510

BIOCHIMIE MEDICALE FACULTE DE MEDECINE DAKAR



18-02-94 0

1 ECH: 1

TRACE TYPE SS

0.0

#14.1

#82.0

3.9

RESULTAT 2 HB

HB A1 = 0

HB A2 = 3,9

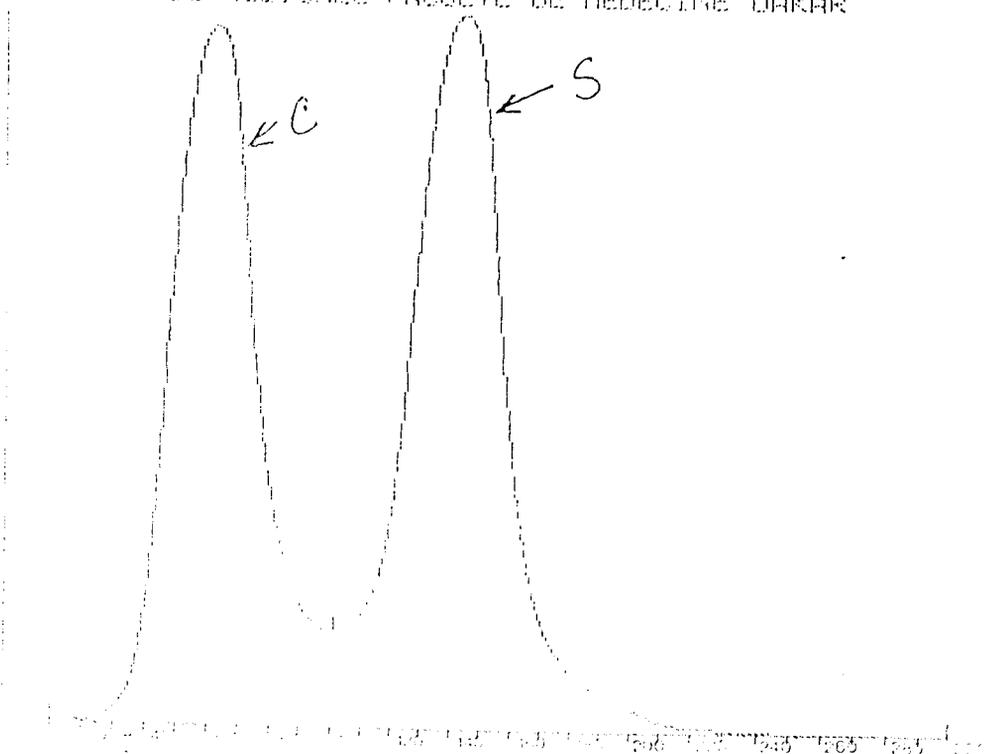
HB S = 82

HB F = 0

HB I = 14,1

France - Profil - réf.: 1510

BIOCHIMIE MEDICALE FACULTE DE MEDECINE DAKAR



18-02-94 0

1 ECH: 1

TRACE TYPE SC

0.0

54.1

45.9

RESULTAT 2 HB

HB A1 = 0

HB A2 = 0

HB S = 54,1

HB F = 45,9

HB I = 0

II - 4 - Extraction des lipides membranaires

Nous avons procédé à l'extraction des lipides membranaires grâce à la technique de Folch (13) que nous avons modifiée comme suit :

- Prélèvement de 250 μ l du culot globulaire dans un tube en pyrex de 100 ml.
- Ajouter 5 ml d'eau distillée et laisser reposer au congélateur (-20°C) pendant une heure.
- Sortir le tube et le laisser à l'air libre pendant trente minutes.
- Ajouter 80 ml du mélange chloroforme / méthanol (2V/1V) et agiter vigoureusement au vortex pendant deux minutes.
- Ajouter 15 ml de KCl, et agiter à nouveau pendant 5 minutes.
- Centrifuger à 4000 tours / mn pendant 10 minutes. Le mélange se subdivise en deux phases ; l'une supérieure contenant le méthanol, l'eau et les protéines est éliminée, l'autre inférieure chloroformique et contenant les lipides est récupérée.
- Ajouter 5 g de sulfate de sodium anhydre et agiter.
- Après filtration, on procède à l'évaporation à sec au rotavapor, cela nous permet d'obtenir un fin film lipidique tapissant le fond du tube.

II - 5 - Séparation des différents phospholipides

Les phospholipides sont isolés et séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) avec des plaques SILICA GEL 60 F – 254 ®.

Le film lipidique est repris par 200 μ l de chloroforme. Après homogénéisation au vortex, 100 μ l du mélange sont déposés sur la plaque avec comme éluant le mélange suivant :

- chloroforme -----> 50 ml
- méthanol -----> 30 ml
- acide acétique -----> 8 ml
- eau distillée -----> 4 ml

On laisse migrer pendant deux heures à la température du laboratoire, en moyenne entre 25 °C et 30 °C. Sur chaque plaque est déposé simultanément 100 μ l d'un mélange équimolaire de témoins de cinq phospholipides : phosphatidyl choline, phosphatidyl éthanolamine, sphingomyéline, lysophosphatidyl choline et lysophosphatidyl éthanolamine (Sigma).

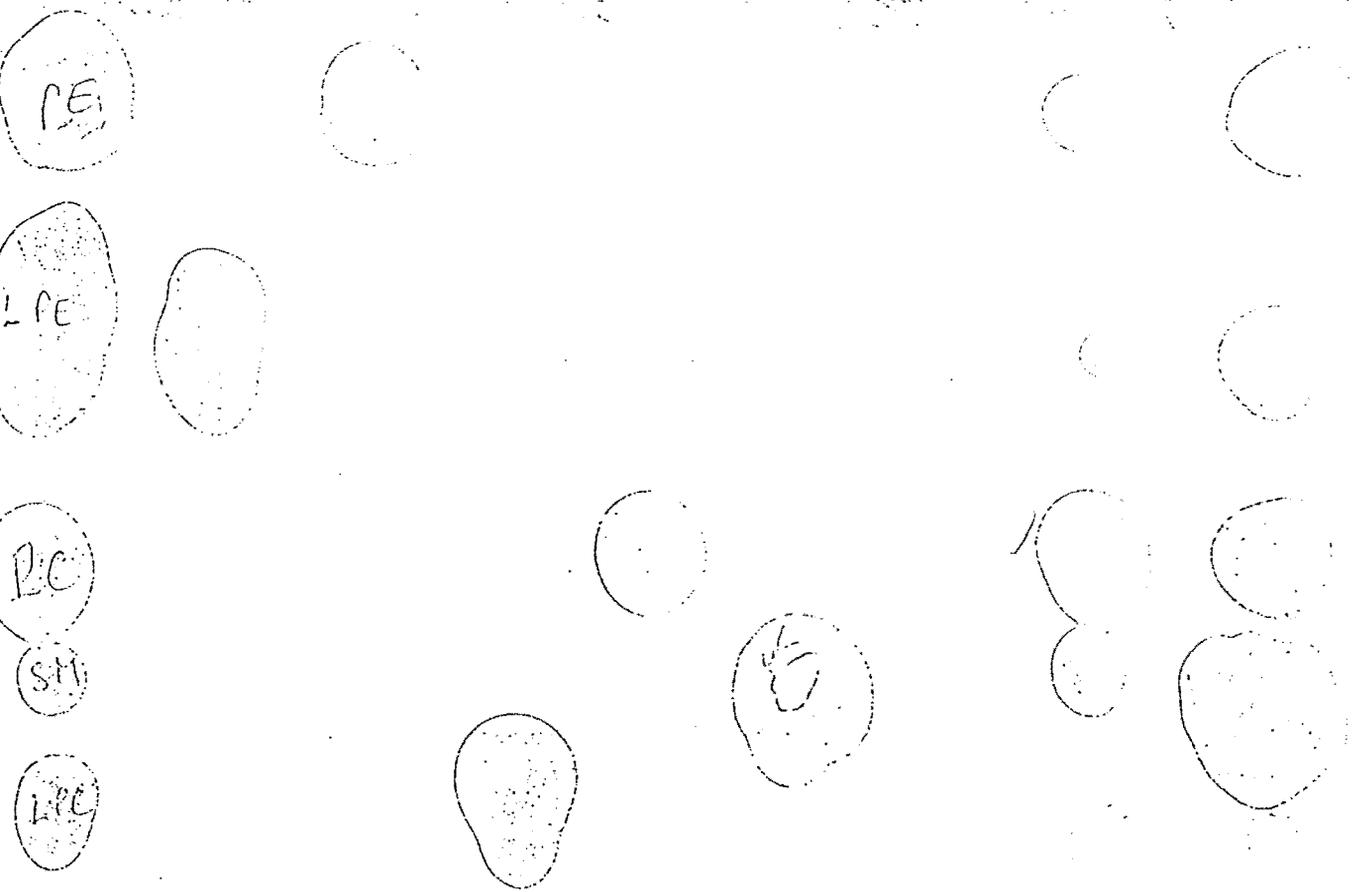
II - 6 - Identification des classes de phospholipides

Les différentes classes de phospholipides sont révélées par un rapide passage aux vapeurs d'iode. L'identification de chaque classe est faite par comparaison aux standards présents sur la même plaque (planche 4).

Ce sont cinq standards purs commercialisés par Sigma Chemical Co :

- Phosphatidyl choline 98 %
- Lysophosphatidyl choline 99 %
- Phosphatidyl éthanolamine 99 %
- Lysophosphatidyl éthanolamine 99 %
- Sphingomyéline 99 %

Planche 4 : Identification des différents phospholipides par CCM, révélation à l'iode (renforcement par éosine pour la photocopie).



-Dépôt-

- | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 1 - Mélange des 5 standards | | | | | | | |
| 2 - Lysophosphatidyl éthanolamine (Rf = 0,70) | | | | | | | |
| 3 - Phosphatidyl éthanolamine (Rf = 0,90) | | | | | | | |
| 4 - Lysophosphatidyl choline (Rf = 0,17) | | | | | | | |
| 5 - Phosphatidyl choline (Rf = 0,45) | | | | | | | |
| 6 - Sphingomyéline (Rf = 0,31) | | | | | | | |
| 7 - Témoin AA | | | | | | | |
| 8 - Drépanocytose AS | | | | | | | |

II - 7 - Dosages des phospholipides

Pour le dosage des phospholipides nous avons utilisé la méthode minérale pour des raisons que nous développerons dans la discussion. Les dosages sont effectués en double pour garantir l'exactitude des résultats.

I - 7 - 1 - Dosage des phospholipides totaux

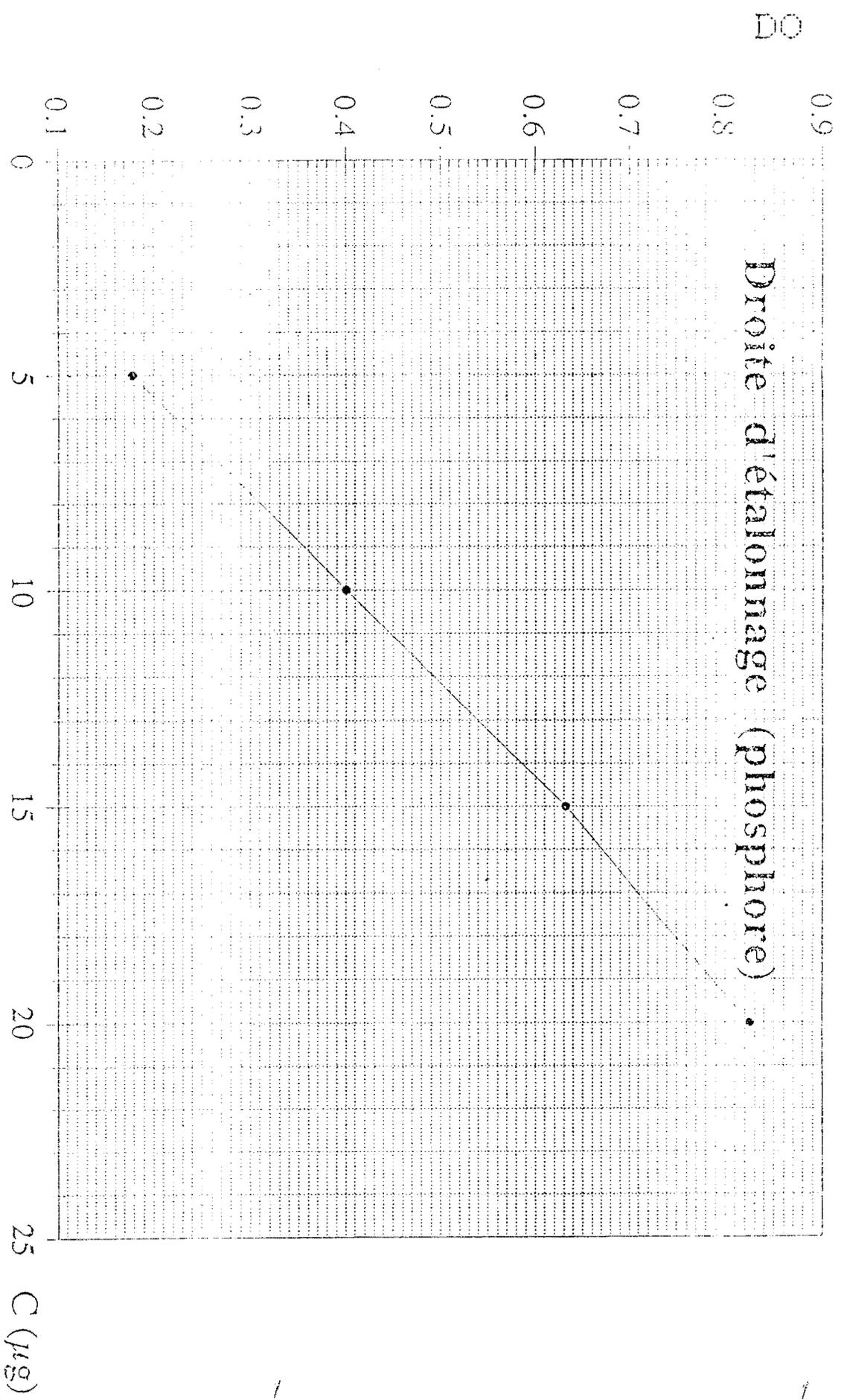
* Réactifs

- Acétate de sodium (CH_3COONa) à 50 % dans l'eau distillée (P/V)
- Molybdate d'ammonium $[(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}]$ à 3 % dans l'eau distillée
- Réactif réducteur :
 - Hydroquinone ($\text{HOC}_6\text{H}_4\text{OH}$).....1 g
 - Métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)3 g
 - Eau distillée, qsp100 ml
- Acide trichloracétique 7 % (P/V)
- Réactif de destruction :
 - Acide sulfurique (H_2SO_4).....50 ml
 - Acide perchlorique à 70 % (HClO_4).....50 ml
 - Eau distillée.....100 ml
- Solution étalon de phosphore à 1000 $\mu\text{g/ml}$:
 - Phosphate monopotassique anhydre (KH_2PO_4).....4,381 g
 - Chlorure de sodium (ClNa).....9 g
 - Eau distillée, qsp1000 ml

* Technique :

-> Minéralisation

- Culot globulaire traité dans les conditions ci-dessus -----> 50 μl
- Eau distillée -----> 250 μl
- Acide trichloracétique à 7 % -----> 2500 μl



Le mélange est homogénéisé au vortex pendant 1 minute et centrifugé à 3000 tours/minute pendant 10 minutes et le surnageant est éliminé par retournement.

Le phosphore du culot formé de stromas, de protéines et de lipides, est minéralisé par 1 ml du réactif de destruction. Le mélange dans lequel est introduite une bille de verre, est laissé au bain de sable chaud pendant deux heures jusqu'à la disparition de toute fumée blanche. Pour transformer les pyrophosphates en orthophosphates, on ajoute 1 ml d'eau distillée et on laisse bouillir 15 secondes (tube dosage *).

-> Dosage :

Le tableau (I) suivant résume les différentes étapes du dosage proprement dit du phosphore minéral.

Tableau I : Mode opératoire pour le dosage du phosphore minéral.

Réactif	Tube	Blanc	Dosage *
H ₂ O (ml)		8,75	7
H ₂ SO ₄		0,25	-
CH ₃ COONa à 50 % (ml)		1	1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 3 % (ml)		1	1
Réactif de réduction (ml)		1	1

Le contenu de chaque tube est ensuite homogénéisé et on laisse la coloration se développer pendant 30 minutes. L'intensité de la coloration bleue est appréciée au spectrophotomètre à 750 nm en faisant le zéro de l'appareil avec le blanc. Les différentes concentrations sont déduites à partir de la droite d'étalonnage (planche 5). Les concentrations correspondantes en phospholipides de chaque tâche sont obtenues en multipliant par 25 les valeurs trouvées sur la droite d'étalonnage. La valeur obtenue est ensuite rapportée à l'équivalent de 250 µl de culot globulaire, en vue de la déduction des concentrations relatives des différentes classes de phospholipides.

-> Etablissement de droite d'étalonnage

	Blanc	T1 5 µg	T2 10 µg	T3 15 µg	T4 20 µg	T4 25 µg	T5 30 µg
Etalon au 1/200 ^e (ml)	-	1	2	3	4	5	6
H ₂ SO ₄ (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
CH ₃ COONa(ml)	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ O (ml)	8,75	7,75	6,75	5,75	4,75	3,75	2,75
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Réducteur	1	1	1	1	1	1	1

Comme pour les dosages, la coloration est appréciée dans les mêmes conditions par la lecture des densités optiques correspondantes.

Pour chaque série de dosages nous avons utilisé le sérum de contrôle Lyotro P[®], qui pour les phospholipides totaux est titré à $1,22 \pm 0,09$ gl.

II - 7 - 2 - Dosage des classes de phospholipides.

Chaque tâche révélée par l'iode sur la plaque de CCM correspondant à une classe donnée de phospholipide, est grattée à l'aide d'une spatule en fer, transvasée dans un tube à essai et traitée dans les mêmes conditions que pour les culots globulaires pour la minéralisation. Les zones de la plaque ne montrant aucune tâche à l'iode, mais correspondant à un standard donné (lysophosphatidyl choline) sont également grattées et traitées de façon identique.

III - Exploration des résultats

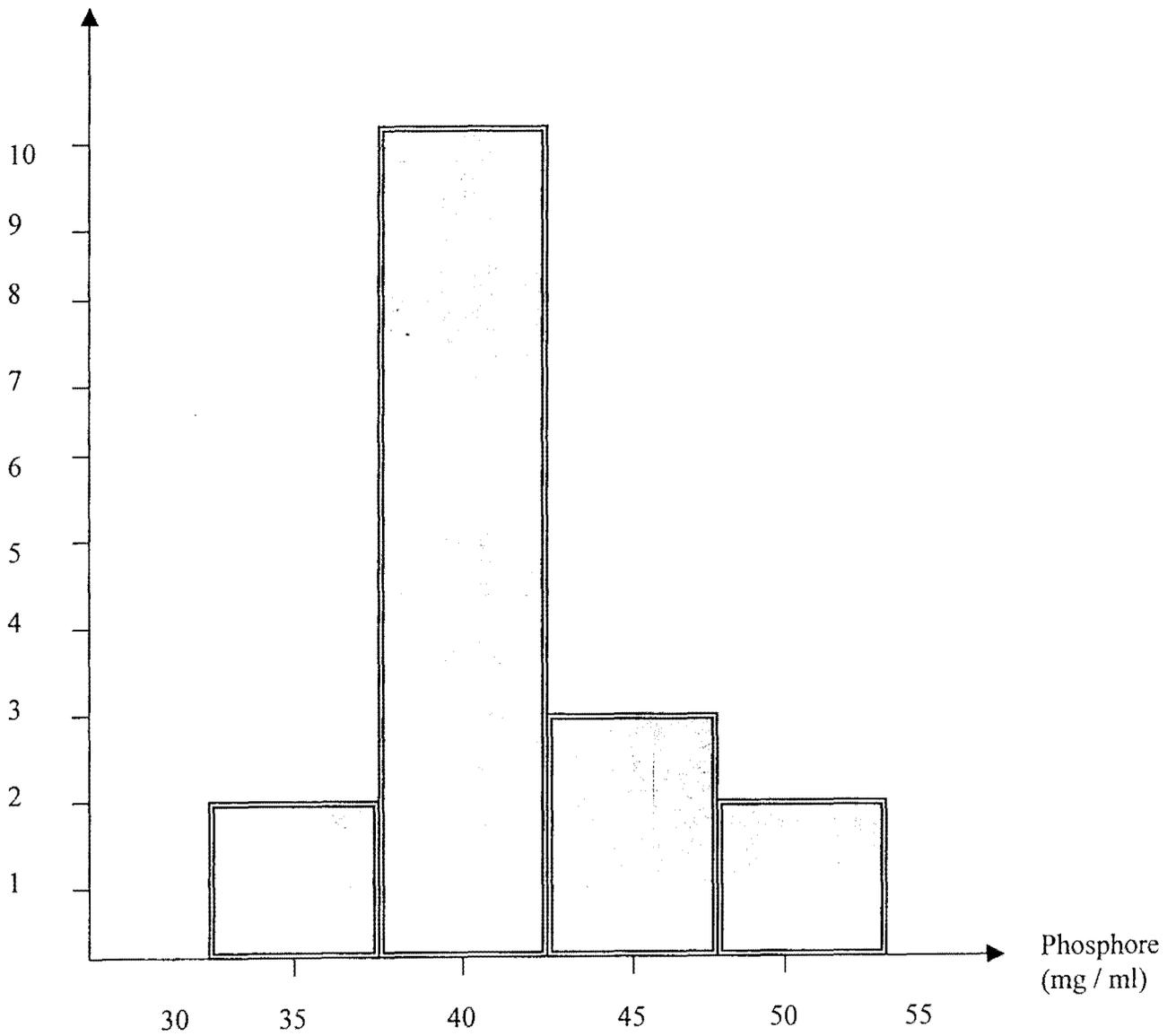
En ce qui concerne les tracés électrophorétiques, les résultats sont analysés en fonction de la migration propre relative des différentes catégories d'hémoglobine, notamment l'hémoglobine A1, l'hémoglobine A2, l'hémoglobine F, de l'hémoglobine S et de l'hémoglobine C. Ces résultats sont utilisés uniquement pour classer nos sujets en deux groupes principaux : celui des sujets dits « normaux » ayant un tracé AA, et celui des sujets drépanocytaires ayant un tracé AS.

Les différentes classes de phospholipides ont été également qualitativement identifiées grâce à des standards par comparaison directe des chromatogrammes effectués dans les mêmes conditions (Rf).

Les histogrammes de fréquence établis pour les phospholipides totaux et les différentes classes de phospholipides font ressortir une distribution gaussienne de nos populations par rapport aux taux des phospholipides membranaires. Nous avons donc utilisé une méthode paramétrique, notamment le test de Student, pour l'exploitation statistique de nos résultats (24). Nous avons estimé les différences observées comme significatives si $p \leq 0,05$, et non significatives dans les autres cas.

Figure 3 : Histogramme de fréquence du phosphore minéral.

Nombre de
sujets



RESULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

Nous avons pu identifier cinq classes de phospholipides résumées dans le tableau II :

Tableau II : Identification des phospholipides.

	PC	LPC	PE	LPE	SM
Sujets AA	+	-	+	+	+
Sujets AS	+	-	+	+	+

On constate que toutes les classes correspondant à nos standards sont représentées aussi bien chez les malades que chez les témoins, en dehors des lysophosphatidyl cholines. L'absence de standards pour phosphatidyl inositol, phosphatidyl sérine et acide phosphatidique nous a empêché d'interpréter l'absence de tâche correspondante à ces dernières classes de phospholipides.

Dans le tableau III, nous avons regroupé les quantités absolues des Phospholipides totaux et des différentes classes dosées par méthode minérale. Cette méthode plus astreignante a été retenue du fait des insuffisances majeures que recèlent la méthode enzymatique et la méthode au naphthol blue black.

En effet, dans la méthode enzymatique, seuls les phospholipides choliniques et leurs dérivés lyso sont pris en compte. De même la méthode au naphthol blue black présente l'insuffisance de ne pas prendre en compte les dérivés lyso du fait de l'absence des doubles liaisons habituellement présentes dans les acides gras insaturés (acide linoléique ou arachidonique) du phospholipide.

Pour l'exactitude de notre méthode de dosage des phospholipides totaux et des fractions, notre sérum de contrôle Lyotrol P[®] sort une valeur acceptable à 1,6 g/l. Ce taux légèrement supérieur aux valeurs du fabricant s'explique par le fait que nous avons dosé le phosphore organique contenu dans les phospholipides, mais également le phosphore minéral contenu dans le sérum de contrôle.

Les dosages inter-séries que nous avons effectués pour les phospholipides totaux et les différentes fractions pour apprécier la reproductibilité, donne un coefficient de variation de 17 % en moyenne. Cela nous a permis dans nos déterminations effectuées en double, de recommencer ou d'éliminer les couples de dosage dans lesquels on observe une différence supérieure à 17 %.

Nos résultats (en ce qui concerne les sujets sains AA) comparés à ceux d'autres auteurs (Florkin) ne sont pas parfaitement superposables, la différence

des méthodologies d'étude (extraction, dosage etc...) explique en grande partie cela. Les phospholipides totaux donnent des valeurs légèrement supérieures chez les drépanocytaires (tableau III), mais la différence observée n'est pas significative ($p = 0,11$).

Tableau III : Phospholipides en mg / ml de culot globulaire.

	PLT	PC	PE	SM	LPC	LPE
Sujets AA	4,15	0,54	0,41	0,45	0,35	0,38
Sujets AS	4,42	0,34	0,54	0,87	0,72	0,46

Nos résultats en ce qui concerne les pourcentages des classes de phospholipides, sont superposables à ceux trouvés par Florkin (14) en ce qui concerne les céphalines et l'ensemble sphingomyéline-lysophosphatides ; mais sont nettement différentes en ce qui concerne les lécithines : tableau (IV). Cette comparaison est purement indicative dans la mesure où Florkin ne décrit pas ses conditions de travail (sélection des sujets, méthodes d'extraction, méthodes de dosage etc...).

Tableau IV : Pourcentages de classes de phospholipides.

	PC (%)	LPC (%)	PE (%)	LPE (%)	M (%)
Sujets AA	13,01	9,80	10,92	8,51	9,16
Sujets AS	7,64	12,16	19,65	16,26	10,46

Tableau V : Pourcentages de classes de phospholipides selon Florkin (14).

	PC (%)	SM+LPC+LPE (%)	PE (%)
Homme	39	37	24

La comparaison de la somme des différentes classes de phospholipides par rapport aux phospholipides totaux, nous permet d'apprécier le rendement de notre méthode qui est en moyenne de 58,79 % (tableau VI). Ce rendement moyen peut s'expliquer par le fait que nous n'avons pas pu identifier et doser certaines classes de phospholipides, en plus le taux des phospholipides totaux est majoré par le dosage simultané du phosphore inorganique présent dans les culots globulaires.

Tableau VI : Rendement de la méthode
(PLT et fraction en mg/ml de culot).

	PLT	PC+PE+SM+LPC+LPE	RENDEMENT
Sujets AA	4,15	2,13	51,40 %
Sujets AS	4,42	2,93	66,18 %

Si l'on considère ces différentes classes, on ne note aucune différence significative entre malades et témoins en ce qui concerne phosphatidyl éthanolamine et lysophosphatidyl éthanolamine (respectivement $p = 0,32$ et $p = 0,42$).

Par contre on observe entre témoins et malades une différence significative en ce qui concerne PC, LPC et SM avec respectivement $p = 0,005$, $p = 0,0001$ et $p = 0,002$.

Le rôle de l'augmentation de la SM n'est pas clairement déterminé, alors que les lysolécithines sont reconnues pour leur propriété hémolytante. Par ailleurs Florkin (14) a montré qu'il existe une relation entre la concentration en lécithines et le temps d'hémolyse : phénomène s'expliquant selon lui par le changement de certains caractères de perméabilité. L'hyperhémolyse observée dans la drépanocytose ne serait donc pas uniquement mécanique, mais pourrait également s'expliquer par l'accumulation des dérivés lyso.

CONCLUSION GENERALE

En commençant ce travail, nous nous étions fixé comme objectif général, d'apporter notre contribution à l'étude des aspects biologiques moléculaires de la drépanocytose.

Nous nous sommes donc intéressé aux phospholipides membranaires érythrocytaires de ce type de malades, dont l'une des caractéristiques essentielles est l'hyperhémolyse et toutes ses conséquences hémodynamiques et surtout cliniques.

Les phospholipides constituent en effet les éléments structuraux fondamentaux des membranes érythrocytaires, et toute perturbation quantitative et/ou qualitative pourrait être un élément aggravant ou favorisant de l'hémolyse pathologique observée dans la drépanocytose.

Nous avons pu identifier grâce à des standards d'excellente qualité (98 à 99 % de pureté) cinq classes de phospholipides : phosphatidyl choline, phosphatidyl éthanolamine, sphingomyéline, lysophosphatidyl choline et lysophosphatidyl éthanolamine.

Après dosage par méthode minérale chez les drépanocytaires AS, nous constatons que les quantités de phospholipides totaux sont superposables à celles mesurées chez le sujet sain AA. Par contre les dérivés lysophosphatidyl cholines connus pour leur capacités hémolysantes sont nettement augmentés chez les drépanocytaires AS.

Au total sur les 123 sujets drépanocytaires que nous avons eu à étudier, 114 étaient hétérozygotes AS, 5 homozygotes SS et 4 doubles hétérozygote SC. Finalement nous n'avons pu étudier que les hétérozygotes AS, pour les homozygotes et les doubles hétérozygotes les prélèvements étaient insuffisants ; l'âge (en moyenne 2 ans) et l'état clinique peu favorable (anémie très sévère) nous ont empêché de procéder à de nouvelles ponctions chez ces petits enfants.

Il apparaît globalement dans notre étude, que les phospholipides membranaires érythrocytaires du drépanocytaires présentent des anomalies significatives. Depuis 1972, des molécules naturelles ou synthétiques à propriété lipophile sont utilisées pour limiter la falciformation, et par conséquence l'hyperhémolyse (3, 17, 23). Ces molécules, essentiellement représentées par certaines hormones stéroïdes, certains neuroleptiques et certains anesthésiques locaux, auraient un rôle « stabilisant » et agiraient en s'intégrant dans la bicouche lipidique et en modifiant la perméabilité aux ions de la membrane.

Le site le plus sensible des membranes érythrocytaires se situe au niveau des acides gras poly-insaturés de leurs phospholipides constitutifs, essentiels à la stabilité de la membrane. Les lysophospholipides dont les taux sont nettement élevés dans la drépanocytose, et qui sont la conséquence de la destruction ou de l'élimination de ces acides gras, sont au moins en partie responsables des

phénomènes de falciformation et d'hyperthéomolyse observés dans la drépanocytose.

Il serait utile que cette étude soit continuée et les identifications et dosages de toutes les classes de phospholipides faits chez les homozygotes, pour une triple comparaison entre témoins AA, hétérozygote AS et homozygote SS.

Pour faire d'éventuelles projections thérapeutiques, il nous semblerait intéressant de compléter ce travail pour :

- confirmer ces résultats
- identifier les causes de formation des dérivés lyso : par certains toxiques qui détruiraient l'acide gras en position 2 des phospholipides, par la phospholipase A2 qui libère cet acide gras, par la lécithine cholestérol acyltransférase [LCAT] qui transfère l'acide gras au cholestérol pour l'estérifier, ou par d'autres mécanismes ?
- expérimenter, voire proposer des produits naturels ou synthétiques, en relation avec les causes indentifiées, qui pourront nous permettre sinon d'éliminer, tout au moins d'atténuer la falciformation et l'hyperhémolyse propres à la crise drépanocytaire pour le mieux être des sujets atteints.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ANSELL G. B.

Phospholipids chemistry. Metabolism and function.
Publ. Co, B.B.A. library, vol. 3, 1964.

2 - ARBUS L.

Contribution à l'étude des phospholipides de l'encéphale.
Thèse Méd., Toulouse 1964, n°24.

3 - BAKO R.

Etude in vitro de l'action de Fagara xanthoxyloïdes (Lam) sur les érythrocytes drépanocytaires.
Thèse Pharm., Dakar 1987, n°70.

4 - BEGUE P.

La maladie drépanocytaire.
Sandoz Editions, Paris 1984.

5 - BLAVY G.

Lipides et protéines sériques du drépanocytaire sénégalais.
CES Biochimie dynamique, Toulouse 1976.

6 - COOPER R.A.

Lipoproteins, bile acids and red cells membranes in liver disease.
U.S. Public Health Service development.
Award, 5K4, AM 38, 1972.

7 - COOPER R.A. and JANDL J.H.

Lipids of human red cell normal composition and variability in disease.
Semin. Hematol., 7, 1970.

8 - COOPER R.A. and SHATTIL S.J.

Factors influencing the lipid composition and fluidity of red blood cell membranes in vitro.
Cell Membrane Lipid Composition, 17 (2), 1978, 327-331.

9 - **COOPER R.A and SHATTIL S.J.**

Mechanisms of hemolysis, the minimal red cell defect.
N. Engl. J. Med., 285 (27), 1971, 1514-1520.

10 - **COOPER R.A. and SHATTIL S.J.**

The red cell membrane in hemolytic anemia.
Mod. Treat., 8 (2), 1971, 329-351.

11 - **DEVAUX G.**

Choix de Techniques de Biochimie Clinique
Gauthier – Villars Editeur, Paris 1974.

12 - **DODGE J.T., PHLLPS G.B.**

Composition of phospholipids and phospholipid fatty acids aldehydes in human red cells.
J. Lip. Res., 8, 1977.

13 - **FOLCH J., LEES M., SLOANE STANLEY G.H.**

A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues.
J. Biol. Chem., 226, 1957, 497-509.

14 - **FLORKIN M., SHOFFENIELS E.**

Biochimie et biologie moléculaire.
Desoer Editions, Liège 1967.

15 - **GRANNER D.K. et Coll.**

Harper, Précis de Biochimie.
Editions Eska, 7, Québec/Paris 1989.

16 - **HAEST C. W., PLASA G., DEUTICKE B.**

Selective removal of lipids from the outer membrane layer of human erythrocyte without hemolysis. Consequence for bilayer stability and cell shape.
Biochim. Biophys. Acta, 649 (3), 1981, 701-708.

17 - **ISAACS W.A., EFFIONG C.E., AYENI O.**

Steroid treatment in the prevention of painful episodes in sickle cell disease.
Lancet, 1, 1972, 570-571.

18 - **JENNY VAYSSE, PAUL PILARDEAU, MICHEL GARNIER**

Rapid quantitative analysis of phospholipids in biological fluids after thin-layer chromatography.
Clin. Chim. Acta, 147, 1985, 183-190.

19 - **MEGUMI SAITO, YASUKAZU TANAKA and SUSUMU ANDO**

Thin-Layer Chromatography-Densitometry of Minor Acidic Phospholipids :
Application to Lipids from Erythrocytes, Liver and Kidney.
Analytical Biochemistry, 132, 1983, 376-383.

20 - **POLONOVSKY M.**

Biochimie Médicale.
Masson et Cie, Editeurs, 8, Paris 1971.

21 - **RANDERATH K.**

Chromatographie sur couche mince.
Gauthier-Villars Edit., 2, Orléans 1971.

22 - **RAWN J.D.**

Biochimie.
Editions universitaires, Tournai (Belgique) 1990.

23 - **SHEETZ M. P., SINGER S. J.**

Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions.
Proc. Natl. Acad. Sci., 71, 1974, 4457-4461.

24 - **SCHWARTZ D.**

Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes
Flammarion Médecine-Sciences, Paris 1963.

25 - SCHWOCH G. and PASSOW H.

Preparation and properties of erythrocytes ghosts.
Molec. Cell. Biochem., 2, 1973A, 197-218.

26 - TAKAYAMA M. et Coll.

A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids.
Clin. Chim. Acta, 79, 1977, 93-98.

27 - WIBERG K.B.

Techniques de laboratoire en chimie organique.
Dunod Edit., Paris 1963.

VU
LE PRSIDENT DE JURY

VU
LE DOYEN

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
LE RECTEUR DE L'UNIVERSITE DE
DAKAR