

EFFET DE L'ACIDE SALICYLIQUE SUR LA FRAGILITE OSMOTIQUE DES ERYTHROCYTES HUMAINS

Reçu le 12/07/2000 - Accepté le 29/07/2001

Résumé

L'effet de l'acide salicylique (AS) sur la fragilité osmotique a été étudié chez les érythrocytes humains *in vitro*. De faibles concentrations de l'AS (0-0.50 mg/ml) ne montrent aucun effet hémolytique en cas d'incubation de ces érythrocytes dans du NaCl isotonique. Cependant, ces mêmes concentrations augmentent considérablement l'hémolyse hypotonique (C_{50}).

On n'a enregistré aucune diminution dans l'amplitude des pics d'absorption de l'hémoglobine (Hb) en présence de l'AS entre les concentrations 0.05 et 0.20 mg/ml. Par contre, une première diminution de cette amplitude est enregistrée à 0.25 mg/ml et accentuée à 0.30 mg/ml. Cependant, le pic d'absorption à 0.35 mg/ml disparaît complètement.

Le temps de lyse de 50% (TL_{50}) des érythrocytes incubés dans du NaCl hypotonique (C_{50}) est comme suit: $TL_{50}(AS) < TL_{50}(témoin)$.

Mots-clés: Fragilité osmotique, TL_{50} , acide salicylique, érythrocyte, hémoglobine.

Abstract

The effect of salicylic acid (SA) on osmotic fragility of human erythrocytes was studied *in vitro*. Low concentrations of SA (0-0.50 mg/ml) were not hemolytic when erythrocytes were incubated in isotonic NaCl medium. However, this same concentrations increased significantly hypotonic hemolysis (C_{50}).

No modification in amplitude of absorption peaks of hemoglobin (Hb) in presence of AS was observed between 0.05 and 0.20 mg/ml. On the other hand, the first decrease in this amplitude was recorded at 0.25 mg/ml and accented at 0.30 mg/ml. However, at 0.35 mg/ml, this peak disappeared completely.

The lysis time of 50% (LT_{50}) of erythrocytes were incubated in hypotonic NaCl is as followed: $TL_{50}(AS) < TL_{50}(Control)$.

Key words: osmotic fragility, LT_{50} , salicylic acid, erythrocytes, hemoglobin.

B. HOUCHER¹

D. NAIMI²

N. KEBIR¹

N. ABBAOUI¹

S. BEGGAG¹

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 Mentouri

Constantine, Algérie

ملخص

تمت دراسة تأثير حمض الساليسيليك (AS) على الهشاشة الأسموزية لكريات الدم الحمراء لدى الإنسان في الزجاج. لم تظهر التراكيز الضعيفة لحمض الساليسيليك (0.0 - 0.5 مغ/مل) أي تأثير على هذه الهشاشة في حالة حضان الكريات الحمراء في وسط كلوريد الصوديوم المتعادل التركيز. بينما أبدت نفس هذه التراكيز الضعيفة زيادة معتبرة على الهشاشة الأسموزية في الوسط المنخفض التوتر (C_{50}).

لم يسجل أي إنخفاض في سعة ذروات الإمتصاص للهيموغلوبين في وجود حمض الساليسيليك بين التراكيز 0.05 و 0.20 مغ/مل. بينما سجل أول إنخفاض في هذه السعة في التركيز 0.25 مغ/مل وتسارع هذا الإنخفاض في التركيز 0.30 مغ/مل بينما زالت هذه الذروة كلياً في التركيز 0.35 مغ/مل.

إن زمن إنحلال 50% (LT_{50}) من الكريات الدم الحمراء المحضونة في وسط كلوريد الصوديوم المنخفض التوتر (C_{50}) فهو كالاتي: $LT_{50}(AS) > T_{50}$ (الشاهد)

الكلمات المفتاحية: الهشاشة الأسموزية، LT_{50} ، حمض الساليسيليك، كريات الدم الحمراء، هيموغلوبين.

Le terme salicylate est dérivé du mot Salicacée, le nom botanique de la famille de saule. Cet acide peut s'obtenir à partir de l'alcool qui est présent dans l'écorce de saule (*Salix salix*) sous forme d'un glucoside qui donne, après hydrolyse, le glucose et l'acide salicylique (AS) [1]. L'AS sert de base à la préparation de dérivés importants [2]. Les uns résultent d'une substitution sur la fonction acide: ce sont les salicylates, les autres, d'une substitution sur la fonction phénol, le plus important de ceci étant l'acide acétyle salicylique (aspirine) [1].

L'aspirine, ou acide acétyle salicylique, est un médicament très utilisé du fait de ses effets antalgiques, antipyrétiques et surtout anti-inflammatoires; par conséquent, c'est le médicament le plus consommé à travers le monde. Comme tout médicament, l'aspirine possède plusieurs effets secondaires qui peuvent perturber l'homéostasie et aller jusqu'à la mort de l'individu intoxiqué (cas de suicide).

Parmi les effets secondaires de ce médicament, on peut citer son effet oxydant, qui peut entraîner la production des radicaux libres. Ces derniers attaquent directement ou indirectement la membrane érythrocytaire en provoquant l'hémolyse [3]. Les érythrocytes sont d'excellents modèles bio-membranaires utilisés dans les études d'interaction des médicaments et d'autres composés biologiques avec la membrane [4].

Les pathologies des érythrocytes sont d'origine héréditaire, classées en trois catégories: déficience enzymatique (e.g. déficience en G6PD), anomalies au niveau de la membrane plasmique et anomalie de l'hémoglobine. Ces trois anomalies augmentent la fragilité globulaire et, par conséquent, accroissent le risque de l'hémolyse en cas de consommation de médicaments oxydants.

Ainsi, le but du présent travail est de montrer l'effet néfaste de l'acide salicylique (AS) sur l'hémolyse des érythrocytes humains sur les deux derniers aspects, c'est-à-dire sur la membrane plasmique des érythrocytes (ou hémolyse) et sur l'hémoglobine qui révèle des pics spécifiques d'absorption qui vont être exploités dans le diagnostic biologique de méthémoglobinémie.

MATERIEL ET METHODES

Préparation des solutions stocks, du produit test et des érythrocytes humains

Une solution stock de travail est préparée dans l'eau distillée, équivalente sur le plan osmotique à une solution de chlorure de sodium de 10 g/l ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.366, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.243, NaCl 9.0 g/l) [5]. Cette solution est tamponnée à pH7.4 et conservée pour plusieurs jours. De même, une solution stock d'acide salicylique de 500 mg/ml est préparée dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO 99%) (Merck).

Le sang veineux, prélevé et recueilli dans des tubes héparinés, est obtenu de trois individus sains. Ces tubes sont ensuite centrifugés à une vitesse de 3000 rpm pendant 5 mn. Après centrifugation, le surnageant est éliminé. Le culot, recueilli par centrifugation, est lavé trois fois avec une solution saline isotonique, conservée à froid (+4°C). A l'issue de la dernière centrifugation, un culot cellulaire est obtenu au 1/20 avec la même solution de lavage de façon à ce que le nombre de cellules soit $5 \cdot 10^8$ per ml.

Estimation de C_{50}

On prépare des séries de tubes à essai contenant chacun 4.5 ml de solution saline dont les concentrations varient entre 0 et 9 g/l. Après l'addition de 500 μl de la suspension érythrocytaire, les tubes sont incubés dans un bain-marie à 37°C pendant 30 min. Passé le temps d'incubation, une centrifugation est réalisée à 3000 rpm pendant 5 min. L'absorbance du surnageant de chaque tube est mesurée à 540 nm [6]. La concentration de NaCl provoquant la lyse de 50% des érythrocytes (C_{50}) est déterminée directement sur la courbe d'hémolyse [7].

Effet de l'acide salicylique sur l'hémolyse des érythrocytes

Dans des tubes à essai contenant chacun 4.5 ml de NaCl isotonique ou hypotonique (C_{50}), on ajoute 50 μl de l'AS de concentrations variant entre 0.0 et 0.5 mg/ml. Les tubes témoins reçoivent le même volume du solvant (DMSO). Puis, une quantité de 500 μl de la suspension érythrocytaire est ajouté dans chaque tube. Ces tubes sont ensuite homogénéisés et incubés à 37°C pendant 30 min dans un bain marie. Les tubes sont centrifugés (3000 rpm; 5 min) et l'absorbance du surnageant est mesurée à 540 nm.

Temps de lyse de 50% des érythrocytes (TL_{50})

Le volume de référence des érythrocytes (volume d'équilibre osmotique) est déterminé par l'absorbance à 720 nm (valeur initiale 0.6) d'une aliquote de la suspension cellulaire dans un milieu isotonique de NaCl. Le temps de lyse de 50% des érythrocytes correspond au temps nécessaire pour que la densité optique baisse à la moitié (0.3) de sa valeur initiale (0.6) lorsqu'on ajoute cette aliquote d'érythrocytes dans une solution de NaCl (C_{50}) de volume 1.5 ml. Le tube témoin reçoit 25 μl de DMSO; par contre, le tube test reçoit le même volume d'AS de concentration 0.1 mg/ml. La lyse des érythrocytes est réalisée à la température ambiante ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) [8].

Spectres d'absorption de l'hémoglobine (Hb) traitée avec l'AS

A partir de la solution stock de l'AS et par dilution convenable avec le DMSO, on prépare une gamme de concentrations de l'AS afin que la concentration finale soit comprise entre 0.0 et 0.35 mg/ml. Dans des tubes à essai, on met 4.5 ml d'eau distillée puis on rajoute 500 μl de la suspension érythrocytaire. Ensuite, une quantité de 50 μl de l'une des concentrations de l'AS préparées précédemment, est ajouté à chacun de ces tubes. Enfin, une homogénéisation est réalisée par le vortex.

Les spectres d'absorption sont obtenus à l'aide d'un enregistreur (JJ instruments, CR 652 S, RECORDER) relié à un spectrophotomètre visible (Pharmacia LKB. novaspec II).

Analyse statistique

Les données présentées constituent les moyennes des expériences réalisées sur trois individus. Dix essais sont effectués et analysés par le test "t" Student. L'interprétation des différences entre les moyennes sont estimées selon les valeurs de p (inférieures à 0.05, les différences sont statistiquement significantes).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les travaux d'O'Brien et Hilton montrent [7] que C_{50} est de 3.8-4.0 g/l de NaCl. La courbe d'hémolyse, obtenue à partir de trois individus volontaires, montre que C_{50} est de 4.1-4.3 g/l.

L'effet hémolytique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) est étudié aussi bien *in vivo* que *in vitro* [9]. L'action de l'AS sur l'hémolyse des érythrocytes humains est testée dans le milieu isotonique de NaCl ainsi que dans les milieux hypotoniques (C_{50}). Des observations suggèrent que l'AS est transporté selon deux processus parallèles, l'un emprunte la bande 3 (ou protéine 3), canal responsable du transport des anions (Cl^- et HCO_3^-) [10], et l'autre nécessite probablement la diffusion passive des non-électrolytes [10,11].

La figure 1 montre que les différentes concentrations de l'AS, qui varient entre 0 et 0.5 mg/ml, n'agissent pas sur les érythrocytes incubés dans le milieu isotonique où le taux d'hémolyse est presque nul. Cependant, ces mêmes concentrations augmentent l'hémolyse hypotonique d'une manière significative ($p < 0.05$). Cette augmentation dans

l'hémolyse peut être expliquée par les travaux de Chan *et al.* [12], qui montrent que les fortes doses d'aspirine augmentent le taux d'hémolyse *in vivo*. Nous postulons que l'effet de l'acide salicylique est dû à son hydrophobicité, donc selon l'hypothèse appelée "couple de la bicouche". L'AS s'incorpore au niveau du feuillet externe de la bicouche lipidique de la membrane plasmique des érythrocytes et provoque une diminution dans la fluidité membranaire [13].

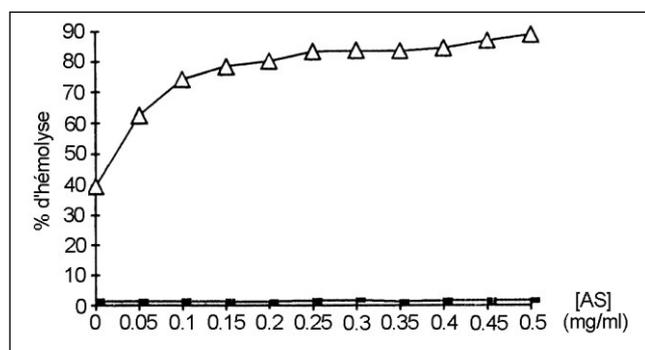


Figure 1: Effet de l'acide salicylique sur la fragilité osmotique des érythrocytes humains incubés dans du NaCl hypotonique (C_{50}) (Δ) et isotonique (-).

Nombre de médicaments sont susceptibles de provoquer une oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine, lorsqu'ils sont administrés en excès [14]. Ces médicaments oxydants ne sont donc hémolytants qu'en cas de prise importante ou de surdosage [15]. Par ailleurs, ces médicaments sont impliqués dans la plupart des cas dans l'induction de l'anémie hémolytique chez les sujets possédant une déficience enzymatique en G6PD et en pyruvate kinase [16, 9]. *In vivo*, l'effet hémolytique des médicaments oxydants peut être évité en associant un autre anti-inflammatoire avec un anti-oxydant tel que la vitamine E [17].

Deux mécanismes oxydatifs, plus ou moins complexes, sont responsables de l'hémolyse toxique, soit par l'oxydation de l'oxyhémoglobine (Oxy-Hb) en méthémoglobine (Met-Hb), en transformant ce dernier en hémichromes, qui se précipitent sur la membrane sous la forme de corps de Heinz insolubles, conduisant à une hémolyse [3], soit par agression directe de la membrane [18], en peroxydant les lipides ainsi qu'en provoquant la diminution de la fluidité membranaire [19] ou en oxydant les groupes thiols des protéines membranaires [3], soit à des réactions de pontage entre les protéines du cytosquelette, soit à une inactivation d'enzymes membranaires [20]. Cependant, les travaux de Watala et Gwozdziński [21] n'ont montré aucun effet de l'AS sur le changement dans la conformation des protéines membranaires, ni sur l'altération des interactions lipides-protéines.

Les temps de lyse de 50% (TL_{50}) des érythrocytes humains incubés dans du NaCl hypotonique (C_{50}), en l'absence et en présence de l'AS (0,1 mg/ml), est respectivement comme suit: 13,7 et 9,5 secondes. Ces résultats montrent que l'AS accélère l'hémolyse hypotonique des érythrocytes et le temps de lyse devient un facteur limitant.

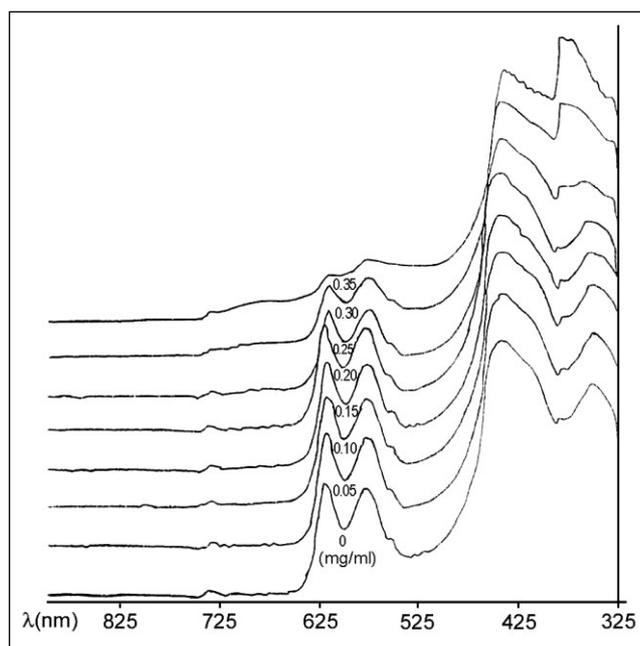


Figure 2: Spectres d'absorption de l'Hb en présence de différentes concentrations de l'AS (en mg/ml).

Le changement dans les spectres d'absorption, est un indicateur de modification de la configuration spatiale d'une molécule. L'expérience réalisée sur l'hémolysat montre que le changement dans l'amplitude des pics d'absorption de l'Hb en présence de l'AS commence à partir de 0,25 mg/ml et, à 0,35 mg/ml, ces pics disparaissent complètement (Fig. 2). La diminution dans l'absorbance nous renseigne sur la disparition de l'oxyhémoglobine [22], observée dans notre cas lorsque les érythrocytes sont traités avec l'aspirine à des concentrations supérieures à 0,25 mg/ml. Cette disparition qui révèle un changement dans le pic spécifique d'absorption de l'oxyhémoglobine, peut nous aider dans le diagnostic biologique de méthémoglobinémie.

CONCLUSION

L'exposition des érythrocytes humains à des agents oxydants tel que l'AS "précurseur de l'aspirine" ne favorise l'hémolyse qu'en cas de prises importantes (fortes concentrations ou surdosage) ou chez les patients ayant un déficit en G6PD (fragilité osmotique). Dans ces cas, et par analogie, on peut projeter nos résultats, dont l'explication réside dans les expériences réalisées en milieux hypotoniques (milieux fragiles) ou par le temps de lyse (TL_{50}).

REFERENCES

- [1]- Fabre R. et Truihaut R., "Précis de toxicologie", Ed.: Société d'édition d'enseignement supérieur, Paris, (1965).
- [2]- Sachin N.B., Roger P.M. and Samar N.D., "Pharmacology in medicine: Principles and Practice", Ed.: Sp Press International Inc. U.S.A., (1986).
- [3]- Wajcman H., Lantz B. et Girot R., "Les maladies du globule rouge", Ed.: INSERM/Médecine-Science, Flammarion, Paris, (1992).
- [4]- Antunes-Madeira M.C., Carvalho A.P. and Madeira V.M.C., "Interactions of insecticides with erythrocyte

- membranes", 15, (1981), pp.79-89.
- [5]- Godal H.C., Elde A. T., Nyborg N. and Brosstad F., "The normal range of osmotic fragility of red blood cells. Scand", *J. Haematol.*, 25, (1980), pp.107-112.
- [6]- Parpart A.K., Lorenz P.B., Parpart E.R., Gregg J.R. and Chanse A.M., "The osmotic resistance (fragility) of human red cells", *J. Clin. Invest.*, 26, (1947), pp.630-640.
- [7]- 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, (1978), pp.231-236.
- [8]- Houcher B., "L'hémolyse osmotique des érythrocytes humains, bovins et ovins. Effets du lindane, du taux de gonflement et de la température", Thèse de Magistère, Institut de Biologie, Université de Sétif, (1995).
- [9]- Sanford D.M. and Knodel L.C., "Induction of hemolytic anemia by nonsteroidal antiinflammatory drugs", *Drug. Intell. Clio. Pharm.*, 20, (1986), pp.925-934.
- [10]- Minami T. et Cutler D.J., "A kinetic study of the role of band 3 anion transport protein in the transport of salicylic acid and other hydroxybenzoic acids across the human erythrocyte membrane", *J. Pharm. Sci.*, 81, (1992), pp. 424-427.
- [11]- Ohsako M., Matsumoto Y. and Goto S., "Transport of aspirin and its metabolites through erythrocyte membrane", *Biol. Pharm. Bull.*, 16, (1993), pp. 154-157.
- [12]- Chan T.K., Todd D. and Tso S.C., "Drug induced hemolysis in G-6-PD-deficiency", *Br. Med. J.*, 2, (1976), pp.1227-1229.
- [13]- Li A., Seipelt H., Muller C., Shi Y. et Artmann M., "Effect of salicylic acid derivatives on red cell membranes", *Pharmacol. Toxicol.*, 85, (1999), pp. 206-211.
- [14]- Mayer K. and Ley A.B., "Hemolysis of red cells due to sulfone", *Ann. Intern. Med.*, 72, (1970), p. 711.
- [15]- Beutler E., "Red cell metabolism and hemolysis", *Acta Haematol. Jpn.* 50, (1987), p.1453
- [16]- Chmid F.R. and Culic D.D., "Antiinflammatory drugs and gastro intestinal bleeding: Comparison of aspirin and ibuprofen", *J. Clin. Pharmacol.*, 16, (1976), pp.418-425.
- [17]- Fernandes M.A., Geraldes C.F., Oliveira C.R. and Alpoim M.C., "Chromate-induced human erythrocyte haemoglobin oxidation and peroxidation: influence of vitamin E, vitamin C, salicylate, deferoxamine and N-ethylmaleimide", *Toxicol. Lett.*, 114, (2000), pp. 237-243.
- [18]- Bernard J., Plevy J., Varet B., Clavel J., Rain J. et Sultan Y., "Abrégé d'hématologie", Ed. Masson, Paris, (1985).
- [19]- Christopher J., Morris J., Earl R., Charles W., Trenam D. and Blake R., "Reactive oxygen species and iron a dangerous partner ship in inflammation", *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27, (1995), pp.109-122.
- [20]- Rosen G.M., Barber M.J. and Rauckman E.J., "Disruption of erythrocyte membrane organisation by superoxide", *J. Biol. Chem.*, 258, (1982), p.2225.
- [21]- Watala C. and Gwozdinski, "Effect of aspirin on conformation and dynamics of membrane proteins in platelets and erythrocytes", *Biochem. Pharmacol.*, 45, (1993), pp. 1343-1349.
- [22]- Okahata, S., "Mechanism of methyl viologen induced hemolysis", *Hiroshima Journal of Medical Sciences*, 29, 2, (1980), pp. 49-54. □