

# LA BIOCHIMIE DE L'HEMOLYSE

4<sup>ème</sup> année pharmacie

Dr Boukhelkhal

## Introduction

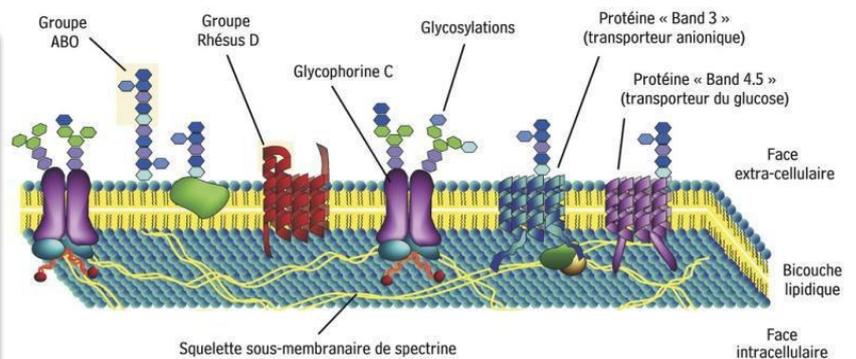
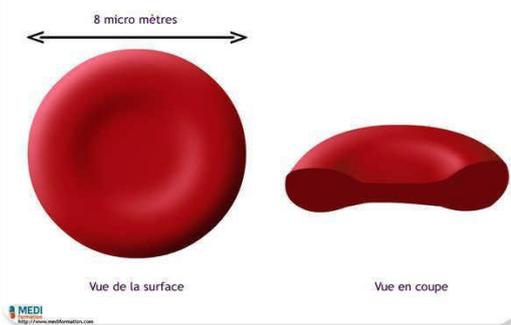
L'hémolyse est le phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits et libèrent leur contenu. L'hémolyse est visible à l'œil nu, à partir d'une concentration plasmatique en hémoglobine > 0,3 g/L. Elle se manifeste par une coloration plus ou moins rouge du sérum ou du plasma.

## 1/ Rappels physiologiques :

1-1/ Le globule rouge : Le globule rouge (GR) ou hématie ou érythrocyte est une cellule anucléée arrondie de 7  $\mu$  à 8  $\mu$  de diamètre, discoïdale biconcave de profil. Elle contient une solution d'hémoglobine (Hb): c'est ce pigment respiratoire qui transporte l'oxygène des poumons vers les tissus et est responsable de la fonction de l'hématie. Il provient des érythroblastes de la moelle osseuse, et de la maturation finale du réticulocyte.

- Sa durée de vie est d'environ 120 jours.

## GLOBULE ROUGE



## -Morphologie :

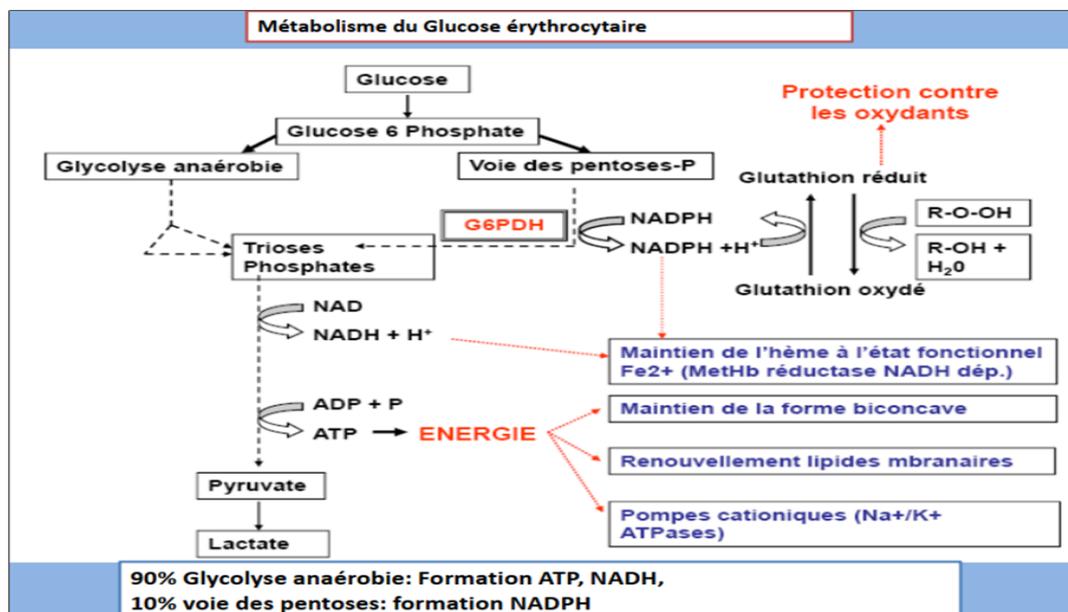
.La membrane : bicouche lipidique à squelette protéique complexe : assurant au GR une déformabilité lors de son passage dans les micro-vx , et des Ag polysaccharidiques des groupes sanguins .

. Le contenu : Eau, électrolytes (surtout  $K^+$ ), hémoglobine (1/3 du poids du GR), des enzymes et du glucose.

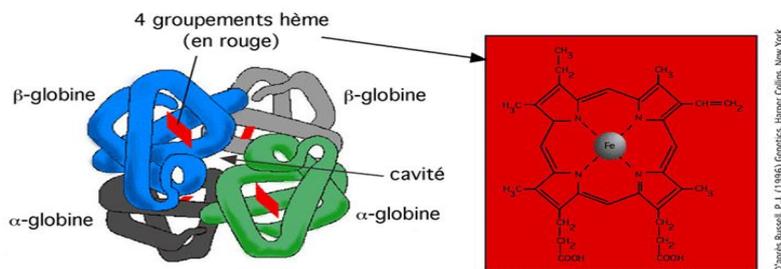
-Métabolisme : Un système enzymatique interne relié à la glycolyse assure la protection de l'Hb et de la membrane contre l'oxydation.

Le GR puise son énergie grâce au catabolisme du glucose plasmatique qui y pénètre librement car il n'existe pas de stock de glycogène.

Le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate par l'hexokinase qui sera catabolisé par deux voies .



1-2/ L'Hémoglobine : Le constituant essentiel de l'Hématie, c'est un pigment rouge qui donne aux GR leur couleur. L'Hb est un tétramère : de 4 sous-unités contiennent chacune :  
 Une molécule protéique : les chaînes de globine (alpha et bêta).  
 Une molécule protoporphyrinique : l'hème, constitué par un noyau tétrapyrolique avec atome de fer centrale qui fixe l'O<sub>2</sub>. NB : l'hème est à l'état fonctionnel si le fer est ferreux Fe<sup>++</sup>.



1-3/ La membrane et l'Hb du GR doivent être maintenus en bon état de fonctionnement ce qui nécessite de l'énergie, puisée du métabolisme du GR.

Les enzymes érythrocytaires assurent la protection de l'Hémoglobine et de la membrane contre l'oxydation.

Ex : G6PD, Glutathion réductase, pyruvate kinase ....

2/ L'Hémolyse physiologique

La destruction du GR se fait après une vie de 120 j , elle est compensée immédiatement par la Moelle Osseuse, sans répercussion clinique ni biologique.

Cette hémolyse physiologique est essentiellement intra-tissulaire.

2-1/ Hémolyse intra-tissulaire (85%)

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 sphéricité

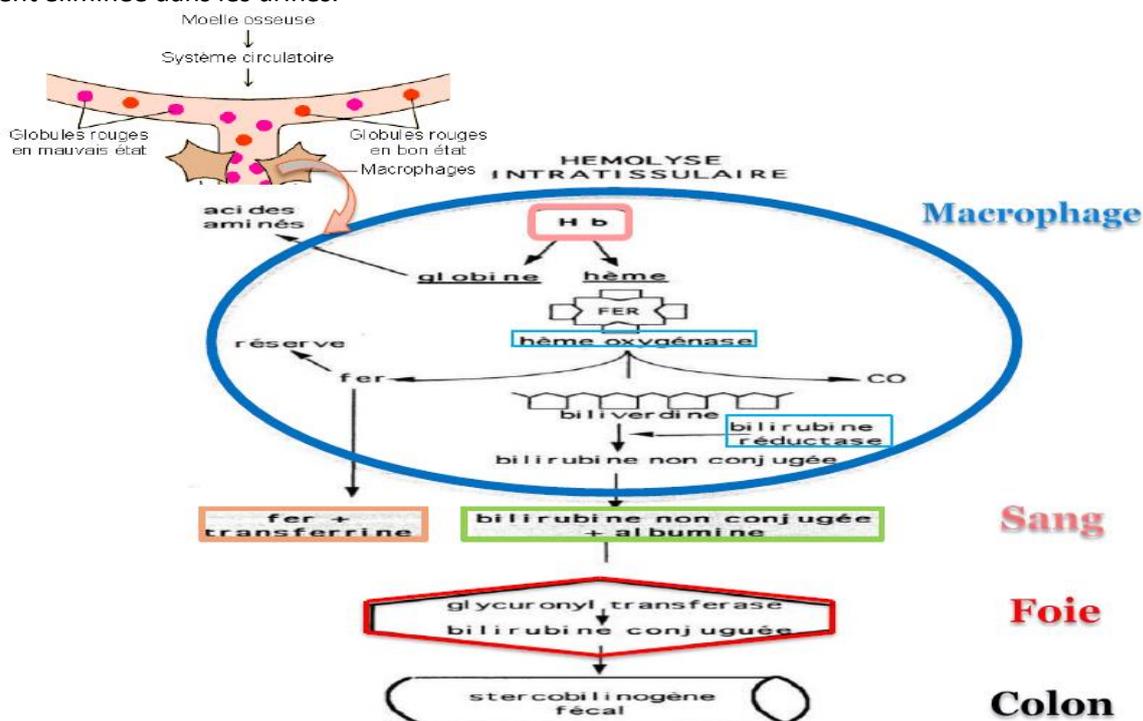
-Modifications de la plasticité : diminution de la déformabilité.

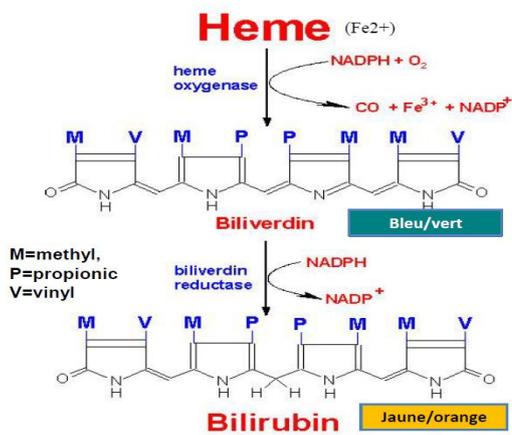
Une suite de réactions va dissocier l'Hb en globine et en hème : La globine est dégradée (catabolisme des protéines), Le fer de l'hème est recyclé dans l'érythropoïèse ou stocké dans les macrophages,

L'hème est dégradé → biliverdine → bilirubine

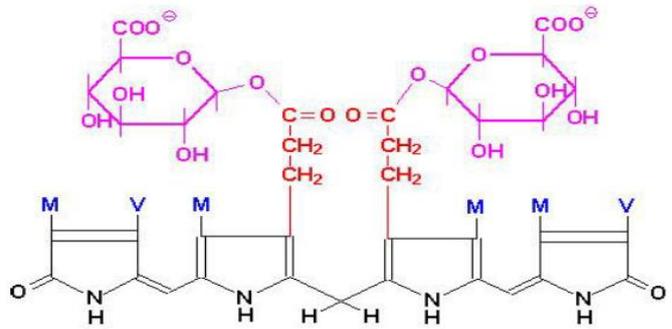
La bilirubine est d'abord appelée « libre », véhiculée dans le plasma par l'albumine, qui la transporte jusqu'aux hépatocytes ; où est glucuroconjuguée par l'enzyme : UDP -glucuronyl transférase (UGT1A1) (2 molécules de glucuronide / molécule de bilirubine), et devient soluble ;

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 est réabsorbée (cycle entéro-hépatique) et finalement éliminée dans les urines.





**CONJUGAISON HEPATIQUE DE LA BILIRUBINE: UGT1A1**



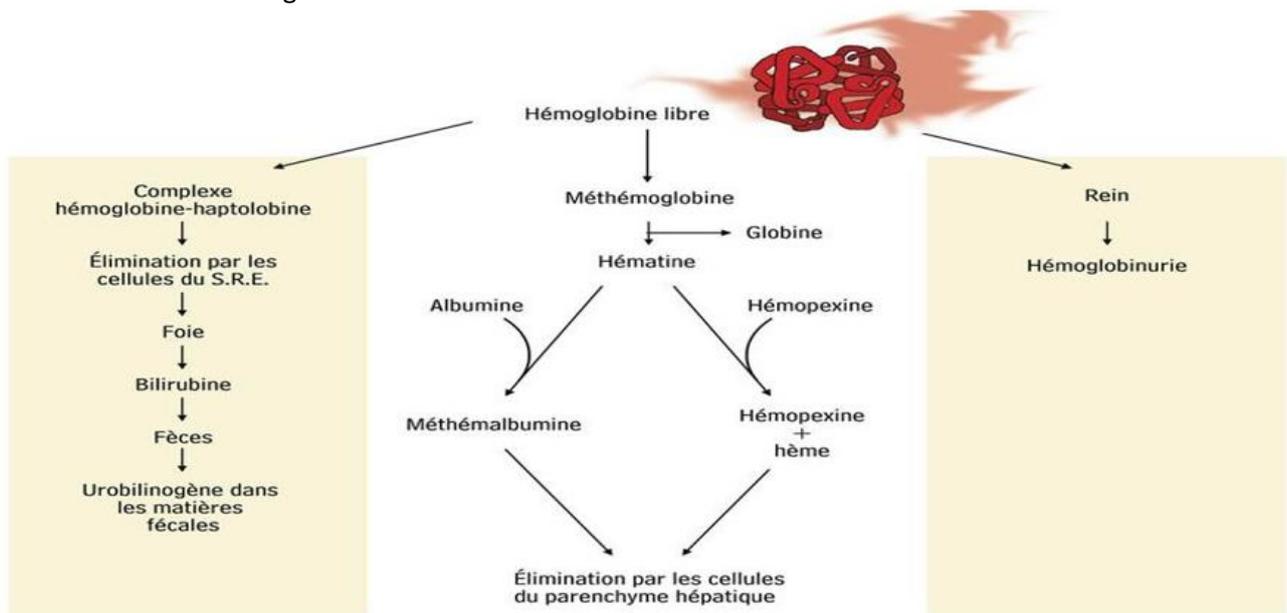
**2-2/ Hémolyse intravasculaire (15%) :**

Une faible partie de l'hémolyse se déroule au niveau de la circulation sanguine :

l'hémoglobine est libérée dans le plasma où elle forme un complexe avec l'haptoglobine (alpha 2 globuline synthétisée par le foie). Ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'hémoglobine est dégradée. L'Hb peut s'auto-oxyde en méthémoglobine qui se dissocie en globine et hématine. L'hématine forme un complexe avec l'hémopexine (bêta glycoprotéine synthétisée par le foie) ou avec l'albumine.

Le complexe hémopexine – hème est capté par les hépatocytes : l'hémopexine est libérée et retourne dans le plasma tandis que l'hème est dégradé.

Si la capacité de fixation de l'haptoglobine est débordée, l'hémoglobine en excès reste libre et traverse le filtre glomérulaire → une hémoglobinurie.



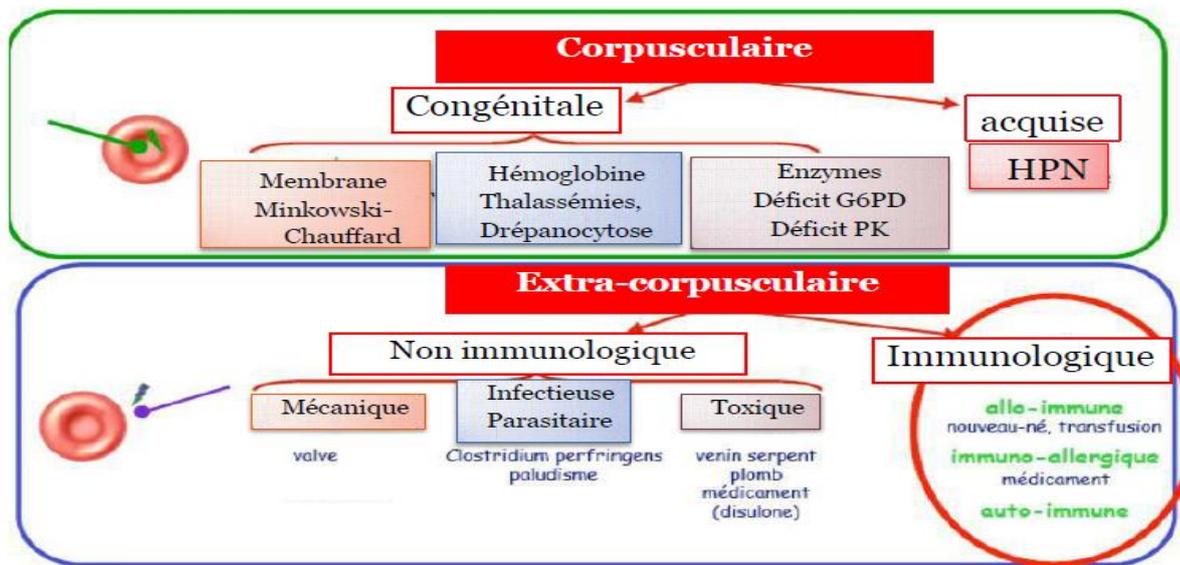
**3/ Hyper-Hémolyse =Hémolyse Pathologique**

L'hyper-hémolyse est due à un vieillissement prématuré des GR, une destruction indépendante de leur âge.

la ↓ de la durée de vie du GR entraîne une anémie hémolytique qui peut être :

- Intrinsèque (Hémolyse corpusculaire), ou extrinsèque (Hémolyse extra-corpusculaire).
- Congénital ou acquis,

Il affecte toujours un des constituants vitaux du GR : membrane, enzyme, Hb.



4/ Clinique de l'hyper-hémolyse : L'anémie s'instaure en cas de persistance de l'hyperhémolyse

- Hyper hémolyse intra-vasculaire : urine porto +à +++ (couleur rouge brunde l'urine), douleur lombaire, ictère : 0 à secondaire.
- Hyper hémolyse intra-tissulaire : ictère +++d'emblée, splénomégalie d'emblée.

5/ Biologie de l'hyper-hémolyse : en plus de la modification de certains paramètres hémobioologique , il y a modification de certains paramètres biochimiques :

Hémolyse intra-tissulaire	Hémolyse intra-vasculaire
<b>Bilirubine libre très élevée</b> ↑↑↑	Bilirubine libre élevée ↑
Bilirubine conjuguée normale	Bilirubine conjuguée normale
<b>Fer sérique</b> ↑	-
Lactate déshydrogénase (LDH) ↑	Lactate déshydrogénase (LDH) ↑
-	<b>Potassium</b> ↑
Haptoglobine ↓ (0.1 - 0.5) g/L VN: 0.7-2.5g/L	<b>Haptoglobine effondrée</b> ↓↓↓ : < 0.1 g/L VN: 0.7-2.5g/L
-	<b>Hémoglobinémie</b>
<b>Stercobilinogène fécal</b> ↑ <b>Urobilinurie</b>	<b>Hémoglobinurie (urines Porto Coca-cola)</b>

NB : Dans l'hémolyse, on ne retrouve jamais de bilirubine dans les urines.

6/ Exploration biochimique :

6-1/ Causes de l'hémolyse dans l'échantillon :

- Aspiration trop rapide du sang dans le tube
- Pose trop prolongée d'un garrot
- Utilisation d'aiguilles trop fines
- Agitation trop vigoureuse d'un échantillon
- Pathologies causant l'hémolyse.

6-2/ Paramètres hémobiologies :

- FNS : formule numérotation sanguine : type l'anémie si elle existe et apprécier les degrés de l'hyper hémolyse.
- Groupage : Transfusion urgente (en cas d'hyper hémolyse aigue).
- Taux de réticulocytes : qui est toujours élevé, il apprécie le rôle régulateur médullaire.
- Frottis sanguin : il révèle une anomalie morphologique des GR : sphérocytes, acanthocytes, schizocytes, corps de Heinz, plasmodium (effectuer goutte épaisse).

6-3/ Paramètres biochimiques :

6-3-1/ Bilirubine

- Prélèvement : Sérum ou plasma recueil 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 :

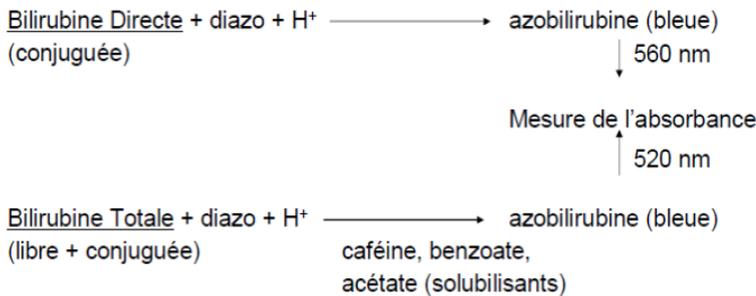
Dosage par colorimétrie après diazotation

Détermination par spectrométrie après séparation par chromatographie liquide haute pression (HPLC)

-Principe de la réaction colorée ( la diazoreaction) : elle se fait en deux étapes:

Préparation du diazoréactif: (Ehrlich , 1884.)

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



-Valeurs usuelles

Sujet Adulte : B Total < 17  $\mu\text{moles/L}$  (< 10 mg / L), B Direct < 3.4  $\mu\text{moles/L}$  (< 2 mg / L)

N nés < 1 mois : B Total < 80 mg/L, B Direct < 20 mg/L

Seuil critique pour bilirubine nouveau-né < 10 jours : > 250  $\mu\text{moles/L}$  → risque d'ictère nucléaire.

-Variations pathologiques

↗BRB libre: destruction exagérée des hématies , déficit de la glucurono-conjugaison

↗BRB conjuguée: Maladies congénitales par défaut d'excrétion, Cholestases intra et extra-hépatiques

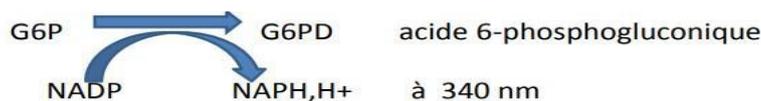
6-3-2/ haptoglobine sérique , valeurs usuelle :0,16 –1,8g/l ,elle est dosée par Immuno-turbidimétrie.

6-3-3/ LDH sérique



La concentration de l'LDH dans l'échantillon est proportionnelle à la diminution de l'absorbance à 340 nm provoquée par l'oxydation du NADH, H<sup>+</sup> en NAD<sup>+</sup>.

6-3-4/ G6PD : le dosage de l'activité de la G6PD effectué sur un hémolysât, on suit la vitesse de formation du NADPH, H<sup>+</sup> à 340nm



6-3-5/ Pyruvate kinase: dosage de l'activité de la PK effectué sur un hémolysât on mesure la disparition de NADH, H<sup>+</sup> à 340nm.



6-3-6 / Fer sérique / CFT (capacité de fixation de la transferrine)

6-3-7 /dosage de l'hémoglobine libre plasmatique

6-3-8 / recherche d'une hémoglobinurie

## CONCLUSION

L'hémolyse physiologique correspond à la destruction irréversible des GR vieilliss arrivés au terme de leur durée de vie.

L'hémolyse pathologique amplifie l'un ou l'autre de ces 2 mécanismes.

Liée soit à des anomalies corpusculaires (presque exclusivement constitutionnelles) ou extra corpusculaires.

Les anémies hémolytiques congénitales sont assez fréquentes dans notre pays.

L'exploration de l'hémolyse repose sur des paramètres Hémobiologiques et Biochimiques.