

EFFET DES VITAMINES B12, B9 ET B6 ET LEURS INTERACTIONS SUR LA FRAGILITE OSMOTIQUE DES ERYTHROCYTES HUMAINS

Reçu le 12/07/2000 – Accepté le 09/05/2001

Résumé

L'effet des vitamines B12, B9 et B6 sur la fragilité osmotique des érythrocytes humains a été exploré *in vitro*. De fortes concentrations de vitamines B12 et B6 ont protégé les érythrocytes de l'hémolyse hypotonique, avec une protection maxima atteinte respectivement à 10 et 500 µg/ml. A concentrations plus faibles, cependant, ces vitamines ont favorisé grandement l'hémolyse hypotonique. Par contre, la vitamine B9 a montré uniquement un effet hémolytique de 4 à 200 µg/ml. Cet effet peut être expliqué par la nature acide de la molécule.

L'effet nul sur la fragilité osmotique de deux vitamines antagonistes, peut probablement être expliqué par l'antagonisme partiel ou par la présence de ces deux vitamines simultanément: ces dernières se lient en quantités appréciables à la cellule intacte de même qu'à l'hémolysat et il y a compétition mutuelle entre ces vitamines et leur transport.

Mots-clefs: érythrocyte, hémolyse, cyanocobalamine, acide folique, pyridoxine.

Abstract

The effect of vitamins B12, B9 and B6 on osmotic fragility of human erythrocytes was investigated *in vitro*. High concentrations of vitamins B12 and B6 protected erythrocytes from hypotonic hemolysis, with maximum protection observed respectively at 10 and 500 µg/ml. At low concentrations, however, these vitamins greatly promoted hypotonic hemolysis. On the other hand vitamin B9 was only showed hemolytic effect at 4 for 200µg/ml. This effect can be explained by the nature of acidic molecules.

Probably no effect of two vitamins antagonists on osmotic fragility can be explained by the partial antagonism or by the presence of these two vitamins simultaneously. Vitamins are bound in appreciable amounts to the intact cell as well as ghost membranes and competes mutually for these vitamins and their transport.

Key words: erythrocyte, hemolysis, cyanocobalamin, folic acid, pyridoxin.

B. HOUCHER¹
D. NAIMI²
N. KEBIR¹
N. ABBAOUI¹
S. BEGAG¹

¹ Laboratoire de
Physiologie Cellulaire
Département de Biologie
Faculté des Sciences
Université de Sétif,
Sétif 19000, Algérie

² Laboratoire de Biologie-
Physiologie Cellulaire
Département de Biologie
Faculté des Sciences
Université de Constantine
Constantine, Algérie

ملخص

تمت دراسة تأثير الفيتامينات B12 و B9 و B6 على الهشاشة الأسموزية لكريات الدم الحمراء لدى الإنسان في الزجاج. تقي التراكيز العالية لكل من الفيتامينين B12 و B6 الكريات الدم الحمراء من الانحلال الأسموزي و تقدر الحماية العظمى في التركيزين 10 و 500 ميكروغرام/مل على التوالي لكل من هذين الفيتامينين. بينما ساعد هذين الفيتامينين في التراكيز الضعيفة على الانحلال. بالعكس أظهر الفيتامين B9 تأثيرا انحلاليا فقط من 40 إلى 200 ميكروغرام/مل ويمكن أن يفسر هذا التأثير بطبيعة هذه الجزيئة الحامضية.

يحتمل أن انعدام التأثير على الانحلال الأسموزي لكل من فيتامينين متضادين أن يفسر بالتضاد الجزئي أو بوجود لكل من هذين الفيتامينين في آن واحد. فترتبط هذه الفيتامينات بكميات معتبرة بالخلية الكاملة و كذلك بسائل الانحلال لكريات الدم الحمراء و ينتج عن ذلك تنافس متبادل بين هذه الفيتامينات و نقلها.

الكلمات المفتاحية: الكريات الدم الحمراء، انحلال، فيتامين B12 ، فيتامين B9 ، فيتامين B6.

Les érythrocytes sont d'excellents modèles biomembranaires utilisés dans les études de modèles biomembranaires utilisés dans les études d'interactions des médicaments et d'autres composés biologiques avec la membrane, et servent également comme modèle primaire de transport.

Les médicaments comme les anesthésiques, les tranquillisants et les anti-histamines diminuent la fragilité osmotique des érythrocytes humains [1]. Généralement, les effets de ces médicaments sur la fragilité osmotique sont biphasiques. Ces produits protègent les érythrocytes contre l'hémolyse hypotonique à des concentrations relativement faibles. Par contre, à de fortes concentrations, ils favorisent la destruction de la membrane [1, 2].

Il a été bien établi par la quasi-totalité des auteurs, que la perméabilité de la membrane érythrocytaire à plusieurs petites molécules neutres est caractérisée par deux modes de pénétration, et mettait en jeu deux mécanismes: l'un *via* la bicouche lipidique pour les molécules plus ou moins hydrophobes, l'autre, faisant intervenir essentiellement les protéines intégrées, localisées au niveau de la membrane. Plusieurs hypothèses ont été mises en cause, comme par exemple le poids moléculaire. Les disaccharides (saccharose, lactose, mélibiose, cellobiose, tréhalose, maltose et isomaltose) de poids moléculaire relativement élevé, ne sont pas transportés à travers la membrane des érythrocytes humains [3].

Mais le problème le plus difficile à résoudre est l'articulation entre les

deux systèmes. On ignore par quel mécanisme précis le mode du transport des vitamines B12, B9 et B6 se réalise au niveau des érythrocytes humains. A ce titre, le but de ce travail est d'essayer de mettre en évidence par voie expérimentale, l'hémolyse des érythrocytes humains provoquée dans des milieux hypotoniques, en présence de ces trois vitamines, comme informateurs dans le transport membranaire et de proposer le mécanisme de leurs interactions.

MATERIEL ET METHODES

Préparation des érythrocytes humains

Le sang veineux prélevé et recueilli dans des tubes héparinés, est obtenu de trois individus sains. Dans deux tubes, on met 5 ml du sang agité avec précaution par simple retournement afin d'éviter son hémolyse mécanique. Ensuite, ces deux tubes sont centrifugés à une vitesse de 3000 rpm pendant 5 min [4]. Après centrifugation, le surnageant est éliminé par aspiration à l'aide d'une pompe à vide. Le culot recueilli par centrifugation, est lavé trois fois avec une solution saline isotonique, obtenue par une dilution convenable de la solution stock (10 g/l) et conservée à froid (4°C), dont le volume représente 4 à 5 fois le volume du culot. La suspension est homogénéisée par retournement lors de chaque lavage, le surnageant et la couche d'interface sont éliminés par aspiration.

A l'issue de la dernière centrifugation un culot cellulaire est obtenu et dilué au 1/15 avec la même solution de lavage de façon à ce que les cellules et le milieu soient dans le rapport 1 à 14 (V/V).

Préparation des solutions de travail et des produits tests

Une solution de travail est préparée dans l'eau distillée, équivalente sur le plan osmotique à une solution de chlorure de sodium de 10 g/l (NaCl 9.0, Na₂HPO₄.2H₂O 1.366, NaH₂PO₄.2H₂O 0.243 g/l). Cette solution est tamponnée à pH 7.4 et conservée pour plusieurs jours [5]. Par dilutions convenables avec de l'eau distillée, on prépare des séries de tubes contenant 5 ml de solutions salines, dont les concentrations varient entre 0 et 9 g/l.

Des séries de gamme de concentrations de vitamine B12, B9 et B6 sont également préparées. L'ampoule de la vitamine B12 Cyanocobalamine (Vitamine B12® Gerda) représente une solution mère de concentration 250 µg/ml. Cette solution est conservée à l'abri de la lumière (photosensible).

A partir d'un comprimé de la vitamine B9 ou acide folique (Saidal) de 5 mg, une solution mère d'acide folique à 200 µg/ml a été réalisée dans un mélange (25ml) de solution physiologique/alcool absolu (4:1, v/v). Après dissolution, le pH est ajusté à 7.4. Enfin, à partir d'un comprimé de la vitamine B6 ou pyridoxine (Saidal) de 250 mg, une solution mère de cette vitamine à 12.5 mg/ml est préparée par dissolution du comprimé dans 20 ml de solution physiologique, puis le pH est ajusté à 7.4.

100 µl de ces solutions mères correspondent à des

concentrations 10, 8 et 500 µg/ml des vitamines B12, B9 et B6 respectivement dans un volume final de 2.5 ml de NaCl (C50). Des concentrations inférieures aux concentrations mères de ces vitamines sont obtenues par simple dilution avec l'eau distillée.

Détermination de la C50

La C50 représente la concentration de chlorure de sodium nécessaire pour produire 50% d'hémolyse. Celle-ci est déterminée à partir de plusieurs dilutions d'une solution mère de NaCl de 9.0 g/l allant de 9 à 0 g/l en NaCl.

150 µl de la suspension érythrocytaire préparée précédemment sont ajoutés dans chaque tube contenant 2.5 ml de NaCl hypotonique. Ces tubes sont ensuite homogénéisés par simple retournement et incubés à 37°C pendant 15 minutes dans un bain-marie. Les tubes sont centrifugés (3000 rpm; 5 min.) et l'absorbance du surnageant est mesurée à 540 nm (Pharmacia LKB. Novaspec II). Les courbes d'hémolyse obtenues à partir du sang frais de trois volontaires ont montré que la concentration de NaCl correspondant à 50% d'hémolyse (C50) est comprise entre 3.6 et 3.8 g/l.

Effet des vitamines sur l'hémolyse osmotique des érythrocytes

Dans chaque tube test contenant 2.5 ml de NaCl hypotonique (C50), on ajoute 100 µl de vitamines B12, B9 et B6 de concentrations variant de 0.2-10, 0.2-8 et 0.2-500 µg/ml respectivement; par contre, les tubes témoins reçoivent le même volume de solvant, et à la fin, tous les tubes sont homogénéisés au vortex.

A l'issue de ces préparations, on ajoute 150 µl de la suspension érythrocytaire dans chaque tube. L'homogénéisation du contenu se fait soigneusement par simple retournement à la main. Passé le délai d'incubation, 15 minutes dans un bain-marie à 37 °C, les tubes sont centrifugés (3000 rpm; 5 min.) et l'absorbance du surnageant est mesurée à 540 nm. L'hémolyse totale est représentée par le tube contenant 2.5 ml d'eau distillée et 100 µl de solvant.

L'effet combiné des deux vitamines sur l'hémolyse osmotique des érythrocytes, hémolytique/anti-hémolytique, est étudié dans les mêmes conditions décrites ci-dessus.

Analyse statistique

Les données présentées sont les moyennes des expériences de trois individus et sont analysées par le test "t-student". Les significations des différences entre les moyennes sont estimées selon les valeurs de p (à p inférieur à 0.05, les différences sont statistiquement significantes).

RESULTATS ET DISCUSSION

La cobalamine ou vitamine B12 est soluble dans l'eau [6]. Chaque type de cobalamine a un spectre d'absorption UV caractéristique avec un maximum d'absorption entre 340 et 361 nm et 519 et 550 nm. Son poids moléculaire est de 1355 dalton [7]. Par contre, l'acide folique ou vitamine

B9 est peu soluble dans l'eau mais soluble en milieu alcalin [8]. Son poids moléculaire est de 441 dalton [6]. Enfin, la pyridoxine ou la vitamine B6 est soluble dans l'alcool [6], comme elle est également soluble dans l'eau [9]. Son poids moléculaire est de 170 dalton [10].

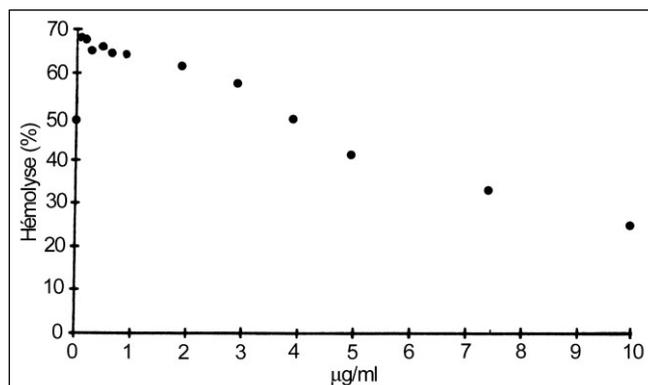


Figure 1: Effet de la vitamine B12 sur la fragilité osmotique des érythrocytes humains incubés dans du NaCl hypotonique (C_{50}).

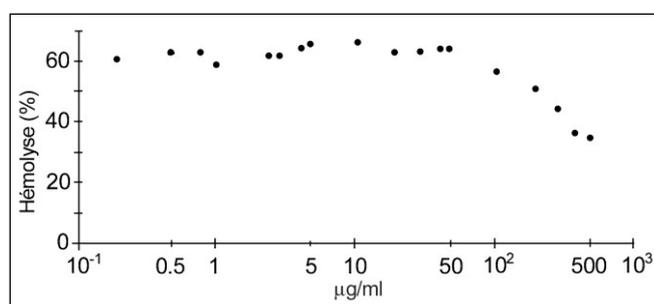


Figure 2: Effet de la vitamine B6 sur la fragilité osmotique des érythrocytes humains incubés dans du NaCl hypotonique (C_{50}).

L'effet de ces trois vitamines sur la fragilité osmotique des érythrocytes humains a été exploré *in-vitro*. Les résultats ont montré que les vitamines B12 et B6 exercent un effet biphasique (Fig. 1 et 2). De fortes concentrations de vitamines B12 (7.5-10 µg/ml) et B6 (300-500 µg/ml) ont protégé les érythrocytes de l'hémolyse hypotonique ($p < 0.05$). A concentrations plus faibles, cependant, la vitamine B12 (0.2-3.0 µg/ml) et B6 (0.2-100 µg/ml) ont grandement favorisé cette hémolyse hypotonique ($p < 0.05$). Cet effet biphasique va à l'encontre des travaux qui ont été réalisés sur une grande variété de produits comme les anesthésiques locaux, les tranquillisants et les antihistaminiques. Ces produits à faibles concentrations protègent les érythrocytes de l'hémolyse hypotonique; cependant, ceux-ci à fortes concentrations, favorisent cette dernière [1, 11, 12].

La protection des érythrocytes contre l'hémolyse hypotonique est associée à l'augmentation du rapport surface cellulaire/volume (expansion membranaire) [13]. Selon Van Steveninck et al. [13], cette protection est due à l'incorporation de ces produits au niveau de la membrane cellulaire et par conséquent, cette protection hémolytique

est interprétée par l'expansion membranaire qui est suivie par l'augmentation du volume cellulaire et ceci, avant la lyse. Cependant, cette hypothèse ne peut être considérée que dans le cas des produits amphiphiles [2]. Par contre, pour les produits hydrophiles (e.g. cas de nos vitamines) il est raisonnable de considérer que la diminution dans la fragilité osmotique en présence de B12 et B6, est due à la diminution dans l'activité de l'eau (ou changement de l'osmolalité externe) dans les solutions à fortes concentrations de ces deux vitamines, en provoquant un efflux d'eau et quelques cations (déplétion en cations), et par conséquent une diminution dans l'hémolyse des érythrocytes (déshydratation). On peut également expliquer cette diminution par les interactions hydrophobes entre les composants membranaires en altérant la structure de la membrane cellulaire [14].

A concentrations plus faibles, cependant, les vitamines B12 (0.2-3.0 µg/ml) et B6 (0.2-100 µg/ml) ont favorisé grandement cette hémolyse hypotonique ($p < 0.05$) (Fig. 1 et 2). Le processus d'hémolyse est évidemment induit par un influx osmotique d'eau. Par conséquent, une entrée de la vitamine dans les cellules en suivant son gradient de concentration, entraîne une entrée d'eau le long du gradient osmotique qui serait ainsi créé, provoquant un gonflement des cellules jusqu'à ce qu'elles hémolysent. Tenant compte de la nature hydrophile et du poids moléculaire de ces deux vitamines (B12 et B6), on peut suggérer qu'à faibles concentrations, les molécules de ces deux vitamines dissoutes dans l'eau se déplacent du milieu aqueux vers le milieu intracellulaire. Ce phénomène engendre un influx d'eau vers le milieu cellulaire (phénomène d'entraînement par le soluté) en provoquant l'hémolyse des érythrocytes.

L'effet nul de ces deux vitamines sur la fragilité osmotique est observé respectivement à des concentrations de 4 et 200 µg/ml ($p > 0.05$) (Fig. 1 et 2). On peut considérer que ces deux concentrations représentent le point de réflexion entre l'effet anti-hémolytique et hémolytique et, en d'autres termes, sont des concentrations iso-osmotiques.

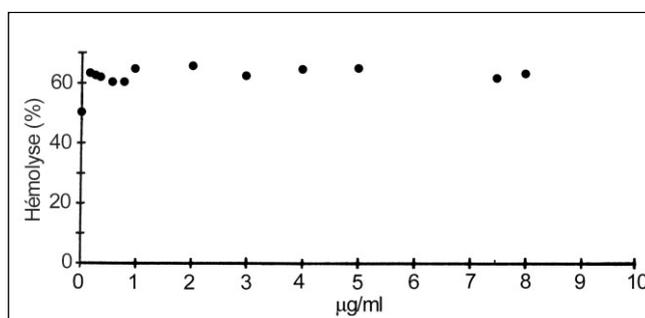


Figure 3: Effet de la vitamine B9 sur la fragilité osmotique des érythrocytes humains incubés dans du NaCl hypotonique (C_{50}).

Par contre, la vitamine B9 (0.2-0.8 µg/ml) exerce uniquement un effet hémolytique sur les érythrocytes ($p < 0.05$) (Fig. 3). Des études ont montré que le transport de cette vitamine à travers les cellules épithéliales s'effectue par un mécanisme actif [15] et, à fortes concentrations, le

transport de celle-ci se réalise par diffusion facilitée [16]. Donc, on peut penser que ce phénomène de diffusion à travers les cellules épithéliales, peut s'appliquer aux érythrocytes humains. Une perméabilité membranaire à la vitamine B9, supérieure à celle de B12 et B6, entraîne un excès en B9 dans l'érythrocyte et une augmentation de la teneur en eau et, par conséquent, une hémolyse aux niveaux de toutes les concentrations. Cet effet peut également être expliqué par la nature acide de la molécule B9 [16].

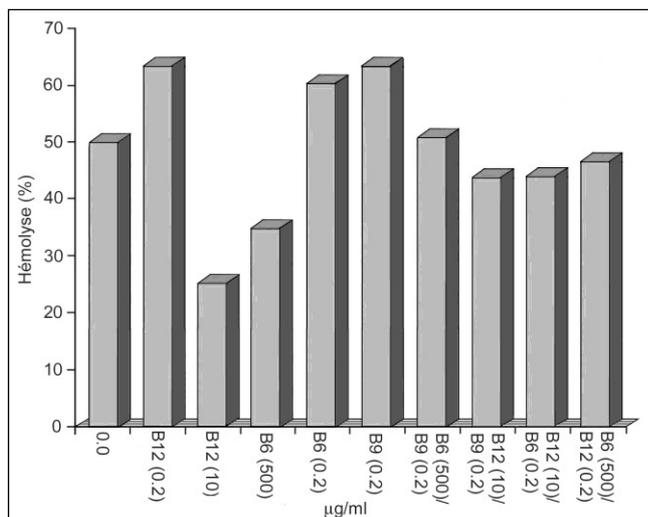


Figure 4: Effet combiné des vitamines antihémolytique et hémolytique (entre parenthèses, concentrations en µg/ml).

Cependant, la présence simultanée de deux vitamines anti-hémolytique/hémolytique dans du NaCl hypotonique (C50), qui sont respectivement (B12/B6, B12/B9, B6/B12 et B6/B9) (Fig. 4), a révélé un effet nul sur la fragilité osmotique des érythrocytes ($p > 0.05$) et dont le mécanisme reste inconnu. Probablement, cet effet nul exercé sur la fragilité osmotique en présence de ces deux vitamines antagonistes, peut être expliqué par le lien de ces vitamines en quantités appréciables à la cellule intacte érythrocytaire, et il y' aurait compétition mutuelle entre ces vitamines et leurs transports. Cet effet nul peut être aussi expliqué par le phénomène d'antagonisme partiel rencontré, et ceci lorsque le produit d'une association de deux substances antagonistes est moins efficace que celui de l'effet de ces deux substances utilisées séparément [18].

CONCLUSION

Ces résultats peuvent être utilisés en vue de postuler que la perméabilité des vitamines s'effectue *via* la diffusion facilitée à travers des canaux spéciaux des érythrocytes humains. Cependant, aucune corrélation claire ne peut être établie entre la perméabilité de ces vitamines et leurs poids moléculaires ou leur nature. Nous suspectons également que l'effet concentration bloque la perméabilité des vitamines. Enfin, il est probable qu'un modèle du même type pourrait s'appliquer à d'autres groupes systématiques de médicaments.

Nous recommandons une attention particulière focalisée sur l'effet hémolytique de ces vitamines utilisées à des doses pharmaceutiques dans le traitement de certaines pathologies sévères d'anémies, de leucopénie ou inflammatoires.

REFERENCES

- [1]- Seeman P., "The membrane actions of anesthetics and tranquilizers", *Pharmacol. Rev.* 24, (1972), pp. 583-655.
- [2]- Isomaa B., Hager Strand H., Paatero G. and Engblom A.C., "Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes", *Biochem. Biophys. Acta.*, 860, (1986), pp. 510-524.
- [3]- Benes I. and Kotyk A., "Uptake and binding of disaccharides in human erythrocytes", *Can. J. Biochem.* 54, (1974), pp. 99-101
- [4]- Parpart A.K., Lorenz P.B., Parpart E.R., Greeg J.R. and Chase A.M., "The osmotic resistance (fragility) of human red cells", *J. Clin. Invest.*, 26, (1947), pp. 636-640.
- [5]- Godal H.C., Nyvold N. and Rustad A., "The osmotic fragility of red cells: A re-evaluation of technical conditions", *Scand. J. Haematol.* 23, (1979), pp. 55-58.
- [6]- Sachin N.B., Roger P.M. and Samara N.D., "Pharmacology in medicine. Principales and Practice", Edition: Sp Press International, (1986), pp. 544-654.
- [7]- Gueant J.-L., Lambert D., Schohn H. et Nicolas J.-P., "Cobalamines (Vitamine B12)", Editions Techniques. *Encycl. Méd. Chir. (Paris-France), Hématologie*, 13-001-D-10, (1993), 4 p.
- [8]- Zittoun J. et Poitier de Courcy G., "Acide folique", Editions Techniques, *Encycl. Méd. Chir. (Paris-France), Hématologie*, 13-001-G-10, (1993), 4p.
- [9]- Jacotot B. et Le Parcot J. Cl., "Nutrition et alimentation", 2ème Edition Masson, Paris, (1992), pp. 22-30.
- [10]- Meyer P., "Physiologie Humaine", 2ème Edition Flammarion, Paris, (1983), pp: 1-20.
- [11]- O'brien R.D. and Hilton B.D., "The effect of DDT and its analogs on the fragility of human erythrocytes", *Pest. Biochem. Physiol.* 9, (1977), pp. 231-236.
- [12]- Nishihara Y. and Utsumi K., "Diminished osmotic fragility and shape alterations of human erythrocytes following the treatment with 1,1,1-trichloro-2, 2-bis (*p*-chlorophenyl) ethane (DDT)", *Cellular & Molecular Biology*, 29(1), (1982), pp. 103-111.
- [13]- Van Steveninck J., Gjosund W.K. and Booij H.L., "The influence of chlorpromazine on the osmotic fragility of erythrocytes", *Biochem. Pharmacol.*, 16, (1967), pp. 837-841.
- [14]- Antunes-Madeira M.C., Carvalho A.P. and Madeira V.M.C., "Interactions of insecticides with erythrocytes membranes", *Pestic. Biochem. Physiol.* 15, (1981), pp. 79-89.
- [15]- Zittoun R., Bernardon A. et Samama M., "Manuel d'hématologie", Edition: Doin éditeurs, Paris, (1992), pp. 54-88.
- [16]- Bernard J.J., Levy J.P., Varet B., Clauvel J.P., Rain J. et Sultan Y., "Hématologie", 8ème Edition: Masson, Paris, (1996), pp. 39-52.
- [17]- Paul J., Freyria A.M., Clendinnen G., Amiel M. and Eloy R., "Diminished osmotic and chemically induced haemolysis of human erythrocytes following exposure to contrast media molecules", *Haemostasis*, 13, (1985), pp. 385-393.
- [18]- Giroud J.P., Mathe G. et Meyniel G., "Pharmacologie clinique", Edition: Expansion Scientifique Française, (1978), pp. 166-167. □