

**Université Badji Mokhtar Annaba
Faculté de Médecine
Département de Pharmacie**

Biochimie de l'hémolyse

**4^{ème} année pharmacie
2019/2020
Dr M. DJEDDI**

Objectifs du cours :

- 1- Définir l'hémolyse physiologique et pathologique
- 2- Connaitre les examens d'exploration biochimique de l'hémolyse

Plan du cours

Introduction

I. Rappel physiologique

II. Hémolyse physiologique

III. Hémolyse pathologique

IV. Conséquences de l'hémolyse pathologique

- 1. Conséquences cliniques
- 2. Conséquences biologiques

V. Exploration de l'hémolyse

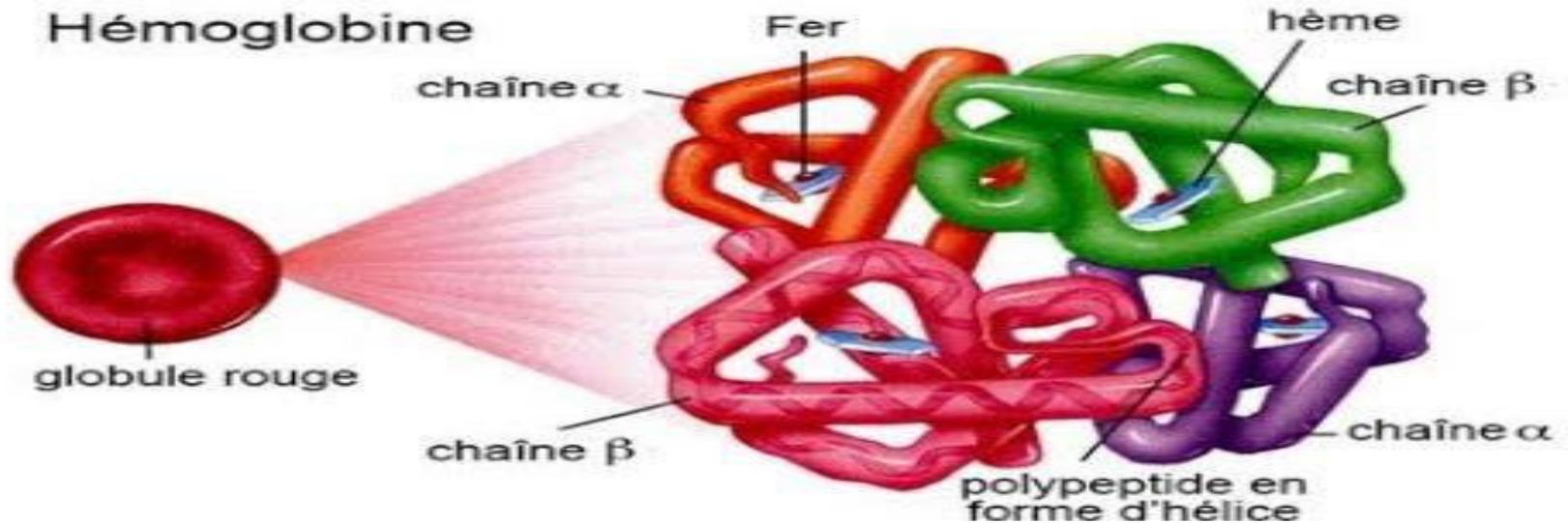
Conclusion

INTRODUCTION

Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer le vieillissement et l'hémolyse des GR après environ 120 jours :

- **une diminution progressive de l'activité des enzymes érythrocytaires sans renouvellement**, diminue la protection de la membrane et l'Hb contre l'oxydation de manière irréversible. La présence d'Hb oxydée (corps de Heinz) faciliterait leur phagocytose par les macrophages de la rate.
- **Modification des flux ioniques**, avec augmentation du Ca^{++} et diminution du potassium intracellulaire, induisant une déshydratation et une **diminution de la déformabilité** (diminution de l'activité des canaux calciques).
- **Diminution de la charge négative de la membrane**, par perte progressive d'acide sialique sur la partie externe des glycoprotéines membranaires, facilitant la phagocytose par les macrophages.
- **Hypothèse immunologique**. Présence de faibles quantités d'Ac anti protéine bande 3 et anti glycolipides, se fixant préférentiellement sur les GR âgés, facilitant leur phagocytose par les macrophages.

I. RAPPEL PHYSIOLOGIQUE



Le globule rouge

- Structure
- Métabolisme

L'hémoglobine

- Structure
- synthèse

Le globule rouge

1- STRUCTURE

Cellule anucléée, en forme de disque biconcave de 7,5 μm de diamètre, de durée de vie limitée à 120 j.

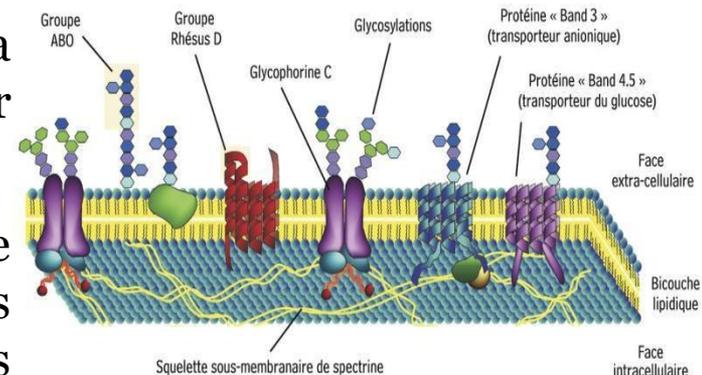
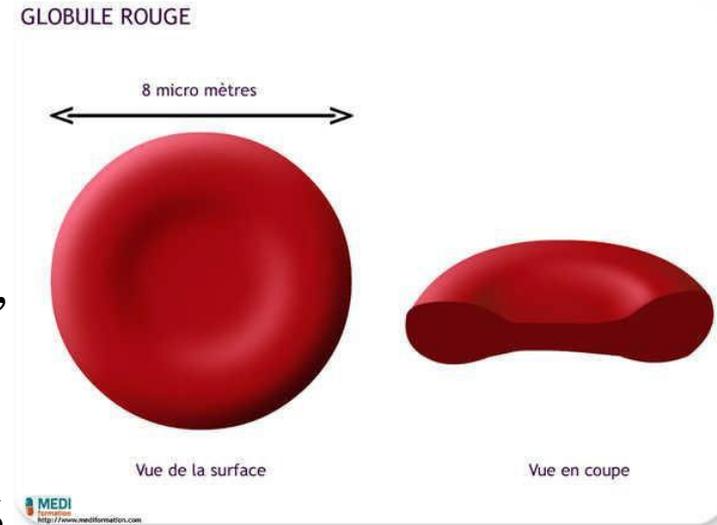
•contenu : eau 70%, Hémoglobine 25%, protéines, enzymes (LDH, ions (K^+))

•Membrane érythrocytaire :

Bicouche lipidique constituée de 40 % de Lipides (70% phospholipides) , 52% de Protéines et 8% de Glucides.

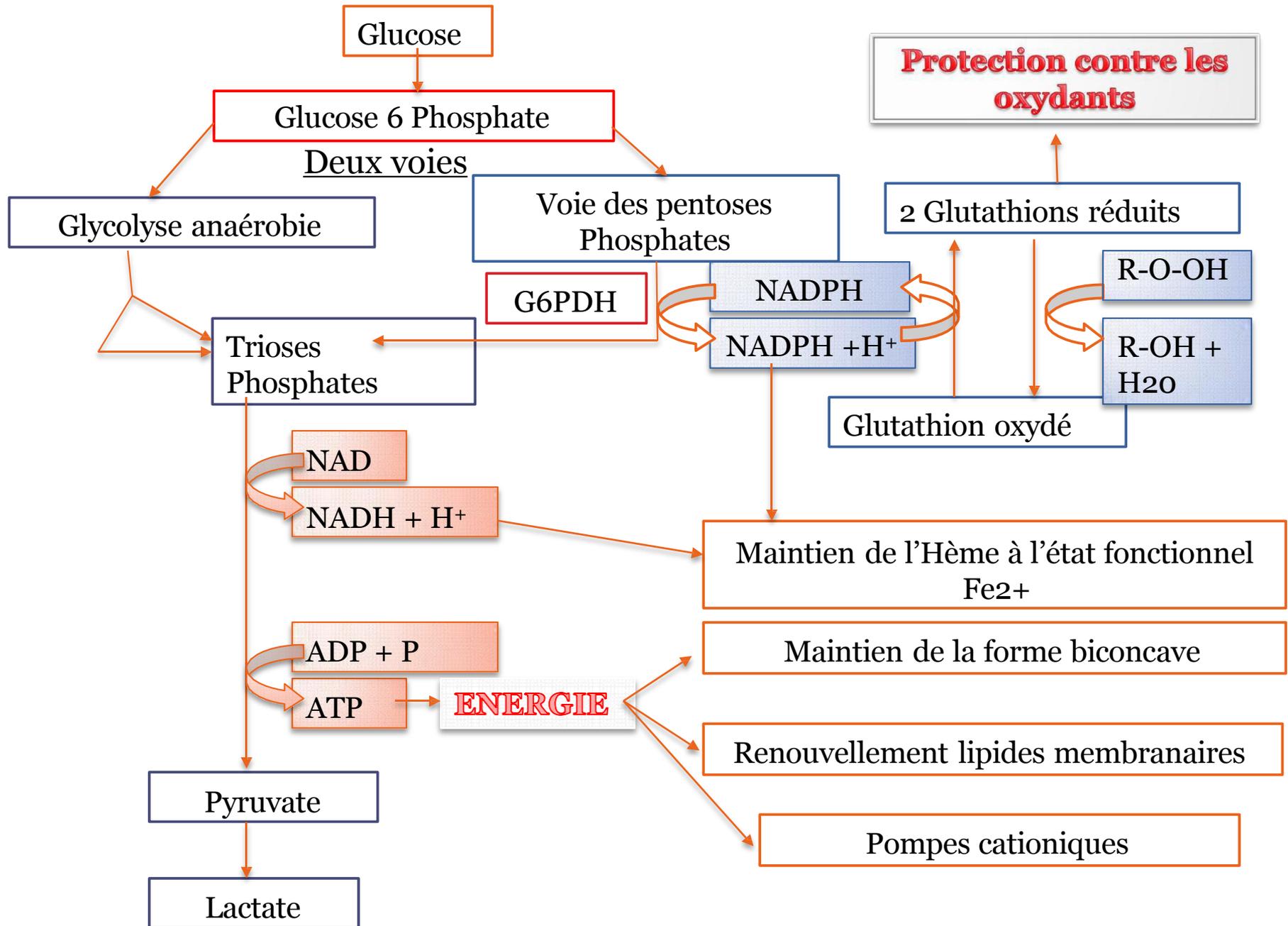
-**Protéines extrinsèques** sur la face interne → essentielle dans le maintien de la forme et la déformabilité (plasticité), ce qui permet leur passage a travers des capillaires de petit diamètre.

-**Protéines transmembranaires** sur la face externe →support d'Ag polysaccharidiques des groupes sanguins et échanges transmembranaires (transporteurs).



2. Métabolisme

Métabolisme du Glucose érythrocytaire



2. Métabolisme

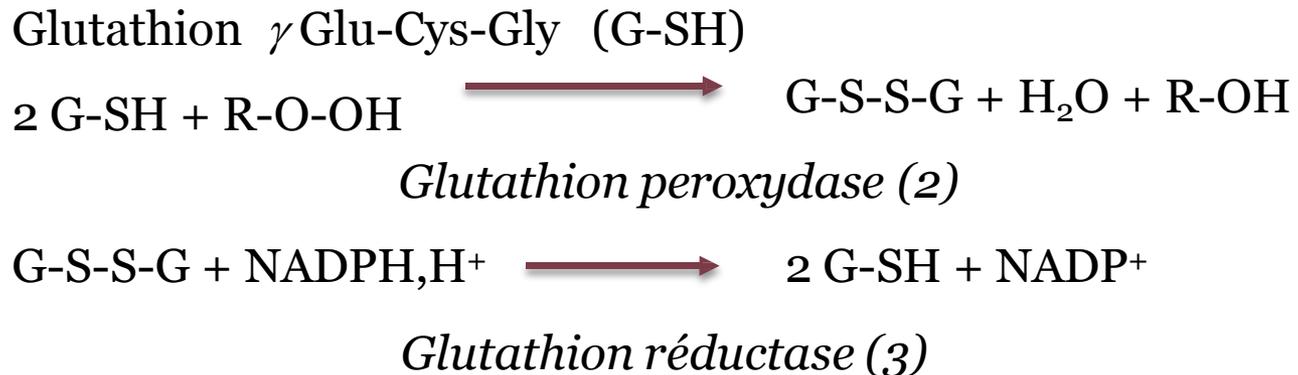
La membrane et l'Hb du GR doit être maintenue en bon état de fonctionnement ce qui nécessite des molécules, puisées du métabolisme du GR :

1. **ATP**: pompes ATPases, renouvellement lipides mb

2. **NADH**: coenzyme de Methémoglobine réductase



3. **NADPH**: coenzyme de glutathion réductase, régénération du



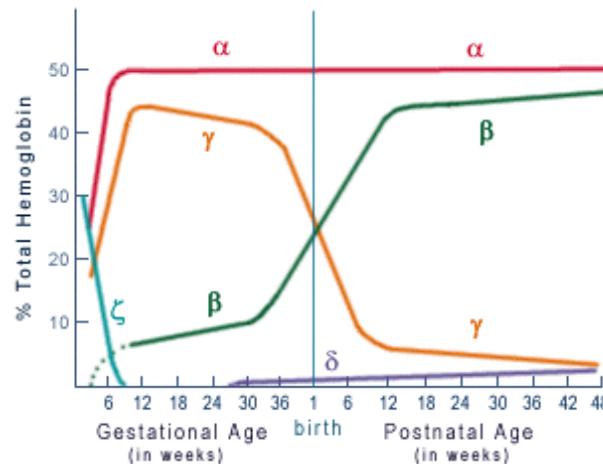
4. **2,3 DiPhosphoGlycérate** : effecteur allostérique de Hb, qui diminue son affinité pour O₂

L'hémoglobine

Structure: chromoprotéine porphyrinique, 4 sous-unités identiques 2 à 2

1 sous-unité : Une chaîne protéique de globine + un groupement Hème contenant un atome de Fe^{2+}

la globine : la composition de chaque hémoglobine est variable mais toujours 2 chaînes α (α , ou embryonnaire ζ) et 2 chaînes non α (β , δ , ε , γ)

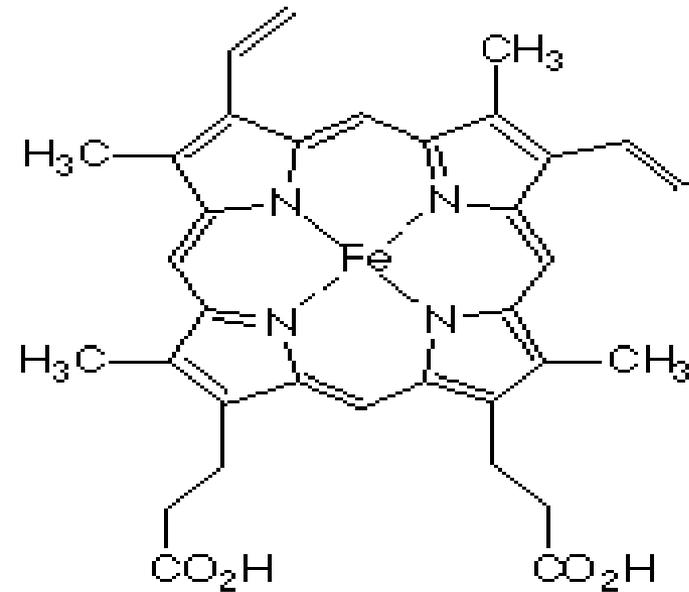


synthèse classique des protéines

- chaînes α 141 aa, gènes α situés sur chr 16
- chaînes non α 146 aa, gènes non α situés sur chr 11

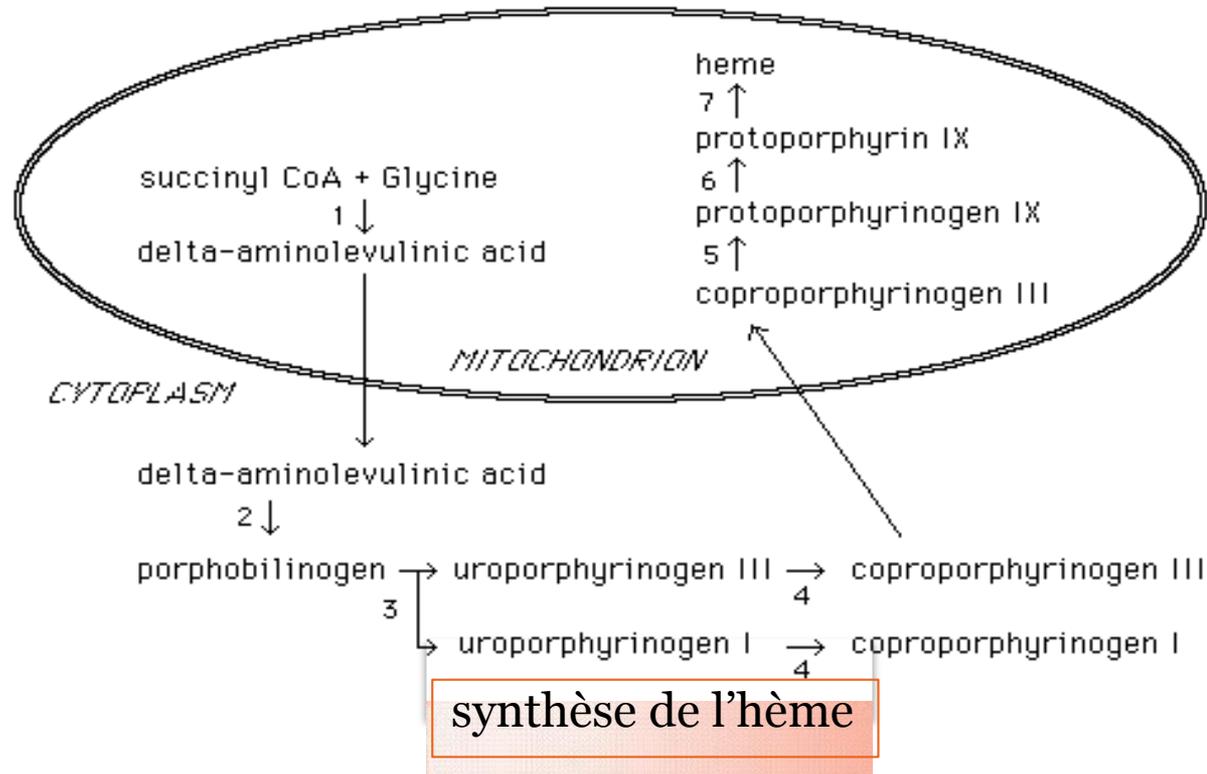
L'hémoglobine

l'hème : • les érythroblastes synthétisent un noyau porphyrinique tétrapyrrolique appelé protoporphyrine, avant d'y insérer le fer (synthèse de l'hème)



Heme

structure de l'hème



synthèse de l'hème

- la synthèse de l'hème est **mitochondriale** et **cytoplasmique**
- les précurseurs sont **la glycine** et le **succinyl-CoA**
- la régulation principale se situe sur l' **ALA synthétase**
- le **fer** est incorporé à la dernière étape par l'**hème synthétase**

II. HÉMOLYSE PHYSIOLOGIQUE

Définition

- L'hémolyse est le phénomène **irréversible** par lequel les globules rouges sont détruits et **libèrent leur contenu**.
- la destruction du GR se fait après **une vie de 120 j** (90j pour le nouveau-né), elle est compensée immédiatement par la Moelle Osseuse, sans répercussion clinique ni biologique.
- Cette hémolyse physiologique est essentiellement **intra-tissulaire**.

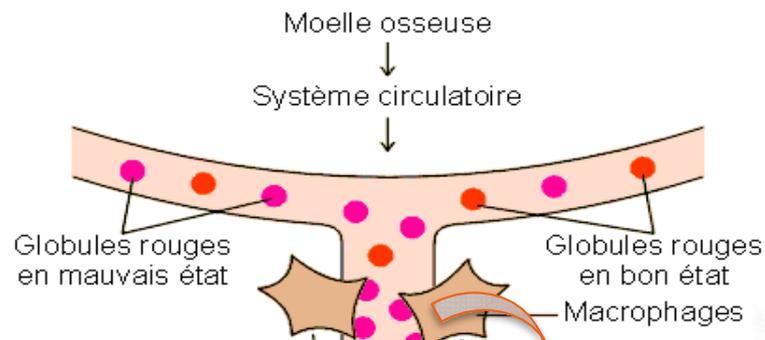
Hémolyse intra-tissulaire

Prépondérante à l'état normal (90%)

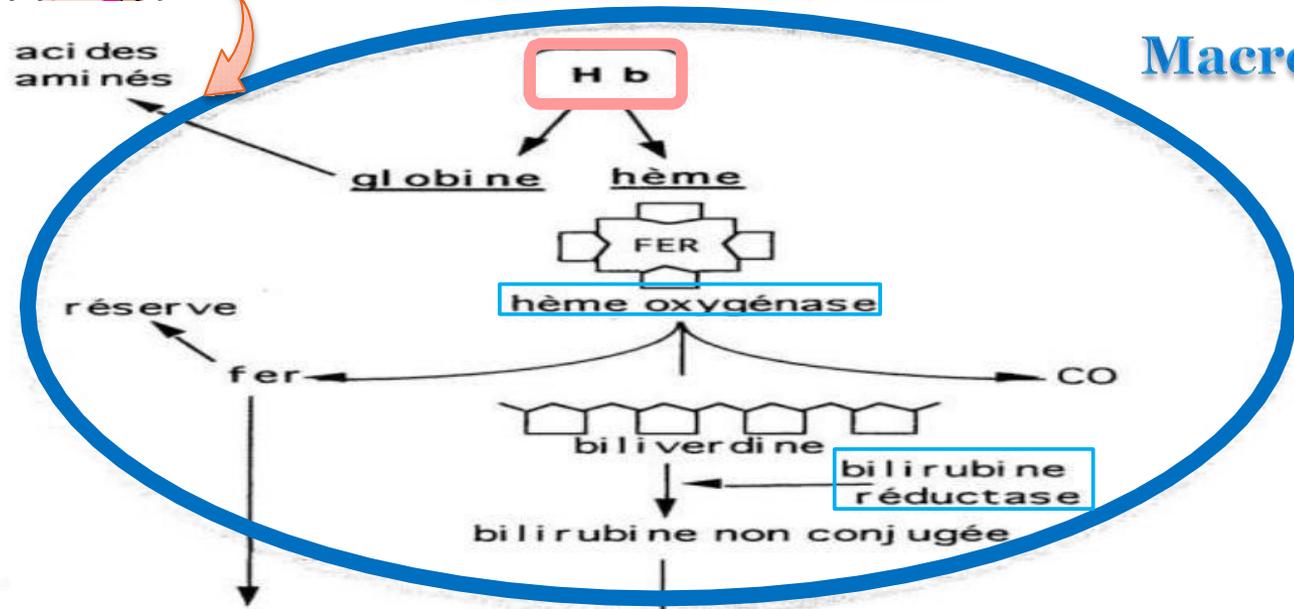
- elle est assurée par les macrophages de la moelle osseuse, de la rate et du foie.
- Cette phagocytose porte sur des globules rouges dont le vieillissement s'est traduit par :
 - Modifications biochimiques : diminution du contenu enzymatique
 - Modifications morphologiques : tendance à la sphérocytose
 - Modifications de la plasticité: diminution de la déformabilité

Une suite de réactions va dissocier l'Hb en globine et en hème :

- **La globine est dégradée** (catabolisme des protéines)
- **le fer de l'hème est recyclé dans l'érythropoïèse** ou stocké dans les macrophages,
- **l'hème est dégradé** par l'hème oxydase **pour produire** la biliverdine (structure tétrapyrrolique encore fermée) puis **la bilirubine**(ouverture de l'anneau tétrapyrrolique et formation d'une structure linéaire).
- **La bilirubine est** d'abord « **libre** » : soluble dans les graisses mais insoluble dans l'eau, elle est libérée hors des macrophages et véhiculée dans le plasma par l'albumine, qui la transporte jusqu'aux hépatocytes
- **la bilirubine est glycuconjuguée dans les hépatocytes** (molécule de glycuronide), et devient soluble
- **la bilirubine est ensuite excrétée par la bile** dans le duodénum où elle est transformée en stercobiline (éliminée dans les selles) et en urobilinogène et urobiline dont une partie (15%) est réabsorbée (**cycle entéro-hépatique**) et finalement éliminée dans les urines.



HEMOLYSE INTRATISSULAIRE



fer + transferrine

bilirubine non conjuguée + albumine

Sang

**glycuronyl transferase
 ↓
 bilirubine conjuguée**

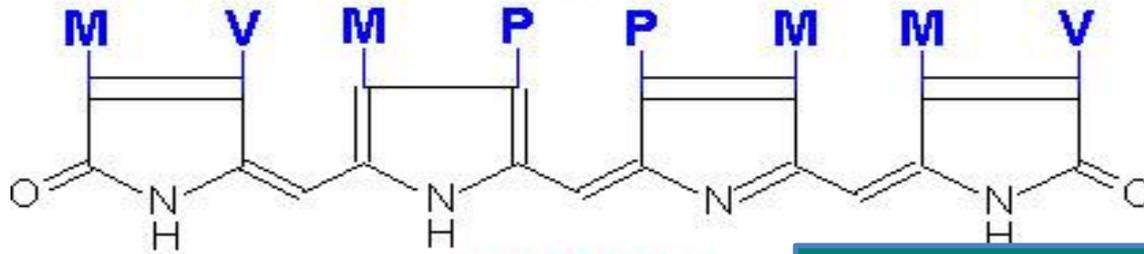
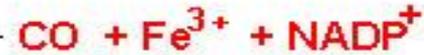
Foie

stercobilinogène fécal

Colon

Heme (Fe²⁺)

heme oxygenase

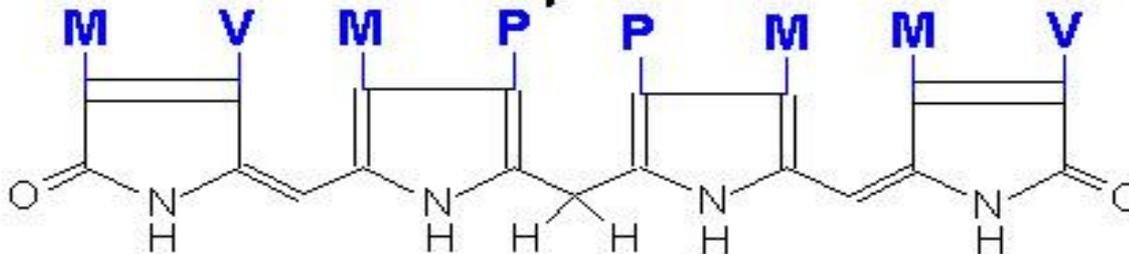


Biliverdin

Bleu/vert

M=methyl,
P=propionic
V=vinyl

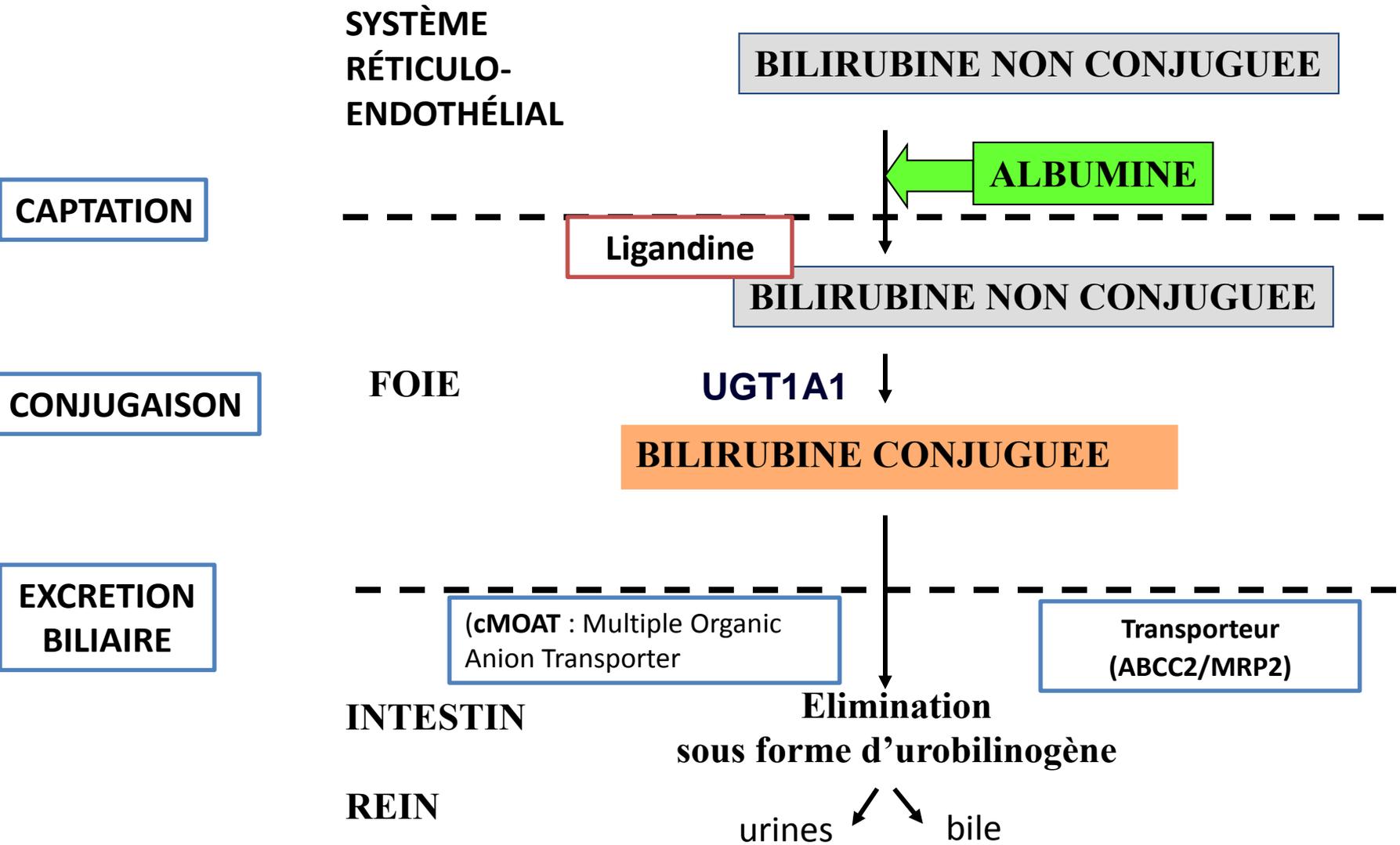
biliverdin reductase



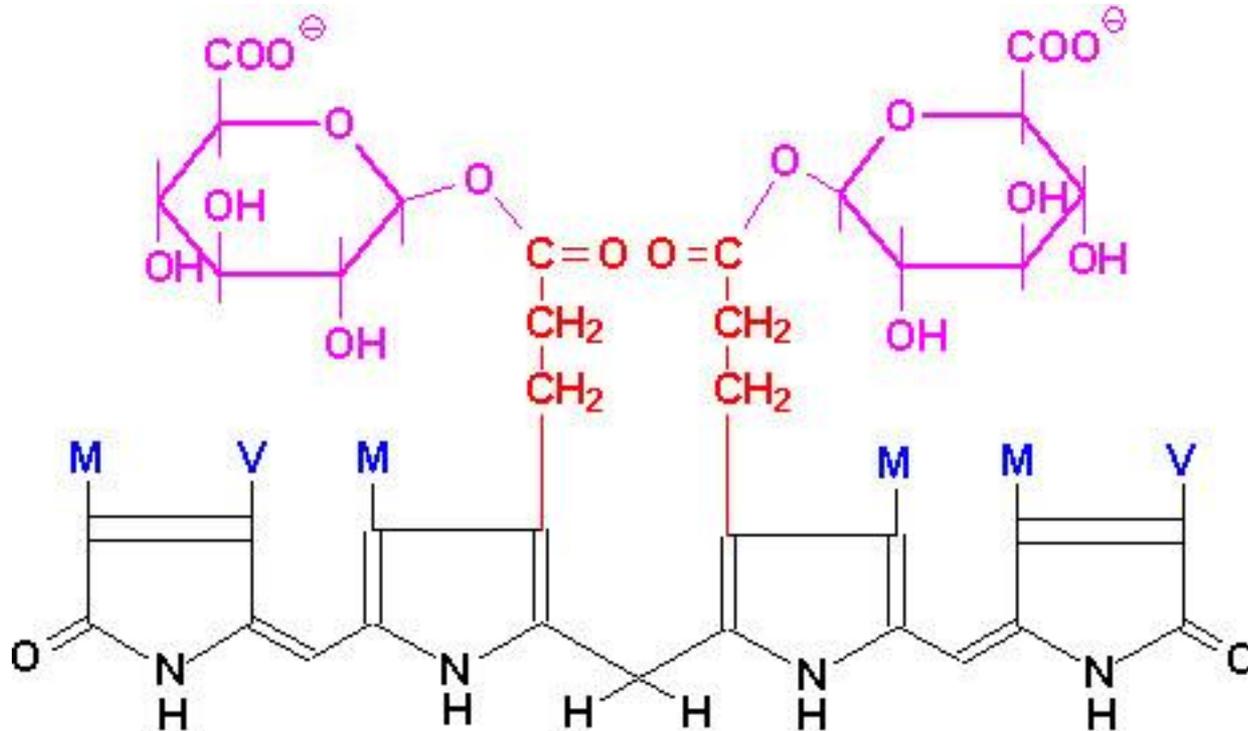
Bilirubin

Jaune/orange

Transport plasmatique et métabolisme de la bilirubine



CONJUGAISON HEPATIQUE DE LA BILIRUBINE: UGT1A1



Dans les hépatocytes, l'enzyme **UDP-glucuronyl transférase (UGT1A1)** présente dans le RE lisse **ajoute 2 groupements d'acide glucuronique** à la bilirubine pour produire les conjugués **diglucuronides** (ou mono-) = **acylglucuronides** plus solubles dans l'eau.

L'augmentation de la solubilité aqueuse du tétrapyrrole facilite son **excrétion biliaire** avec les autres pigments biliaires.

Hémolyse intra-vasculaire

Une faible partie de l'hémolyse physiologique (10%) se déroule au sein même de la circulation sanguine.

- l'hémoglobine est libérée dans le plasma où elle forme un complexe avec **l'haptoglobine** (alpha₂ globuline synthétisée par le foie).
- Ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'hémoglobine est dégradée.
- Si la capacité de fixation de l'haptoglobine est débordée, l'hémoglobine en excès reste libre et traverse le filtre glomérulaire
→ une hémoglobinurie.

III. HÉMOLYSE PATHOLOGIQUE

Définition

- Il s'agit d'une exagération du phénomène physiologique avec raccourcissement de la durée de vie du GR ce qui entraîne une **anémie hémolytique**
- Deux tableaux cliniques différents selon le lieu d'hémolyse
 - Hémolyse chronique → extra-vasculaire
 - Hémolyse aigue → intra-vasculaire (lieu majoritaire)

Devenir des constituants : libération dans la circulation

➤ membrane

☞ *phospholipides intravasculaires*

☞ *CIVD*

➤ cytoplasme

☞ *K⁺ : hyperkaliémie*

☞ *LDH*

➤ Hb : *hémoglobinémie*

☞ *dégradation enzymatique* ne

☞ *bilirubine libre.*

☞ *adsorbée par les protéines sériques haptoglobine =*

☞ *complexe hapto-hémoglobine*

☞ *effondrement de l'hapto libre*

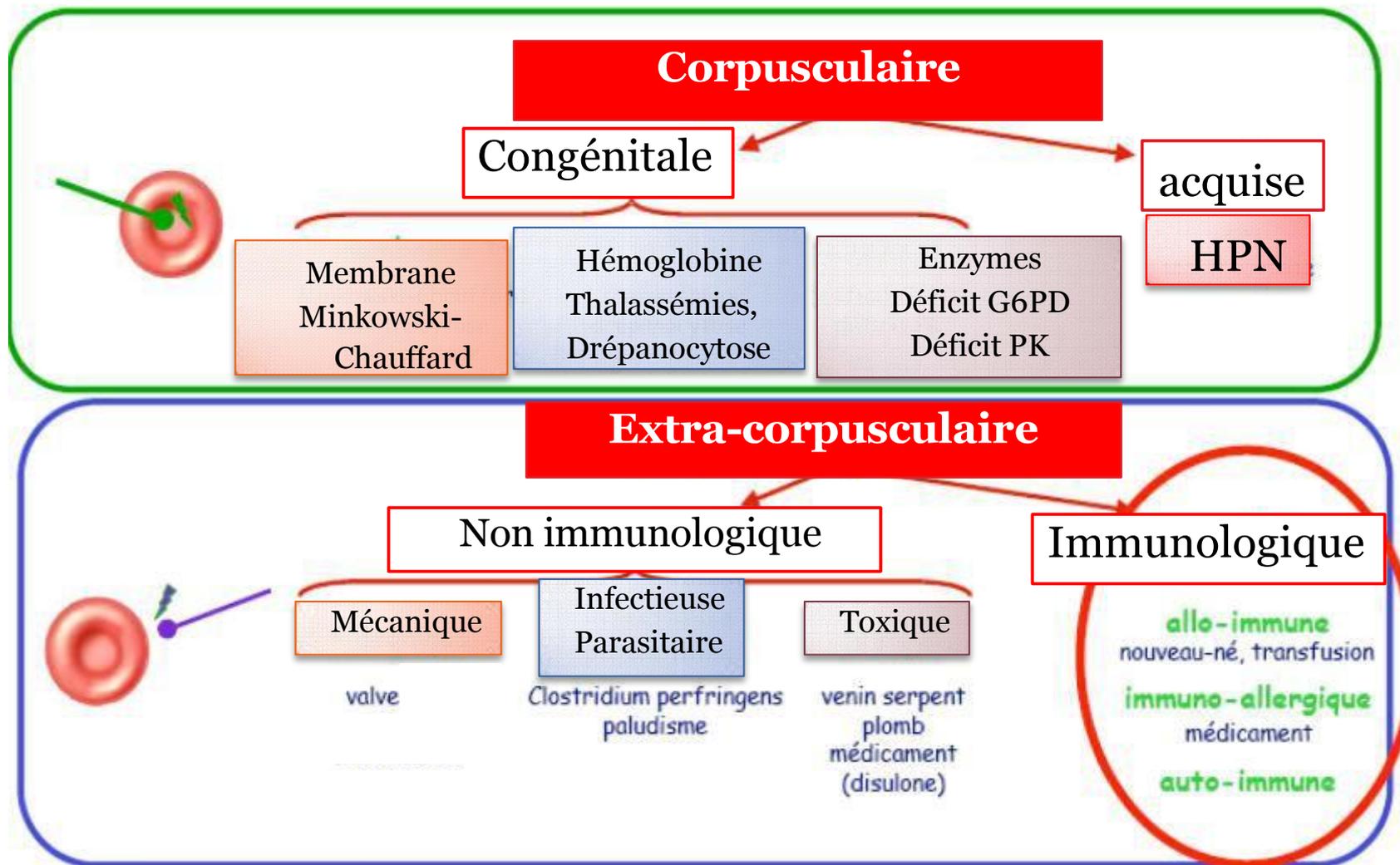
☞ *ultrafiltrée par le glomérule et réabsorbée par le tubule*

☞ *tubulopathie => Insuffisance rénale*

☞ *hemoglobinurie* , ”

(intense et aigue)

Anémie hémolytique



L'hémolyse chronique

Clinique : **triade hémolytique**

- pâleur
- ictère cutanéomuqueux
- splénomégalie (SMG) de taille variable

Biologique :

1. **Signes d'hémolyse:**

- anémie
- Augmentation des produits du catabolisme du GR

↳ *bilirubine libre élevée*

↳ *haptoglobine effondrée*

↳ *augmentation du fer sérique*

↳ *augmentation des LDH*

2. **Signes de régénération médullaire**

- sang : réticulocytose > 120000/mm³
- MO : erythroblastose médullaire > 30%

IV. CONSÉQUENCE DE L'HÉMOLYSE PATHOLOGIQUE

L'hémolyse aiguë

Clinique :

- ☞ choc anurique +++
 - ☞ douleurs lombaires ++
 - ☞ douleurs abdominales aiguës atypiques
- ↳ *sonder le malade*

urgence vitale+++

Biologique :

- ☞ anémie aiguë
- ☞ CIVD, hyperkaliémie, LDH++
- ☞ hémoglobininémie plasmatique ++
- ☞ hémoglobinurie ++

V. EXPLORATION DE L'HÉMOLYSE PATHOLOGIQUE

Paramètres hématologiques

1. Hémogramme :

- l'anémie est inconstante : une hémoglobine normale à l'hémogramme devra faire évoquer une hémolyse compensée par la régénération médullaire,
- habituellement régénérative : N° des réticulocytes élevé

2. **Groupage** : Transfusion urgente (en cas d'hyperhémolyse aigue).

3. **Frottis sanguin** : il révèle une anomalie morphologique des GR

4. **Électrophorèse de l'Hb** : pour confirmer les hémoglobinoses.

5. **Test de coombs** : pour caractériser la nature immunologique ou non de l'hémolyse.

V. EXPLORATION DE L'HÉMOLYSE PATHOLOGIQUE

Paramètres biochimiques basiques

- 1. Taux de bilirubine** : libre augmentée (conjuguée normale)
- 2. haptoglobine sérique** effondrée, valeurs usuelles : 0,16 – 1,8 g/l, elle est dosée par Immunoturbidimétrie.
- 3. LDH sérique** augmentée (parfois 20 fois la normale)
- 4. Potassium sérique K⁺** augmenté
- 5. Fer sérique / CFT** (capacité de fixation de la transferrine); le fer sérique est élevé au cours de l'hyperhémolyse,

Bilirubine

Prélèvement : Sérum ou plasma recueilli sur héparinate de lithium.

Précautions à prendre :

- ✓ Protection des prélèvements à l'abri de **la lumière** (BRB photo-oxydable)
- ✓ Examen d'urgence (néonatalogie)

Méthode de dosage :

- ✓ Dosage par colorimétrie après diazotation
- ✓ Détermination par chromatographie liquide haute pression (HPLC)

AUTRES LIQUIDES BIOLOGIQUES

URINES : sur prélèvement fraîchement émis (<1H) ou + 4°C

- Absence de bilirubine dans les urines normales ; présence de BC possible mais toujours pathologique
- Urobilinurie: 3-16 $\mu\text{mol/L}$ (test peu sensible)

LIQUIDE AMNIOTIQUE

- recherche **d'incompatibilité fœto-maternelle** (groupes sanguins Rhésus)
- Causes d'erreur : attention au méconium, présence de sérum maternel ou fœtal dans la poche amniotique

Principe

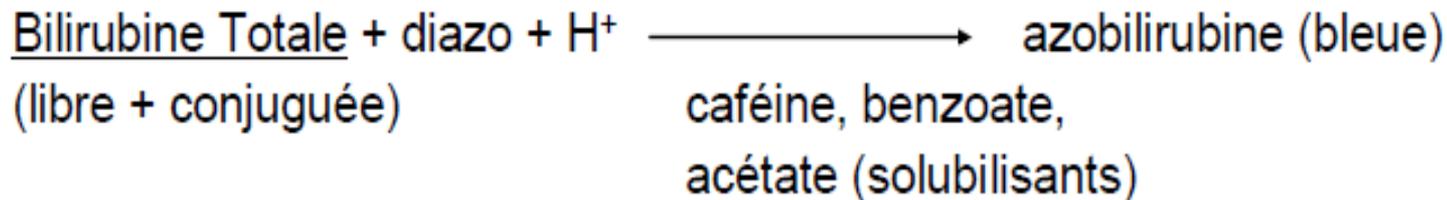
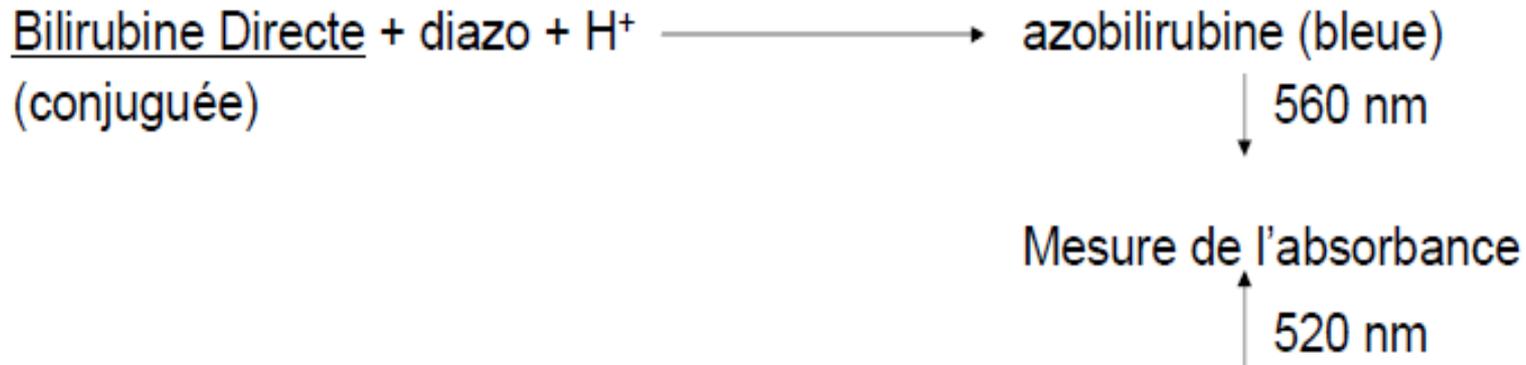
La réaction se fait en deux étapes :

➤ **Préparation du diazoréactif : (Ehrlich , 1884.)**

**Acide sulfanilique + nitrite de sodium →
chlorure de diazonium de l'acide
sulfanilique = diazoréactif**

Principe

➤ Réaction colorée :



Malloy- Evelyn (1937).. Méthanol

Jendrassik et Grof (1938). Caféine

Malloy- Evelyn modifiée (1970). DMSO, Citrémide

Détermination de la BRB sérique par (HPLC)

Méthode de référence

Séparation selon la nature chimique des différentes fractions :

Nature chimique	Séparation chromatographique
Bilirubine non conjuguée	α
Bilirubine monoglucuronide	β
Bilirubine diglucuronide	γ
Bilirubine delta	δ

Valeurs usuelles

Sujet Adulte :

B Total < 17 μ moles / L (< 10 mg / L)
B Direct < 3.4 μ moles / L (< 2 mg / L)

Pédiatrie :

Seuil critique pour bilirubine nouveau-né
< 10 jours: > 250 μ moles / L

Variations pathologiques

↗ BRB libre :

Par destruction exagérée des hématies
Par déficit de la glucurono-conjugaison

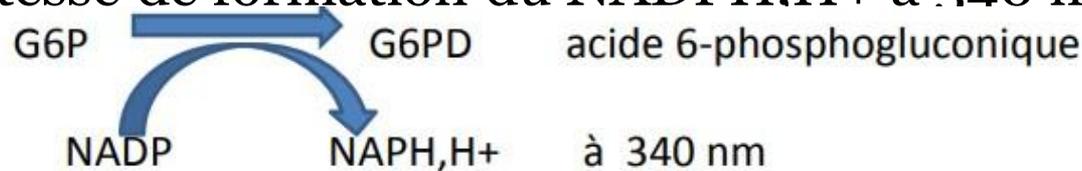
↗ BRB conjuguée :

Maladies congénitales par défaut d'excrétion
Cholestases intra et extra-hépatiques

V. EXPLORATION DE L'HÉMOLYSE PATHOLOGIQUE

en fonction de la situation, on pourra réaliser divers examens très spécialisés, selon l'hypothèse diagnostique évoquée :

1. dosage de l'activité de **la G6PD** effectué sur un hémolysat, on suit la vitesse de formation du NADPH.H⁺ à 340 nm



2. Pyruvate kinase : dosage de l'activité de **la PK** effectué sur un hémolysat on mesure la disparition de NADH,H⁺ à 340 nm.



3. dosage de **l'hémoglobine libre** plasmatique
4. recherche d'une **hémoglobinurie**

CONCLUSION

L'exploration biochimique de l'hémolyse pathologique est indispensable au côté des paramètres hématologiques pour établir le diagnostic étiologique de divers syndromes hémolytiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

