

Influence du taux d'hémoglobine fœtale (HbF) sur le stress oxydant chez le drépanocytaire homozygote vivant à Abidjan, Côte-d'Ivoire.

E. W. C. Nacoulma (1)*, D. Sawadogo (2), J. Sakandé (3), A. Mansour (3), F. H. Hien (1), A. Sangaré (1) & E. D. Sess (3)

(1) Service d'hématologie clinique du CHU de Yopougon, Abidjan, Côte-d'Ivoire.

(2) Laboratoire d'hématologie du CHU de Yopougon, Côte-d'Ivoire.

(3) Laboratoire de biochimie de l'UFR sciences médicales de l'Université de Cocody, Abidjan, Côte-d'Ivoire.

*Correspondance : Éric Nacoulma 09 BP 863 Ouagadougou 09 Burkina Faso. Tél 00226 70269444, E-mail : eric_nacoulma@univ-ouaga.bf

Manuscrit n° 2854. "Biologie clinique". Reçu le 26 août 2005. Accepté le 24 janvier 2006.

Summary: Influence of fetal haemoglobin rate (Fhb) on the oxidizing stress in homozygote sickle cell patient living in Abidjan, Côte-d'Ivoire.

Sickle cell anemia being involved in oxidizing stress, our objective was to study the influence of the fetal haemoglobin rate (Fhb) on the lipoperoxidation markers in homozygote sickle cell patient in tropical African surroundings.

The study population was composed of 73 subjects among whom 57 homozygote sickle cell subjects and 16 healthy control cases. These subjects were distributed in 4 groups according to Fhb rate: group 1 (Fhb rate under 10%), group 2 (Fhb rate ranging from 10 and 20%), group 3 (Fhb rate above 20%), group 4 (control cases with no sickle cell disease).

On the biological level, the markers of plasma lipoperoxidation represented by substances reacting with thiobarbituric acid (TBARS) significantly increased in sickle cell patients comparatively to control cases ($p = 10^{-6}$). A strong positive correlation ($r = +0,70$, $p < 0,01$) was found between HbS and the TBARS rate. Comparison of biological parameters of homozygote sickle cell patients according to HbF rate shows that TBARS rate is all the more low as the HbF rate is high ($p = 0,02$). Moreover the number of irreversible and reversible sickle cells is higher in the group 1 which has the highest rate of TBARS. This observation is confirmed by a coefficient of positive correlation between TBARS and reversible sickle cells ($r = +0,40$, $p < 0,01$).

This study strengthens the role played by HbF on the modulation of physiopathology of homozygote sickle cell anemia by the control, among others, of free radicals.

Résumé:

La drépanocytose étant impliquée dans le stress oxydant, notre objectif était d'étudier l'influence du taux d'hémoglobine fœtale (HbF) sur les marqueurs de lipopéroxydation chez le drépanocytaire homozygote en milieu tropical africain.

La population d'étude est constituée de 73 sujets dont 57 sujets drépanocytaires homozygotes et de 16 témoins sains. Ces sujets ont été répartis en 4 groupes selon le taux d'HbF : groupe 1 (taux d'HbF inférieur à 10 %), groupe 2 (taux d'HbF compris entre 10 et 20 %), groupe 3 (taux d'HbF supérieur à 20 %), groupe 4 (sujets témoins non drépanocytaires).

Sur le plan biologique, les marqueurs de la lipoperoxydation plasmatiques représentés par les substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) sont significativement augmentés pour l'ensemble des drépanocytaires, comparativement aux témoins ($p = 10^{-6}$). Une forte corrélation positive ($r = + 0,70$, $p < 0,01$) a été retrouvée entre HbS et le taux de TBARS. La comparaison des paramètres biologiques des drépanocytaires homozygotes en fonction du taux d'HbF rapporte que le taux de TBARS est d'autant plus bas que le taux d'HbF est élevé ($p = 0,02$). De plus, le nombre de drépanocytes irréversibles et réversibles est plus élevé dans le groupe 1 qui a le taux de TBARS le plus élevé. Cette observation est confirmée par un coefficient de corrélation positive entre TBARS et drépanocytes réversibles ($r = + 0,40$, $p < 0,01$).

Cette étude confirme le rôle de l'HbF sur la modulation de la physiopathologie de la drépanocytose homozygote par le contrôle entre autres de la production des radicaux libres.

Introduction

Il est bien établi que le taux d'hémoglobine fœtale (HbF) module la sévérité des crises chez le drépanocytaire (3, 7, 8). Ce mécanisme s'explique par le fait que l'HbF interrompt la croissance du polymère d'HbS bloquant ainsi le phénomène

de gélification et de falcification qui sont responsables de la crise vaso-occlusive (CVO) de la drépanocytose (11). Ainsi les fortes concentrations d'hémoglobine F ont un effet atténuateur sur la maladie et, au contraire, les basses concentrations sont un facteur de risque pour les crises douloureuses et le syndrome aigu thoracique (3). Par ailleurs, il a été démontré

oxidizing stress
TBARS
HbF
sickle cell disease
hospital
Abidjan
Côte-d'Ivoire
Sub Saharan Africa

stress oxydant
TBARS
HbF
drépanocytose
hôpital
Abidjan
Côte-d'Ivoire
Afrique intertropicale

que le niveau de production de l'HbF au cours de la mutation β^S de la drépanocytose est liée à trois haplotypes qui sont l'haplotype Bénin avec un taux faible d'HbF inférieur à 10 %, l'haplotype Bantou avec un taux compris entre 10 et 20 % et enfin l'haplotype Sénégal avec un taux d'HbF supérieur à 20 % (7). Afin de mieux comprendre le rôle de l'HbF sur la modulation de la physiopathologie de la drépanocytose homozygote en milieu tropical africain, nous avons entrepris d'étudier son influence sur le stress oxydant. En effet, ce travail fait suite à ceux menés en 1992 (13) et en 1998 (12) qui avaient permis de montrer que l'augmentation des marqueurs de lipopéroxydation est un des facteurs à la base des désordres biologiques observés chez le malade drépanocytaire.

Matériel et méthodes

Matériel

Cadre et type d'étude

Il s'agit d'une étude transversale par recrutement successif, qui s'est déroulée dans le service d'hématologie clinique du CHU de Yopougon (Abidjan, Côte-d'Ivoire). Le prélèvement et l'analyse des échantillons a eu lieu au laboratoire d'hématologie du CHU de Yopougon en ce qui concerne les hémogrammes et l'électrophorèse de l'hémoglobine et le dosage des marqueurs de stress oxydant au laboratoire de biochimie de l'UFR des sciences médicales d'Abidjan.

Population d'étude

La population d'étude est constituée de 73 sujets dont 57 drépanocytaires homozygotes (masculin : 32, féminin : 25) et 16 témoins sains (masculin : 9 et féminin : 7). Ces sujets ont été repartis en 4 groupes selon le taux d'HbF :

- groupe 1 : 18 sujets à taux d'HbF inférieur à 10 % ;
- groupe 2 : 24 sujets à taux d'HbF compris entre 10 et 20 % ;
- groupe 3 : 15 sujets à taux d'HbF supérieur à 20 % ;
- groupe 4 : 16 sujets témoins sains à taux d'HbF = 0, hémoglobine normale (HbAA).

Ont été inclus les drépanocytaires homozygotes régulièrement suivis au service d'hématologie clinique du CHU de Yopougon avec un dossier complet et bien tenu.

En ce qui concerne les témoins, ont été retenus les sujets à hémoglobine normale (HbAA).

Pour les malades, nous avons exclu :

- les associations de la drépanocytose à la bêtathalassémie ;
- les drépanocytaires présentant une complication infectieuse ou une association morbide évolutive (cardiopathie, diabète) ;
- les drépanocytaires sous traitement pouvant modifier la production de radicaux libres et la production d'HbF (hydroxyurée, vitamine E).

En ce qui concerne les témoins, ont été exclus :

- les sujets présentant une infection évolutive (paludisme, diabète) ;
- les sujets fumeurs, alcooliques avérés et les femmes enceintes.

Tous les sujets inclus dans l'étude ont donné leur accord après avoir été éclairés sur le but, le protocole et l'intérêt de l'étude.

Méthodes

Prélèvements

Cinq millilitres de sang ont été prélevés par ponction veineuse sous vide dans un tube contenant de l'héparinate de lithium

pour les dosages biochimiques et cinq autres dans un tube EDTA (éthylène diamine tétraacétique) destinés aux analyses hématologiques. Pour les tubes à héparinate de lithium, le plasma a été recueilli après une centrifugation de 10 minutes à 1 000 g et à 4 °C puis réparti en aliquotes de un millilitre, congelé à – 80 °C et conservés jusqu'aux analyses. Les examens hématologiques ont été exécutés immédiatement.

Examens hématologiques

Les hémogrammes ont été réalisés avec un compteur automatique de type Coulter T890.

La numération des drépanocytes a été faite immédiatement après chaque hémogramme sans conditions particulières d'oxygénation. Elle a consisté en un comptage manuel des drépanocytes réversibles et irréversibles à l'aide d'une cellule de Malassez. Le liquide de dilution utilisé est celui de Marcano. Ont été considérés comme drépanocytes irréversibles les hématies épousant la forme d'une faucille ou d'un croissant de lune avec les deux extrémités bien pointues. Les hématies en forme de faucille présentant un seul bout pointu ou en forme de banane bien pleine ont été considérées comme drépanocytes réversibles. Cette technique a été validée grâce à une manipulation en double par deux techniciens différents et les résultats étaient parfaitement concordants.

L'électrophorèse de l'hémoglobine a été réalisée avec du matériel des laboratoires Helena selon le protocole de FABRICIUS et CABANNES (4) qui a consisté à :

- séparer d'abord les hémoglobines en milieu alcalin (pH = 8,4) ; à ce pH seuls les résultats concernant les Hb A et F sont rendus avec certitude ;
 - séparer ensuite à pH acide (pH = 6) l'HbS de ses analogues auxquels elles pouvaient être confondues à pH alcalin. Il s'agit entre autres des HbD Ibadan, Hb Lepore, Hb Cocody.
- L'interprétation des électrophorèses a été complétée par les résultats du test de falciformation, de l'hémogramme, de l'étude des réserves de fer et l'enquête familiale avant que le malade soit déclaré homozygote SS. Les fractions hémoglobiniques ont été approximativement évaluées par densitométrie en l'absence de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) reconnue pour être plus précise. Comme les seuils retenus pour la classification des groupes en fonction du taux d'HbF sont des tranches de 10 %, nous avons jugé les valeurs acceptables. Par ailleurs, le test de Kleihauer ou test de résistance de l'HbF à pH acide a été utilisé comme méthode qualitative qui a permis d'éliminer les suspicions de trait thalassémique et les persistance héréditaires de l'HbF.

Analyse des radicaux libres

Elle est basée essentiellement sur le dosage indirect des radicaux libres par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) selon la méthode fluorimétrique de K. YAGI (14). Cette méthode mesure les substances issues de la lipopéroxydation réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBA) et qui sont notamment le malondialdéhyde (MDA), les alcanals et alkénals. Le principe repose sur la réaction de deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) avec une molécule de malondialdéhyde (MDA). Elle s'effectue en milieu acétique acide à la température de 95 °C et conduit à la formation d'un complexe de couleur rose. D'autres aldéhydes issus de la lipopéroxydation réagissent de la même manière. La coloration obtenue correspond à l'ensemble des substances réagissant mais les résultats sont exprimés en nmole de MDA/ml. Cette méthode paraît moins précise que la méthode qui consiste à déterminer les LDL plus ou moins oxydés (9),

mais elle a l'avantage d'être pratiquée en routine dans notre laboratoire.

Collecte des données et traitement statistique

Les différentes données ont été consignées sur des fiches d'enquête et ont été saisies et analysées grâce au logiciel Epi info version 6. Les comparaisons entre les différentes variables ont été faites grâce au test de χ^2 de Pearson, χ^2 corrigé de Yates et le test de Fisher. Un test de corrélation a été également appliqué. Pour l'ensemble des tests statistiques réalisés, le seuil de signification retenu était de 5 % correspondant à un seuil α de 5 %.

Résultats

Répartition des sujets en fonction de l'âge et du sexe

L'âge moyen des drépanocytaires est de 16,3 ans avec des extrêmes de 3 et 38 ans. Le sex ratio M/F est de 0,78. Pour les témoins, l'âge moyen est de 17,62 ans avec les mêmes extrêmes.

Valeurs moyennes des paramètres biologiques des drépanocytaires et des témoins

Les valeurs consignées au tableau II montrent chez les drépanocytaires une diminution significative ($p < 10^{-6}$) du taux d'Hb, tandis que les radicaux libres (TBARS) sont significativement augmentés ($p < 10^{-6}$).

Valeurs moyennes des paramètres biologiques en fonction du taux d'HbF

La comparaison globale des paramètres biologiques des trois groupes montre des variations significatives au niveau des drépanocytes irréversibles et réversibles ($p < 10^{-6}$) et dans une certaine limite au niveau des radicaux libres ($p = 0,06$). La comparaison des moyennes deux à deux confirme l'augmentation significative des drépanocytes du groupe 1 ($p < 10^{-6}$),

Tableau I.

Répartition des sujets en fonction de l'âge et du sexe.
Distribution of subjects according to age and sex.

groupes	n	masculin	féminin	âge moyen	extrêmes
groupe 1	18	11	7	18,5	6-38
groupe 2	24	13	11	15,1	4-32
groupe 3	15	8	7	15,6	3-33
groupe 4	16	9	7	17	3-38

Tableau II.

Comparaison des paramètres biologiques entre drépanocytaires et témoins.
Comparison of the biological parameters among sickle cell patients and control cases.

paramètres biologiques	drépanocytaires n= 57	témoins n= 16	p
S (%)	82,8 ± 16,15	-	-
F(%)	14,85 ± 16,74	-	-
taux d'Hb (g/dl)	7,68 ± 2,3	13,3 ± 1,8	10 ⁻⁶
drépanocytes réversibles	303 719	-	-
drépanocytes irréversibles	42 245	-	-
TBARS (nmole/ml)	2,96 ± 1,3	1,32 ± 0,5	10 ⁻⁶

Tableau III.

Comparaison des paramètres biologiques des drépanocytaires en fonction du taux d'HbF.

Comparison of the sickle cell patients' biological parameters according to HbF rate.

paramètres biologiques	groupe 1	groupe 2	groupe 3	p
taux d'Hb(g/dl)	7 ± 1,8	7,86 ± 1,9	7,89 ± 1,75	0,25
drépanocytes réversibles	382 130 ± 125	303 750 ± 195	291 000 ± 185	10 ⁻⁶
drépanocytes irréversibles	46 000 ± 115	44 400 ± 300	35 750 ± 220	10 ⁻⁶
TBARS	3,10 ± 1,2	3,0 ± 1,46	2,10 ± 1,25	0,06

ainsi qu'une baisse significative des TBARS du groupe 3 ($p = 0,02$).

Corrélation entre le niveau de TBARS et les paramètres biologiques

Le calcul des coefficients de corrélation rapporte des corrélations fortement positives respectivement entre HbS et taux de TBARS ($r = 0,70$; $p < 0,01$) et entre drépanocytes réversibles et taux de TBARS ($r = +0,40$; $p < 0,01$). Une corrélation fortement négative a par ailleurs été trouvée entre taux d'Hb totale et taux de TBARS ($r = -0,62$; $p < 0,01$).

Discussion

Les marqueurs de la lipoperoxydation représentés par les TBARS plasmatiques sont significativement augmentés pour l'ensemble des drépanocytaires, comparativement aux témoins ($p=10^{-6}$). Une forte corrélation positive ($r = +0,70$; $p < 0,01$) a été retrouvée entre HbS et le taux de TBARS. Nos résultats sont en accord avec la littérature (2, 5, 6, 12, 13). La production de radicaux libres fait partie de la série de modifications cellulaires qui fait suite à la polymérisation de l'HbS dans le GR. Un micro environnement oxydant apparaît alors avec libération d'ions ferriques (Fe^{3+}), création d'un cycle d'auto-oxydation de l'HbS qui retentit sur les autres protéines du GR avec, pour conséquence, des dommages membranaires des GR expliquant l'anémie hémolytique (2). Ceci est confirmé par une corrélation négative ($r = -0,62$; $p < 0,01$) entre TBARS et le taux d'Hb. Autrement dit l'anémie au cours de la drépanocytose est d'autant plus profonde que le taux de TBARS est élevé. La comparaison des paramètres biologiques des drépanocytaires homozygotes en fonction du taux d'HbF rapporte que le taux de TBARS est d'autant plus bas que le taux d'HbF est élevé ($p = 0,02$). De plus, le nombre de drépanocytes irréversibles et réversibles est plus élevé dans le groupe 1 qui a le taux de TBARS le plus élevé.

Cette observation est confirmée par le coefficient de corrélation positive entre TBARS et drépanocytes réversibles ($r = +0,40$; $p < 0,01$).

Des travaux ont montré qu'il existe une corrélation entre la proportion de drépanocytes irréversibles et les dommages membranaires des globules rouges (10). RICE a montré que lorsque le taux des drépanocytes irréversibles est inférieur à 5 % chez des malades drépanocytaires, les caractéristiques membranaires sont proches de celles de GR de sujets normaux. Par contre, lorsque le nombre de drépanocytes est supérieur à 5 %, le niveau de produits de lipoperoxydation est plus élevé. Il a conclu que les dommages membranaires entraînés par le stress oxydant sont un facteur secondaire qui pérennise la formation de drépanocytes irréversibles quand bien même la situation d'hypoxie se corrigeait (10). De plus, le fer ferrique (Fe^{3+}) est incriminé dans l'entretien du stress oxydant par le biais de la réaction de Haber Weiss Fenton (1, 2).

Conclusion

Cette étude confirme le rôle de l'hémoglobine fœtale (HbF) sur la modulation de la physiopathologie de la drépanocytose. Cette modulation passerait entre autres par le contrôle de la production des radicaux libres.

Références bibliographiques

- 1 AGIL A & HOSSEIN SADRZADEH SM – Hydroxy-urea protects erythrocytes against oxidative damage. *Redox Report*, 2000, **5**, 29-34
- 2 ASLAN M, THORNLEY-BROWN D & FREEMAN BA – Reactive Species in sickle cell disease. *Ann NY Acad Sci*, 2000, **899**, 375-391.
- 3 BAILEY K, MORRIS J S, THOMAS P & SERGEANT GR – Fetal hemoglobin and early manifestation of homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child*, 1992, **4**, 514-520.
- 4 FABRITIUS H & CABANNES R – Protocole pour la détection et l'identification des anomalies structurales de l'hémoglobine. *Méd Armées*, 1983, **2**, 225-229.
- 5 JISON ML, MUNSON PJ, BARB JJ, SUFFREDINI AF, TALWAR S et al. – Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic and inflammatory stress of sickle cell disease. *Blood*, 2004, **1**, 270-280.
- 6 KAUL DK, LIU XD, CHANG HY, NAGEL RL & FABRY ME – Effect of fetal hemoglobin on microvascular regulation in sickle transgenic knockout mice. *J Clin Invest*, 2004, **18**, 1136-1145.
- 7 LABIE D & ELION J – Modulation polygénique des maladies monogéniques : l'exemple de la drépanocytose. *Médecine/Science*, 1995, **12**, 341-349.
- 8 LAVELLE DE – The molecular mechanism of fetal hemoglobin reactivation. *Semin Hematol*, 2004, **41**, 3-10.
- 9 LYNCH SM, CAMPIONE AL & MOORE MK – Plasma thiols inhibit heme-dependent oxidation of human low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1485**, 11-22.
- 10 RICE EC, OMORPHOS SC & BAYSAL E – Sickle cell membranes and oxidative damage. *Bioch J*, 1986, **237**, 265-269.
- 11 SAUNTHARARAJAH Y & DE SIMONE J – Clinical studies with fetal hemoglobin-enhancing agents in sickle cell disease. *Semin Hematol*, 2004, **41**, 11-16.
- 12 SESS ED, CARBONNEAU MA, MEITE M, PEUCHANT E, DUMONT MF et al. – Marqueurs de la lipoperoxydation (LPO), protéines inflammatoires et tocophérols plasmatiques dans les drépanocytoses homozygote et hétérozygote. *Bull Soc Pathol Exot*, 1998, **91**, 238-241.
- 13 SESS ED, CARBONNEAU MA, THOMAS MJ, DUMONT MF, PENCHANT E et al. – Premières observations sur les principaux paramètres plasmatiques du stress oxydant chez le drépanocytaire homozygote. *Bull Soc Pathol Exot*, 1992, **85**, 174-179.
- 14 YAGI K – Lipids peroxyds and human diseases. *Chem Phys Lipids*, 1987, **45**, 337-351.