

# BIOLOGIE MÉDICALE

## Marqueurs de la lipoperoxydation (LPO), protéines inflammatoires et tocophérols plasmatiques dans les drépanocytoses homozygote et hétérozygote.

E. D. Sess (1), M. A. Carbonneau (2), M. Meité (4), E. Peuchant (2), M. F. Dumont (2), M. C. Receveur (3), M. J. Thomas (2), A. Perromat (2), A. Sangaré (4), M. Le Bras (3) & M. Clerc (2)

(1) Laboratoire de biochimie médicale, Faculté de médecine-01 B.P V 166 Abidjan 01, République de Côte d'Ivoire

(2) Laboratoire de biochimie médicale A., Université de Bordeaux II, 146, rue Léo Saignat, 33076, Bordeaux Cedex.

(3) Service de médecine tropicale, Hôpital Saint-André, 1, rue Jean Burguet, 33075 Bordeaux Cedex

(4) Service d'hématologie-immunologie, CHU de Yopougon, Abidjan, République de Côte d'Ivoire

Manuscrit n°1495. "Biologie médicale". Accepté le 20 mars 1998.

**Summary:** Lipoperoxydation Markers, Inflammatory Reaction Proteins and Sera Tocopherol in Sickle Homozygous and Heterozygous Disease.

Lipoperoxydation final products represented by the TBARS (substances reacting with the Thiobarbituric acid), inflammatory reaction proteins and sera tocopherol have been studied in homozygous forms as well as in heterozygous forms of sickle cell diseases. The significant increase of TBARS ( $P < 0,001$ ) measured by spectrofluorimetry, the considerable decrease of the sera alpha gamma tocopherol, measured by CLHP ( $P < 0,005$ ) in all sickle cell patients, especially in crisis homozygous form, reinforce our previous study (22, 23, 24). The absence of links between the TBARS and the tocopherols (fig.1) suggests that other defence mechanisms occur without vitamin E. The collapse of haptoglobinemia in homozygous sickle cell patients associated with the fall of hemoglobinemia indicates a severe tissue and intravascular hemolysis as a consequence of LPO. Furthermore, the simultaneous decrease of cholesterolemia seems to indicate important lipoperoxyd activity detected in sickle cell patients.

**Résumé :**

Les produits terminaux de la lipoperoxydation (LPO) représentés par les TBARS (substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique), les protéines de la réaction inflammatoire et les tocophérols sériques ont été étudiés aussi bien dans les formes homozygotes que dans les formes hétérozygotes de la drépanocytose. L'augmentation significative des TBARS ( $P < 0,001$ ) mesurés par spectrofluorimétrie, la baisse importante de l'alpha-tocophérol et du gamma-tocophérol sériques ( $P < 0,005$ ), mesurés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) chez tous les drépanocytaires, notamment dans la forme homozygote en situation de crise, conforte notre précédente étude (22, 23, 24).

L'absence de corrélation entre les TBARS et les tocophérols (fig.1) suggère qu'en dehors de la vitamine E, interviennent d'autres mécanismes de défense. L'effondrement de l'haptoglobulinémie chez les drépanocytaires homozygotes associé à la chute de l'hémoglobulinémie traduit une hémolyse tissulaire sévère, ou intravasculaire, conséquence de la LPO. En outre, la diminution concomitante de la cholestérolémie paraît traduire l'importante activité lipoperoxydante mise en évidence chez les drépanocytaires.

**Key-words:** TBARS (substance reacting with thiobarbituric acid) - Inflammatory reaction protein - Alpha tocopherolemia - Beta tocopherolemia - Gamma tocopherolemia - Delta tocopherolemia - Sickle Homozygous disease (HbSS) - Sickle Heterozygous disease (HbAS, HbSC)

**Mots-clés :** TBARS (substance réagissant avec l'acide thiobarbiturique) - Protéine de la réaction inflammatoire - Tocophérolémie alpha - Tocophérolémie bêta - Tocophérolémie gamma - Tocophérolémie delta - Drépanocytose homozygote (HbSS) - Drépanocytose hétérozygote (HbAS, HbSC)

## Introduction

La drépanocytose est l'une des pathologies au cours desquelles la production de radicaux libres engendre un état de stress oxydatif. Dans cette pathologie, apparaissent une auto-oxydation accélérée et des troubles de l'oxygénation tissulaire qui sont à l'origine de la réaction radicalaire et de ses complications (1,3,6,7,9,15,18,19).

Les produits de la peroxydation des lipides, notamment des phospholipides membranaires, sont actuellement connus (alkanal, 4 hydroxy alka-2-Enals, alka2, 4 diénals, 4 hydroxynonéal, malondialdéhyde ou MDA, diènes conjugués, hydroperoxydes et peroxydes). La plupart de ces substances réagissent avec

l'acide thiobarbiturique et constituent les "TBARS", mesurables par spectrofluorimétrie (11, 17, 26, 27).

Par ailleurs de nombreux systèmes de protection contre les radicaux libres interviennent *in situ* : des systèmes enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase), des anti-oxydants (glutathion, vitamines A, E et C, bêta-carotène). Dans une étude antérieure et préliminaire (22), nous avons observé chez les drépanocytaires homozygotes une baisse importante des vitamines lipophiles anti-oxydantes et une augmentation concomitante des TBARS. Il s'agissait d'une étude de cas-témoins à nombre restreint ; aussi, dans la présente étude, notre objectif est d'étendre les cas à un nombre relativement élevé de drépanocytaires en tenant compte à la fois des formes homozygotes et hétérozygotes (13).

## Patients et méthodes

### Echantillons

Quarante et un drépanocytaires des deux sexes, âgés de 18 à 48 ans, dont 15 homozygotes "HbSS", 17 hétérozygotes "HbAS" et 9 doubles hétérozygotes "HbSC" constituent la population étudiée.

Les drépanocytaires homozygotes ont été examinés à l'occasion d'une hospitalisation en état de crise vaso-occlusive. Les hétérozygotes ont répondu à une convocation du service d'immuno-hématologie du CHU de Yopougon/Abidjan.

Par ailleurs, 14 témoins "HbAA" ont été sélectionnés pour cette étude. Pour chacun des malades et des témoins, 5 à 10 ml de sang ont été prélevés par ponction veineuse sous vide dans un tube contenant de l'héparinate de lithium ; 5 à 10 ml complémentaires ont été recueillis sur tube sec. Une partie du plasma et du sérum a été fractionnée en aliquotes de 500 µl à 1 ml en microtubes et congelés à -20°C pour l'analyse des TBARS et des tocophérols. Les autres paramètres, cholestérol total et protéines inflammatoires, ont été déterminés le jour même.

### Méthodes

Les TBARS plasmatiques ont été mesurés par la méthode de K. YAGI (26), en utilisant un fluorimètre "J.Y.3" (excitation : 515 nm ; émission 553 nm), comme nous l'avons précédemment décrit (22).

Les tocophérols plasmatiques (alpha, bêta, gamma et delta) ont été séparés par chromatographie liquide haute performance (CLHP), selon la méthode de LECLERC (15, 23) après extraction à l'hexane, et dosés par comparaison à un étalon d'alpha-tocophérol acétate.

La cholestérolémie totale a été déterminée par méthode enzymatique à la cholestérol oxydase adaptée à l'analyseur multiparamétrique paramax (Baxter) et soumise au contrôle national de qualité.

L'haptoglobine et l'alpha-1-glycoprotéine acide ou orosomucoïde (1GP) sériques ont été déterminées par la méthode immunonéphélométrique utilisant respectivement l'antisérum LN-SAVO5, LN-SAWO5 BNA100 (BEHRING, 92504 Rueil Malmaison, France).

### Traitement statistique

Les résultats ont été analysés à l'aide du test "U" de MANN-WHITNEY pour un nombre d'échantillons inférieur à 30.

## Résultats

Les marqueurs de la lipoperoxydation représentés par les TBARS plasmatiques (tableaux I et II) sont significativement augmentés pour l'ensemble des drépanocytaires par rapport aux témoins ( $P < 0,001$ ). En revanche, les tocophérolémies alpha, gamma et delta sont significativement diminuées chez tous les drépanocytaires ( $P < 0,005$ ), tandis que la tocophérolémie bêta est nettement augmentée ( $P < 0,01$ ). Les marqueurs protéiques de l'inflammation (haptoglobine et orosomucoïde sériques) sont significativement diminués chez les drépanocytaires ( $P < 0,05$ ), suggérant l'absence de processus inflammatoire biochimiquement décelable chez ces malades. Une anémie modérée est parallèlement observée (hémoglobine à  $9,86 \pm 1,47$  g/100 ml de globules rouges), plus marquée chez les sujets homozygotes. La cholestérolémie est significativement diminuée chez les drépanocytaires ( $P < 0,05$ ).

Tableau Ia & Ib.

Concentrations plasmatiques moyennes $\pm$ 2DS des différents marqueurs des témoins et de l'ensemble des drépanocytaires.					
<i>Mean plasmatic concentrations <math>\pm</math> 2DS of different markers of control and of all sickle cell patients.</i>					
<i>(TBARS et tocophérol en nMol/ml ; haptoglobine et 1GP en g/l ; cholestérol total en nMol/l et Hb en g/100 ml de G.R.)</i>					
	TBARS	T*	T*	T*	T*
témoins n = 14	2,9 $\pm$ 0,81	21,82 $\pm$ 5	0,17 $\pm$ 0,17	0,73 $\pm$ 0,7	0,29 $\pm$ 0,24
drépanocytaires n = 41	4,36 $\pm$ 1,83	11,75 $\pm$ 7,8	0,33 $\pm$ 0,24	0,33 $\pm$ 0,15	0,22 $\pm$ 0,12
seuil de signification	P < 0,001	P < 0,005	P < 0,01	P < 0,005	P < 0,02
	Hapto	1GP	C.T.**	Hb	
témoins n = 14	0,97 $\pm$ 0,7	0,60 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,8	14,54 $\pm$ 1,2	
drépanocytaires n = 41	0,57 $\pm$ 0,4	0,89 $\pm$ 0,34	3,51 $\pm$ 0,6	9,86 $\pm$ 1,47	
seuil de signification	P < 0,05	P < 0,01	P < 0,05	P < 0,001	

Tableau II.

Concentrations plasmatiques moyennes  $\pm$  2DS des marqueurs de la lipoperoxydation des tocophérols (en nMol/ml), des protéines de la réaction inflammatoire (en g/l), du cholestérol (en nMol/l) et de l'Hb en g/100 ml de G.R.

*Mean plasmatic concentrations  $\pm$  2DS of markers of lipoperoxydation of tocopherols (in nMol/ml), proteins of inflammatory reaction (in g/l), cholesterol (in nMol/l) and of Hb in g/100 ml of G.R.*

	TBARS	T*	T*	T*	T*
témoins	2,9 $\pm$ 0,81	21,82 $\pm$ 5	0,17 $\pm$ 0,17	0,73 $\pm$ 0,7	0,29 $\pm$ 0,24
HbSS	4,95 $\pm$ 2	10,94 $\pm$ 9,1	0,17 $\pm$ 0,11	0,36 $\pm$ 0,17	0,10 $\pm$ 0,06
HbSC	4,11 $\pm$ 1,5	13,4 $\pm$ 7	0,30 $\pm$ 0,24	0,42 $\pm$ 0,19	0,10 $\pm$ 0,06
HbAS	4,02 $\pm$ 2	10,90 $\pm$ 7,3	0,53 $\pm$ 0,37	0,21 $\pm$ 0,10	0,36 $\pm$ 0,19
	hapto	1GP	C.T.**	Hb	
témoins	0,97 $\pm$ 0,73	0,60 $\pm$ 0,20	4,68 $\pm$ 0,82	14,54 $\pm$ 1,17	
HbSS	0,49 $\pm$ 0,15	0,90 $\pm$ 0,23	3,26 $\pm$ 0,67	8,22 $\pm$ 0,95	
HbSC	0,61 $\pm$ 0,47	0,85 $\pm$ 0,37	3,52 $\pm$ 0,44	11,36 $\pm$ 1,76	
HbAS	0,62 $\pm$ 0,47	0,93 $\pm$ 0,41	3,74 $\pm$ 0,73	10 $\pm$ 1,70	

La comparaison de ces paramètres entre les différentes formes de drépanocytoses (tableaux III et IV) ne montre aucune différence significative par rapport aux TBARS. La seule différence significative est observée pour les concentrations plasmatiques des bêta et gamma tocophérols entre HbSS et HbAS ( $P = 0,05$ ) et entre HbSC et HbAS ( $P = 0,02$ ). Le degré de l'anémie est significativement plus élevé pour les homozygotes que pour les hétérozygotes.

Tableau III.

Comparaison entre témoins et drépanocytaires : test "U" de MANN-WHITNEY (pour n < 30).			
<i>Comparison of control and sickle cell patients: MANN-WHITNEY "U" test (n &lt; 30)</i>			
test "U" de MANN - WHITNEY			
	HbSS (n = 15)	HbSC (n = 9)	HbAS (n = 17)
TBARS	P = 0,003	P = 0,04	P = 0,03
T*	P = 0,005	P = 0,01	P = 0,001
T*	NS	NS	P = 0,05
T*	NS	NS	P = 0,02
T*	NS	NS	NS
hapto	P = 0,002	P = 0,03	P = 0,03
1GP	P = 0,001	P = 0,02	P < 0,0001
C.T.**	P = 0,0002	P = 0,002	P < 0,01
Hb (Tx)	P = 0,0001	P = 0,001	P = 0,00001

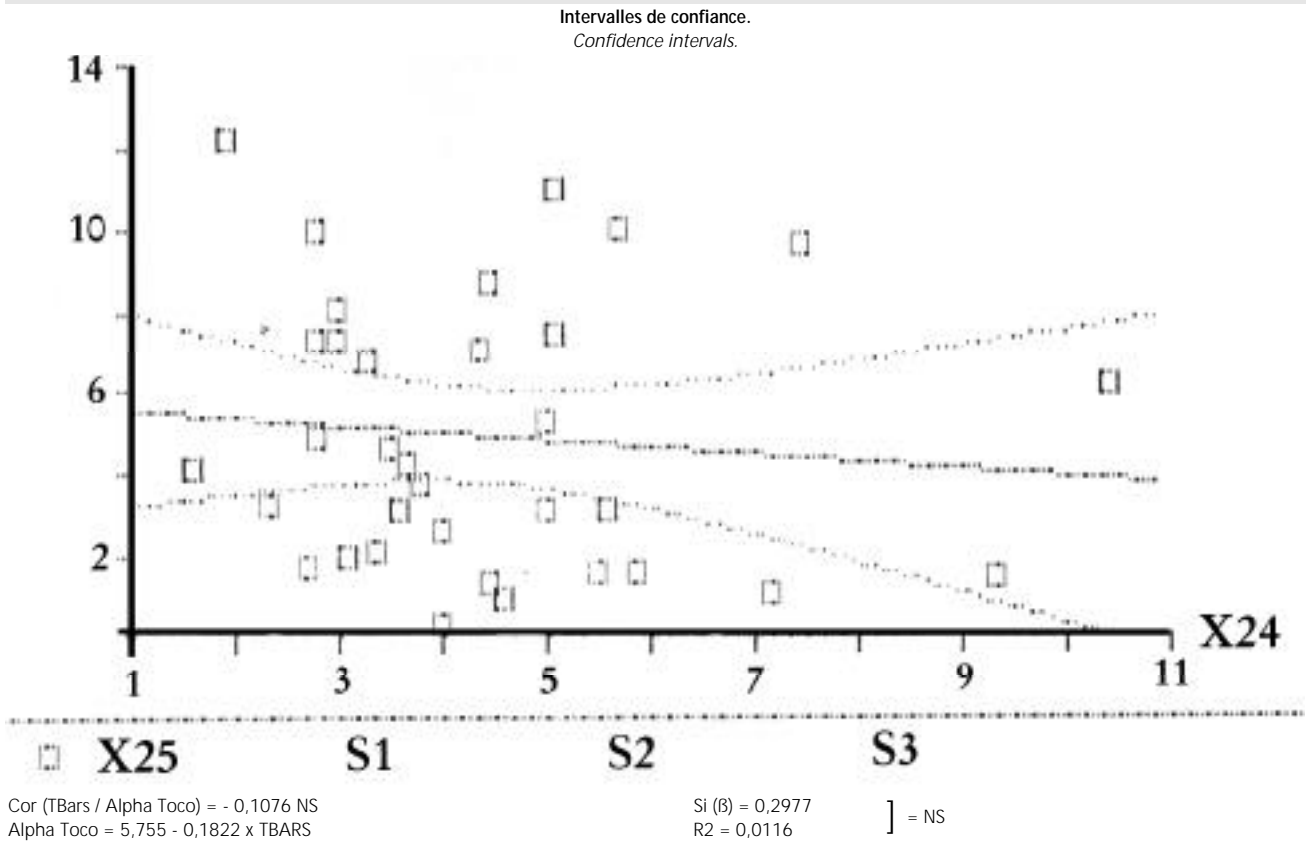
Tableau IV.

Comparaison entre les différentes formes de drépanocytose (pour n < 30)			
<i>Comparison of different types of sickle cells.</i>			
	HbSS /HbSC	HbSS /HbAS	HbSC /HbAS
TBARS	NS	NS	NS
T*	NS	NS	NS
T*	NS	P = 0,03	NS
T*	NS	NS	P = 0,02
T*	NS	NS	NS
hapto	NS	NS	NS
1GP	NS	NS	NS
C.T.**	NS	P = 0,05	NS

Légende pour les 4 tableaux :

\* ..... T = ..... Tocophérols ; \*\* C. T. = cholestérol total

Figure 1.



## Discussion

L'augmentation significative des TBARS chez les drépanocytaires est le signe d'une lipoperoxydation (LPO), et par conséquent du débordement des défenses antioxydantes, au niveau plasmatique tout au moins.

La production excessive dans les érythrocytes d'anions superoxyde et de radicaux hydroxyl, résultant de l'instabilité de l'hémoglobine S, est considérée comme le facteur initiateur de l'hémolyse qui libère dans le plasma du fer ionisé et de l'hème qui engendrent à leur tour des radicaux libres (4, 7, 9, 20, 21, 22). Ceci est conforme à la réaction de FENTON ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ ). Chez les sujets homozygotes en crise, l'hémolyse est objectivée par la chute du taux d'hémoglobine ( $P=0,001$ ) (25). Elle entraîne l'effondrement des taux sériques d'haptoglobine ( $P=0,05$ ). Dans les formes hétérozygotes, l'haptoglobiniémie observée est normale.

Il est admis que l'hémolyse tissulaire ou extravasculaire ne fait baisser l'haptoglobine que dans ses formes sévères.

Chez le drépanocytaire homozygote, l'intensité de la crise de déglobulisation est plus grande que ne l'indique la baisse de la concentration de l'haptoglobine du fait de l'hémolyse tissulaire. Cette dernière entraîne d'ailleurs la transformation de l'hémoglobine en méthémoglobine (7, 9). L'augmentation concomitante dans le sang circulant du fer et de l'hème entretient le phénomène d'auto-oxydation décrit par HEBBEL (5, 8). La baisse importante de tocophérolémie totale chez les homozygotes a déjà été rapportée (22) ; elle reflète l'intensité de l'agression oxydative plasmatique. L'observation ici d'une meilleure conservation de la tocophérolémie chez les hétérozygotes plaide en faveur d'une agression oxydative moins importante chez ces sujets, mais souligne la participation prépondérante des tocophérols dans la barrière de défense plas-

matique. La baisse significative de la cholestérolémie pourrait s'expliquer par la mobilisation du cholestérol sérique au profit du cholestérol membranaire (10). L'absence de corrélation entre les TBARS et les tocophérols traduit probablement le rôle antioxydant et protecteur joué par d'autres systèmes de défense comme les rétinoïdes, les caroténoïdes, la vitamine C, le glutathion réduit, certains micronutriments tels que le sélénium, et la barrière enzymatique antioxydante (2, 16).

## Conclusion

L'évaluation des produits terminaux de la lipoperoxydation représentés par les TBARS, et celle des protéines de l'inflammation et des tocophérols plasmatiques chez les patients drépanocytaires montrent des différences significatives entre les sujets homozygotes et hétérozygotes. Chez les sujets homozygotes HbSS en crise, l'importance de l'hémolyse avec libération de fer ionisé explique la production excessive de radicaux libres, et donc des TBARS, suivie de l'effondrement du taux sérique d'haptoglobine en rapport avec la baisse importante de la tocophérolémie totale. La production modérée de radicaux libres (12) et de leurs dérivés plasmatiques chez les sujets hétérozygotes semble être en rapport avec une anémie légère, un taux de cholestérol total relativement plus élevé que chez l'homozygote et une tocophérolémie normale (antioxydant majeur de l'organisme). La baisse constatée de la cholestérolémie totale des sujets homozygotes pourrait s'expliquer par l'hémolyse intravasculaire importante qui favorise la libération excessive du fer et initie la peroxydation lipidique selon la réaction de FENTON, aggravant ainsi la lyse érythrocytaire par auto-oxydation des lipides membranaires.

## Références bibliographiques

1. ADELEKAN DA, THURNHAM DI & ADEKILE AD - Reduced anti-oxidant capacity in paediatric patients with homozygous sickle cell disease. *Eur J Clin Nutr*, 1986, **43**, 609-614.
2. BURTON GW, JOYCE A & INGOLD KU - Is vitamin E the only lipid soluble, chain breaking anti-oxidant in human Blood plasma and erythrocytes membranes ? *Arch Biochem Biophys*, 1983, **221**, 281-290.
3. CLARCK MR & ROSSI ME - Permeability characteristics of deoxy-generated sickle cells. *Blood*, 1990, **76**, 2139-2145.
4. DEBY C & PINCEMAIL J - Toxicité de l'oxygène, radicaux libres et moyens de défense. *Nouv Presse Méd*, 1986, **15**, 1468-1474.
5. HEBBEL RP - The sickle erythrocytes in double jeopardy: autooxidation and iron decompartmentalization. *Semin Hemat*, 1990, **27**, 51-67.
6. HEBBEL RP, EATON JW, BALASINGAM M & STEINBERG MH - Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J Clin Invest*, 1982, **70**, 1253-1259.
7. HEBBEL RP, NEY PA & FOKER W - Autooxidation, dehydration and adhesivity may be related abnormalities of sickle erythrocytes. *Am J Physiol*, 1989, **256**, 579-583.
8. HEBBEL RP, SHALEV O, FOKER W & RANK BH - Inhibition of erythrocyte Ca<sup>2+</sup>/ATPase by activated oxygen through thiol - And lipid dependent mechanisms. *Biochem Biophys Acta*, 1986, **862**, 8-16.
9. HEBBEL RP, WILLIAM TM, EATON JW & HEDLUNDB E - Accelerated autooxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**, 237-241.
10. JAIN SK, ROSS JD, LEVY GT, LITTLE RL & DUETT J - The accumulation of Malondialdehyde and enol product of membrane lipid peroxidation, can cause potassium leak in normal and sickles red blood cell. *Biochem Med Biol*, 1989, **42**, 60-65.
11. KOSUGI H, KOJIMA T & KIKUGATWA K - Thiobarbituric acid reactive substances from peroxidized lipids. *Lipids*, 1989, **24**, 873-881.
12. KUROSS SA, RANK BH & HEBBEL RP - Excess heme in sickle erythrocyte inside - out membranes: possible role in thiol oxydation. *Blood*, 1988, **71**, 876-882.
13. LE BRAS M, BEDA YB & BERTRAND ED - Incidence possible du trait drépanocytaire sur la pathologie de l'adulte en Côte d'Ivoire. *La drépanocytose*, coll. Inserm, 1975, **44**, 95-97.
14. LECLERC M & BOURGEAY-CAUSSE M - Une méthode simple, fiable et rapide : dosage simultané du rétinol et du tocophérol sériques par chromatographie liquide haute performance. *Rev Inst Pasteur Lyon*, 1981, **14**, 475-496.
15. LECLERC L, GIRARD F, GALACTEROS F & POYART C - The calmodulin-stimulated (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>) ATPase in hemoglobin S Erythrocyte membranes : effects of sickling and oxidative agents. *Biochem Biophys Acta*, 1987, **897**, 33-40.
16. NATHA C & MACHLIN L - Plasma levels of tocophérol in sickle cell anemia subjects. *Am J Clin Nutr*, 1979, **32**, 257-261.
17. OHKAWA H, DHISHIN & YAGI K - Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, **95**, 351-358.
18. PLATT OS - Pathology of membrane proteins in sickle erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 1989, **565**, 83-85.
19. RICE EC, OMORPHOS SC & BAYSAL E - Sickle cell membranes and oxidative damage. *Bioch J*, 1986, **237**, 265-269.
20. SCHACHTER LP - Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide by erythrocytes from individuals with sickle trait or normal hemoglobin. *Eur J Clin Invest*, 1986, **16**, 204-210.
21. SCHUWART RS, RYBICKI AC, HEATH RH & BERTRAM HI - Proteins 4-1 in sickle erythrocytes. *J Biol Chem*, 1987, **262**, 15666-15672.
22. SESS ED, CARBONNEAU MA, THOMAS MJ, DUMONT MF, PEUCHANT E, PERROMAT A, LE BRAS M & CLERC M - Premières observations sur les principaux paramètres plasmatiques du stress oxydatif chez le drépanocytaire homozygote. *Bull Soc Path Exot*, 1992, **85**, 174-179.
23. THURNHAM DI, SMITH E & FLORA PS - Concurrent liquid chromatographic assay of retinol, alpha tocopherol, Beta carotene, Alpha carotene, lycopene, and cryptoxanthin in plasma with tocopherol acetate as internal standard. *Clin Chem*, 1988, **34**, 377-381.
24. VASU N & TURNER GA - The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: structure of the adduct with malondialdehyde. *Lipids*, 1984, **19**, 804-805.
25. WEINSTEIN RSD, WARTH JA, NEAR K & MARIKOVST Y - Sequestricytes : a manifestation of transcellular cross-bonding of the red cell membrane in sickle cell anemia. *J Cell Sci*, 1989, **94**, 593-600.
26. YAGI K - A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med*, 1976, **15**, 212-216.
27. YAGI K - Lipids peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids*, 1987, **45**, 337-351.