

Modifications morphologiques et biochimiques des érythrocytes après un traitement enzymatique. Effet de la sialidase et de la glycosidase.

Ing. V. BOUCKAERT
Ing. Th. WALRAVENS
ISICht – Mons

La déformabilité des globules rouges peut être altérée par divers facteurs comme la perte de résidus d'acides sialiques présents sur leur membrane. Cette perte d'acide sialique est observée en cas de sepsis, infection due à la présence de microorganismes dans le sang. Le but de ce travail est d'observer une modification de la forme des globules rouges après désialylation de la membrane.

Mots-clefs : globules rouges, sepsis, forme, enzymes.

The deformability of the red blood cells can be modified by different things as the loss of sialic acid. The acid sialic's loss can be observed in sepsis, in other words, the presence of microorganisms in the blood. The aim of this work is to observe a variation of the red blood cell's shape after a desialylation of the membrane.

Keywords: red blood cell, sepsis, shape, enzymes.

1. Introduction

Ce travail a été réalisé au laboratoire de biologie expérimentale de l'hôpital Vésale à Montigny-le-Tilleul, sous la direction du Docteur M. Vanhaeverbeek et de Monsieur K.Zouaoui.

Le sepsis est une maladie caractérisée par la présence dans le sang de bactéries qui s'y sont introduites et s'y sont multipliées au départ d'une blessure ou d'une intervention chirurgicale. De nombreuses études s'attardent sur le sepsis car il est une des causes principales de décès dans les unités de soins intensifs.

Des études ont montré que la déformabilité des globules rouges peut être altérée par divers facteurs comme la perte de résidus d'acides sialiques présents sur leur membrane. Divers mécanismes peuvent être mis en cause dans cette diminution d'acide sialique contenu à la surface des érythrocytes (globules rouges).

Il a été également observé in vivo que le sepsis provoquait une augmentation du lactate et du 2,3 diphosphoglycérate intra érythrocytaire.

Pour expliquer les mécanismes impliqués dans ces différents phénomènes, un sepsis artificiel sera recréé sur des globules rouges provenant de patients sains, qui subiront un traitement enzymatique à l'aide d'une sialidase (ou une glycosidase), enzyme clivant la liaison entre la protéine et l'acide sialique. Le but est, à partir de globules rouges sains, d'aboutir aux mêmes observations que celles constatées sur des globules rouges de patients atteints de sepsis.

2. Notions théoriques

2.1 Le sepsis

Le sepsis est un syndrome correspondant à une réaction de l'organisme à une infection.

Le sepsis est identifié si au moins deux des symptômes suivants sont observés :

- Température corporelle supérieure à 38°C ou inférieure à 36°C.
- Rythme cardiaque supérieur à 90 battements par minute.

- Rythme respiratoire supérieur à 20 souffles par minute, ou pression partielle en dioxyde de carbone (PaCO_2) inférieure à 32 mm de mercure.
- Nombre de globules blancs supérieur à $12000/\text{mm}^3$ ou inférieur à $4000/\text{mm}^3$ ou plus de 10% de formes immatures.

Ces critères ne sont pas spécifiques d'une identification de patients septiques mais ils sont tout de même assez sensibles.

Le sepsis peut résulter d'une infection par des champignons (de type *Candida*), des protozoaires (*Plasmodium falciparum*), des bactéries (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et de certains virus (Adénovirus, herpès).

Les différentes modifications biochimiques du globule rouge lors du sepsis sont reprises ci-dessous :

1. Augmentation du 2,3 Diphosphoglycérate, intermédiaire de la glycolyse. Cette augmentation peut être responsable de la diminution de la déformabilité des érythrocytes.
2. Diminution du taux d'acide sialique à la surface des globules rouges qui est associée à une modification de la forme des érythrocytes dans le cas de patients atteints de sepsis mais aussi dans le cas de diabète.

2.2 Les globules rouges

Le sang est constitué de plasma et de différentes populations de cellules produites au niveau des tissus hématopoïétiques (os plats du tronc, extrémités du fémur et de l'humérus).

A partir d'une seule cellule (cellule souche), trois lignées sont formées : celle des globules rouges, celle des globules blancs et celle des plaquettes. Chaque lignée possède un processus de maturation différent. Pour les globules rouges, le processus de maturation se nomme l'érythropoïèse.

Un globule rouge a une durée de vie de 120 jours. La destruction des hématies (ou globule rouge) se fait ensuite par l'intermédiaire des cellules macrophages (cellules possédant des capacités d'absorption et de digestion)

de la rate, de la moelle osseuse et du foie. Les éléments issus de cette dégradation vont être ensuite utilisés pour la fabrication d'autres globules rouges mais également d'autres cellules de l'organisme.

Les globules rouges sont dépourvus de noyau, ont une forme biconcave et ont un diamètre de 7 à 8 μm (figure 1).



Figure 1 : Globules rouges vus au microscope électronique à balayage

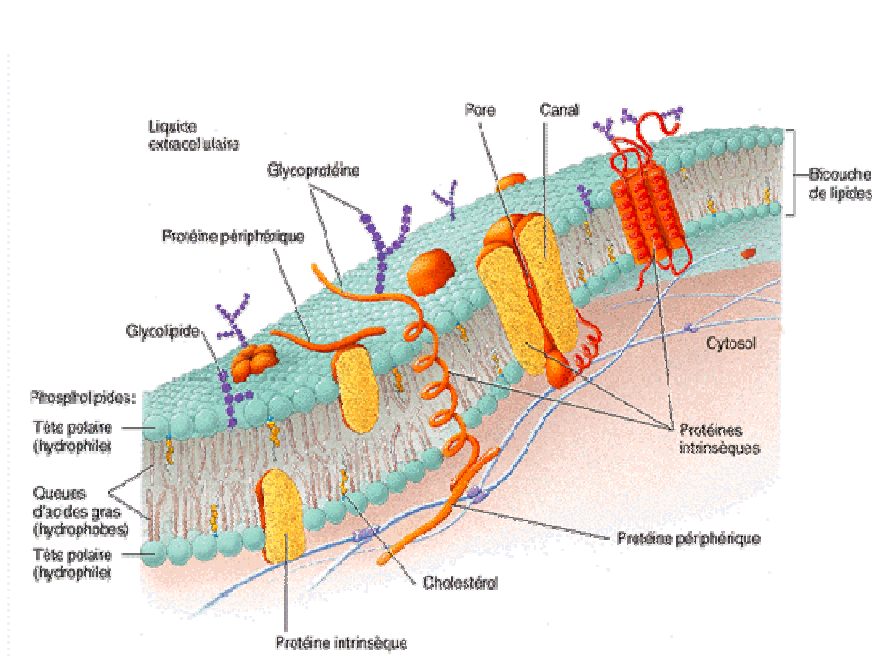


Figure 2 : Schéma représentant la membrane d'un globule rouge

La membrane du globule rouge est constituée d'une double couche lipidique et de protéines intrinsèques qui sont liées grâce à des interactions polaires (figure 2).

Cet arrangement moléculaire des phospholipides en une double couche isolante lui donne des propriétés remarquables. Cette barrière est fluide ce qui lui confère une grande extensibilité et permet ainsi à la cellule de se déformer.

Les protéines insérées dans la membrane sont classées en deux groupes : les protéines intrinsèques et les protéines périphériques. Les protéines membranaires qui portent des groupements glucidiques sont appelées des glycoprotéines.

Les glycoprotéines sont des structures linéaires ou ramifiées contenant plusieurs résidus monosaccharidiques. Le monosaccharide final est souvent un résidu d'acide sialique.

Il existe deux types de liaisons glycosidiques :

- Les liaisons N-glycosidiques qui se distinguent par la présence d'une liaison impliquant l'asparagine
- Les liaisons O-glycosidiques qui se distinguent par la présence d'une liaison acétyl entre un hydroxyde dans une chaîne latérale d'un acide aminé (souvent un résidu sérine ou thréonine) et un résidu de sucre.

2.3 L'acide sialique

Les acides sialiques constituent une famille d'une vingtaine de molécules organiques ayant comme point commun un squelette de neuf atomes de carbones : l'acide neuraminique.

L'acide neuraminique n'existe pas à l'état libre mais sous forme de combinaisons. Ces combinaisons forment les acides sialiques, dont le plus intéressant en biologie est l'acide N-acétyl neuraminique (figure 3).

Les acides sialiques interviennent dans la constitution des glycoprotéines et des glycolipides des membranes cellulaires.

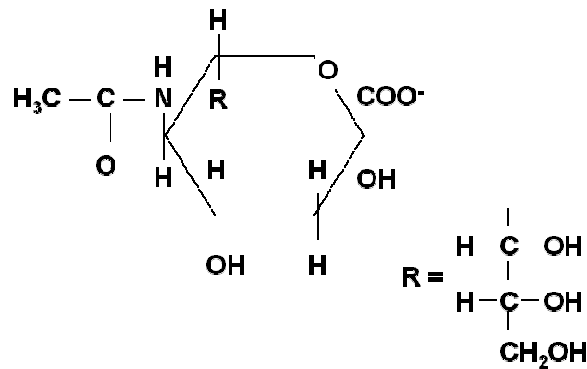


Figure 3 : Structure de l'acide N-acétylneuraminique

Rôles biologiques des acides sialiques

L'abondance au niveau des cellules et leur charge fortement négative laissent présager de nombreuses fonctions cellulaires :

- Les acides sialiques sont impliqués dans le transport de composés chargés positivement ainsi que dans les phénomènes d'agrégation et de désagrégation.
- Ils influencent la conformation spatiale des glycoprotéines.
- Ils sont les composants essentiels de récepteurs pour des agents comme les peptides, toxines, virus, etc.
- L'acide sialique joue le rôle d'intermédiaire dans plusieurs processus physiopathologiques comme l'activation lymphocytaire et la différenciation cellulaire.

3. Plan de la partie expérimentale

3.1 Première partie

- Traitement enzymatique des globules rouges par des concentrations croissantes en neuraminidase. Observation de l'évolution des GR (globules rouges) sur 24 heures.
- Etablissement des conditions opératoires pour les dosages ultérieurs.

3.2 Deuxième partie

Après traitement enzymatique des GR suivant les conditions établies :

- Dosage de l'acide sialique libre
- Dosage du 2,3 diphosphoglycérate
- Dosage du lactate intra-érythrocytaire

4. Matériel et méthodes

Le cytomètre en flux

La cytométrie en flux est une technique utilisée pour mesurer différents paramètres sur des cellules individuelles (taille, forme, etc.).

Cette technique permet l'étude précise d'une grande quantité de cellules isolées entraînées dans un flux liquide. Les cellules, alignées les unes derrière les autres et séparées d'au moins 1 mm, défilent à grande vitesse (plus de 30 km/h) devant une source lumineuse, le plus souvent un laser (figure 4).

Les particules émettent des informations lumineuses lors de leur passage devant le laser. Les signaux sont visualisés, après traitement par le système informatique Cellquest®, sous forme de graphiques bidimensionnels ou d'histogrammes.

Pour l'estimation de la forme des érythrocytes, on utilise la lumière FSC (forward light scatter channel). Les résultats sont sous forme d'histogrammes représentant la distribution de la forme des globules rouges (si la distribution est bimodale, les érythrocytes sont biconcaves).

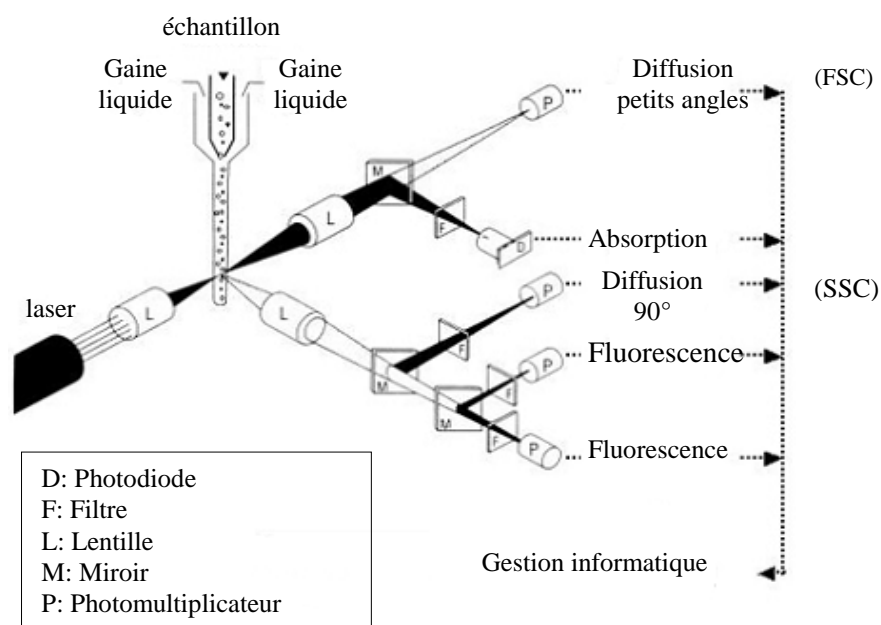


Figure 4 : Schéma de principe d'un cytomètre en flux

De ces histogrammes, plusieurs valeurs sont extraites : la moyenne, la médiane et l'écart type. Ces informations entrent dans le calcul du moment ou le PCD (Pearson Coefficient Dissymetry). Celui-ci représente l'asymétrie des histogrammes obtenus.

$$\text{PCD} = \text{moment} = 3 \times [(\text{moyenne} - \text{médiane}) / \text{écart type}]$$

Un moment négatif indique une symétrie à gauche. Donc, plus le moment augmente, plus le globule rouge devient sphérique et non plus biconcave. Donc, si le moment est égal à zéro, cela signifie que le globule (ou la particule en général) est une sphère parfaite.

Dans cette étude, trois enzymes différentes ont été utilisées :

- Une sialidase (ou neuraminidase).
- Deux glycosidases : O-glycosidase.
N-glycosidase.

Chaque enzyme étant spécifique, elles ne clivent pas les mêmes groupements présents sur la membrane du globule rouge.

5. Résultats

5.1 Mesure du moment des globules rouges en présence de neuraminidase

Le prélèvement de globules rouges s'est fait sur 6 volontaires différents (n = 6). Les échantillons ont été traités avec des concentrations croissantes de neuraminidase (de 0.031 à 0.25 U/ml), en n'oubliant pas de garder un échantillon non traité. Celui-là nous sert de contrôle, de point de repère pour une comparaison entre les différentes évolutions.

A chaque mesure au cytomètre en flux aux divers temps d'incubation, la moyenne et l'écart-type de la moyenne sont calculés.

On porte ensuite en graphique pour chaque condition (les 4 concentrations de neuraminidase différentes et un contrôle) la moyenne du moment et son écart type en fonction du temps (figure 5).

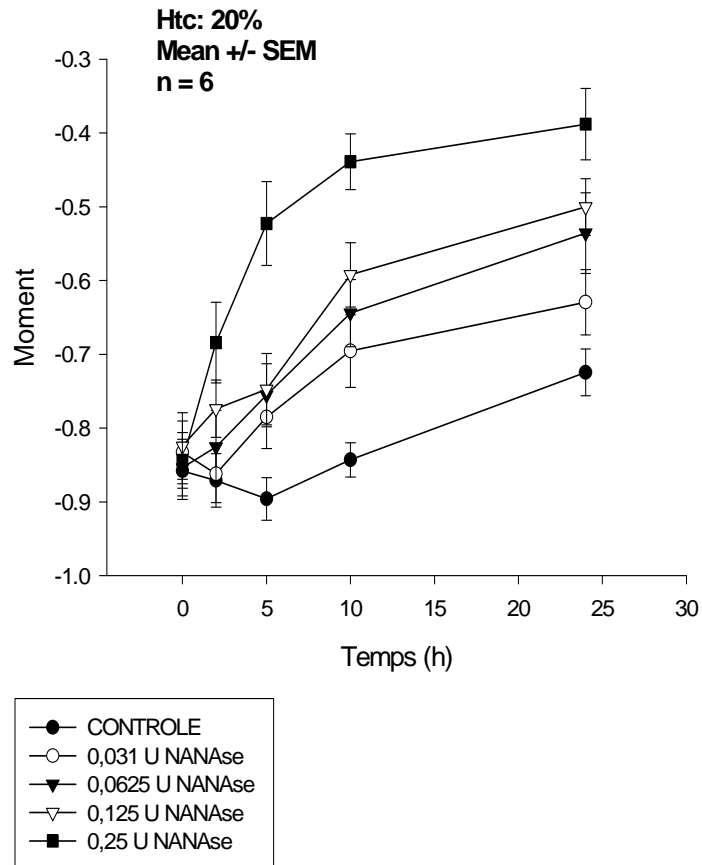


Figure 5 : Evolution du moment des globules rouges à différentes concentrations de neuraminidase en fonction du temps

Le contrôle (●) évolue faiblement au cours du temps. Cette variation est sans doute due au vieillissement du sang car celui-ci est mis à incuber pendant une période de 24 heures..

Les courbes représentant l'évolution du moment des globules rouges traités à la neuraminidase ont toutes la même allure c'est-à-dire une augmentation plus ou moins importante suivant la concentration en enzyme et ce, jusque 10 heures d'incubation. Ensuite, il y a apparition d'un plateau ; les moments restent stables.

La valeur du plateau atteint dépend de la concentration en enzyme : si la concentration en enzyme augmente, la valeur du plateau augmente également.

Cette première expérience correspond à la première étape du travail qui vise à montrer l'action de la neuraminidase sur la forme des globules rouges et à établir des conditions de travail à appliquer sur d'autres échantillons pour les différents dosages intra-érythrocytaires.

Le premier objectif est atteint puisque les calculs du moment et la visualisation des globules rouges au microscope montrent une modification de la forme des érythrocytes traités à la neuraminidase quelle que soit sa concentration.

La perte d'acide sialique entraîne une évolution de la forme biconcave vers une forme sphérique.

5.2 Dosage de l'acide sialique libre

Le but de ce dosage est de prouver que la neuraminidase a libéré des résidus d'acide sialique. Ce dosage se fait donc sur le surnageant.

Après traitement statistique des résultats (figure 6), il apparaît que la différence entre les deux séries est significative ($p=0.002$).

En clair, nous retrouvons plus d'acide sialique libre après que l'échantillon soit resté en contact avec de la neuraminidase.

L'enzyme, la neuraminidase, a bien une action de clivage des résidus d'acides sialiques présents à la surface des globules rouges.

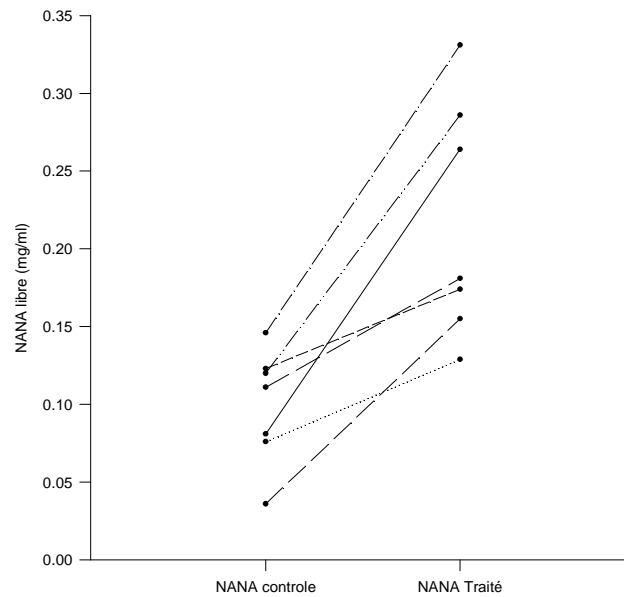


Figure 6 : Comparaison de la concentration en acide sialique libre des deux séries d'échantillons (contrôle et traité à la neuraminidase)

5.3 Dosage du 2,3 Diphosphoglycérate

Le changement de forme dû à la désialylation de la membrane des globules rouges a sûrement une influence sur le métabolisme des érythrocytes. Voilà pourquoi, nous dosons le 2,3 DPG sur une série d'échantillons non traités (contrôle) et une série d'échantillons traités à la neuraminidase. Chaque série comprend 12 échantillons de volontaires différents (n=12). Les résultats sont portés en graphique (figure 7).

Après traitement statistique des données, il apparaît que la différence entre les deux séries est significative.

Sur le graphique portant les valeurs obtenues pour le dosage du 2,3 DPG, il apparaît que l'augmentation de 2,3 DPG dans les globules rouges traités par l'enzyme durant 10 heures à 37°C varie fortement d'un échantillon à l'autre, avec un cas particulier où il y a une diminution de la concentration en 2,3

DPG pouvant provenir d'une erreur de manipulation ou d'une physiologie différente de cet échantillon.

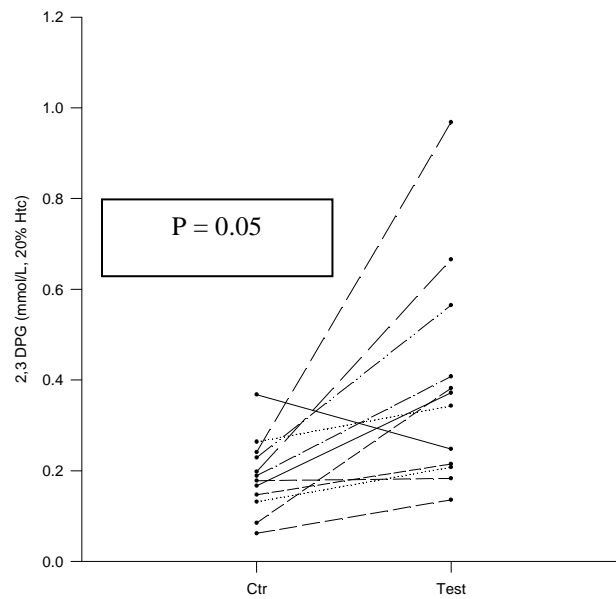


Figure 7 : Comparaison de la concentration en 2,3 DPG pour les deux séries d'échantillons

La neuraminidase, en clivant les résidus d'acides sialique portés par les glycoprotéines membranaires, modifie le métabolisme du globule rouge et plus particulièrement la glycolyse.

Si le 2,3 DPG augmente à l'intérieur du globule rouge, deux hypothèses peuvent être avancées :

- Le blocage de la glycolyse au niveau de ce métabolite
- L'absorption plus importante de glucose, la glycolyse est stimulée.

5.4 Dosage du lactate érythrocytaire

L'intérêt de ce dosage réside dans le fait que le lactate emprunte des voies métaboliques différentes de celles empruntées par le 2,3 diphosphoglycérate.

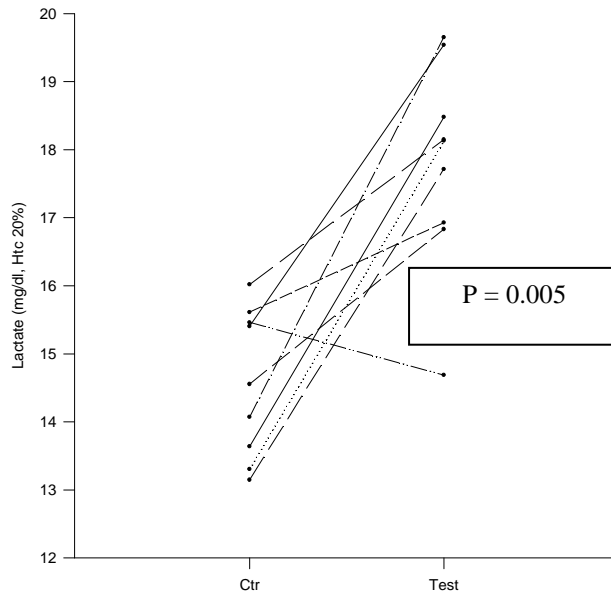


Figure 8 : Comparaison entre les concentrations en lactate pour les deux séries d'échantillons

Ce dosage permet de montrer si l'action enzymatique de la neuraminidase cible le métabolisme global du globule rouge ou une voie particulière. Comme pour les précédents dosages, celui-ci s'effectue sur deux séries après 10 heures d'incubation à 37°C (une série contrôle et une série traitée).

Après traitement statistique des résultats obtenus, il s'avère qu'une différence significative existe entre les deux séries (figure 8).

La concentration en lactate augmente fortement dans la majorité des cas. Cependant, dans un seul cas, on note une diminution non négligeable de la concentration en lactate pouvant provenir d'une erreur de manipulation ou d'un comportement différent de l'échantillon vis-à-vis de la neuraminidase.

La neuraminidase a une action sur le métabolisme du lactate en plus de son action sur la forme des globules rouges. Cette dernière est confirmée par la

mesure du globule rouge au cytomètre après application du traitement enzymatique.

L'explication de cette augmentation du lactate intra-érythrocytaire repose sur l'hypothèse suivante :

- La modification des canaux de transport membranaires qui concentrent le lactate dans le globule rouge au lieu de l'évacuer vers le milieu extérieur.

6. Conclusions

Suite aux observations réalisées in vivo sur des globules rouges de patients atteints de sepsis, il était intéressant de reproduire in vitro ces phénomènes en faisant subir un traitement enzymatique à des globules rouges de patients sains. L'objectif final serait d'éclaircir les mécanismes responsables de l'altération des capacités des globules rouges lors du sepsis.

Lors de cette infection, les constatations effectuées sur les érythrocytes sont une modification de la forme des globules rouges, la perte de résidus d'acides sialiques présents sur les glycoprotéines membranaires et une augmentation de la concentration intra-érythrocytaire en 2,3 diphosphoglycérate et en lactate.

La première étape consiste à obtenir des globules rouges dont la forme tend vers un arrangement sphérique et dont la membrane apparaît spiculée.

Pour y arriver, différentes études ont été réalisées en utilisant plusieurs enzymes, à savoir la neuraminidase et les glycosidases.

Les résultats sont obtenus en mettant en contact, pendant des laps de temps différents, des globules rouges de patients sains avec une enzyme.

D'une part, la neuraminidase a une action importante sur la forme du globule rouge puisque cette enzyme contribue à le rendre plus sphérique. L'action de la sialidase est vérifiée par le dosage de l'acide sialique libre qui démontre une nette augmentation de celui-ci après l'action de l'enzyme. Il existe donc un lien entre la désyalilation des protéines membranaires des érythrocytes et la sphéricité de ces mêmes érythrocytes.

D'autre part, divers métabolites du globule rouge ont été dosés après un traitement enzymatique dans des conditions définies lors de la première étape. L'hypothèse suggérait que l'arrondissement du globule rouge

provoqué par la neuraminidase ne peut laisser intact le métabolisme du globule rouge.

Les variations du lactate et du 2,3 diphosphoglycérate intra-érythrocytaires observées après le traitement enzymatique sont une augmentation du lactate intra-érythrocytaire et une augmentation du 2,3 diphosphoglycérate intra-érythrocytaire. Ces deux observations concordent avec les observations effectuées sur des globules rouges de patients atteints de sepsis.

7. Références bibliographiques

- [1] BASKURT O., GELMONT D., MEISELMAN H., *Red blood cell deformability in sepsis*, American journal of respiratory and critical care medicine, Vol. 157, 1998, pages 421-427.
- [2] BASTIN D., *Etude de l'acide sialique lié aux glycoprotéines dans deux situations pathologiques : le diabète et le sepsis*, Travail de fin d'études, ISIC Mons, 2000.
- [3] BULAI T ; BRATOSIN D., ARTENIE V., MONTREUIL J., *Uptake of sialic acid by human erythrocyte. Characterization of a transport system*, dans Elsevier, Vol 85 (1-2), Janvier 2003, pages 241-4.
- [4] DENIS M., mémoire de licence, *Elaboration et optimisation d'une synthèse reproductible de colloïdes nanoparticulaires magnétiques*, Université de Mons, 2002.
- [5] NICOTRA C., *La cytométrie en flux*, Marseille : centre d'océanologie et de biogéochimie.
- [6] ICHAI C., LEVRAUT J., LEVERVE X., GRIMAUD D., *Vie et Mort du lactate*.
- [7] LEE R., FOERSTER J., LUKENS J., PRASKEVAS F., GREER J., RODGERS G., *Wintrobe's clinical hematology*, 10^{ème} édition, Vol 1, Editions Williams and Wilkins, 1999, pages 212-214 et 220-222.
- [8] LEHOT JJ., ELARBY C., VALLON JJ., MOTIN J., *Hemoglobin dissociation curve and 2,3 diphosphoglycerate in erythrocytes in septic shock*, dans Revue Française d'anesthésie et de réanimation, Vol 3, 1984, pages 85-9.
- [9] MARCOUX S., *Dosage de l'acide sialique lié aux protéines sériques par une méthode enzymatique. Applications à l'usage des microplaques*, Travail de fin d'études, ISIC Mons, 1997.
- [10] PIAGNERELLI M., ZOUAOUI K., BROHEE D., PIRO P., VINCENT JL., LEJEUNE P., VAN HAEVERBEEK M., *Altérations of red blood cell shape*

- and sialic acid membrane content in septic patients*, dans *Critical Care Medicine* Vol 31, 2003, N°8, pages 2156-62.
- [11] PIAGNERELLI M., ZOUAOU K., VINCENT JL., VAN HAEVERBEEK M., *Red blood cell rheology in sepsis*, dans *Intensive Care Medicine* Vol 29, 2003, pages 1052-61.
- [12] PIAGNERELLI M., ZOUAOU K., BROHEE D., VEREESTRAETEN A., VINCENT JL., LEJEUNE P., VAN HAEVERBEEK M., *Assesment of erythrocyte shape by flow cytometry in various diseases* dans *Clinical hemorheology and microcirculation*, 2003, 3 (suppl.1), 59.2 (abstract).
- [13] PLUMMER T., ELDER JH., ALEXANDER S., PHELAN AW., *Demonstration of peptide : N-glycosidase F activity in endo-beta-N-acetylglucosaminidase F preparations* dans *Journal of biology chemical*, Vol 259, Sept. 1984, 10700-4.
- [14] ROBERT FA., COENRAAD HEMKER H., *Blood cell membranes and haemostasis* dans *Haemostasis*, Vol 11, 1982, pages 12-39.
- [15] SAKARYA S., ONCÜ S., *Bacterial adhesins and the role of sialic acid in bacterial adhesion* dans *Medecine Science monitor*, Vol 9, 2003, section RA76-82.
- [16] TODD J., MOLLITT D., *Effect of sepsis on erythrocyte intracellular calcium homeostasis* dans *Critical Care Medicine* Vol 23, 1995, pages 459-465.
- [17] TURCHETTI V., DE MATTEIS C., LEONCINI F., TRAVAZZINI L., *Variations of erythrocyte morphology in different pathologies* dans *Clinical hemorheology and microcirculation*, Vol 17, 1997, pages 209-215.