

LES ENZYMES DU GLOBULE ROUGE

Sommaire :

- le déficit en G6PD :
 - génétique et classification des déficits en G6PD
 - physiopathologie de l'hémolyse
 - méthodes diagnostiques
 - traitement
- le déficit en pyruvate kinase :
 - aspects génétiques et biochimiques
 - aspects cliniques
 - méthodes diagnostiques
 - traitement
- le déficit en pyrimidine 5' nucléotidase

Les érythrocytes matures survivent dans le torrent circulatoire environ 120 jours et assurent effectivement le transport de l'oxygène vers les tissus. Ceci est possible grâce à **un système enzymatique qui protège l'hémoglobine et la membrane de l'oxydation et de la dégradation. Le glucose est le principal substrat métabolique** des globules rouges, métabolisé par deux voies principales. La voie glycolytique produit de l'énergie, et présente une boucle produisant le 2,3,diphosphoglycérate nécessaire à réguler la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine. La voie des hexoses monophosphates est étroitement associée au métabolisme du glutathion, mécanisme important de détoxification des agents oxydants (infections ou médicaments).

Les anomalies enzymatiques ne sont pas toujours associées à une maladie, avec souvent seulement un risque modéré pour la santé qui n'affecte pas significativement la longévité des patients. Sinon, elles peuvent présenter diverses traductions bio-cliniques.

Par ailleurs, certains déficits enzymatiques peuvent également produire un avantage de protection dans certaines circonstances.

1. Le déficit en G6PD

C'est sans doute la maladie liée à une mutation la plus fréquente dans le monde.

Plus de 400 millions d'habitants sont porteurs d'un variant déficitaire de G6PD.

Une bonne partie est associée à la race noire: incidence du déficit = environ 20% en Afrique, 12% chez les afro-américains, et 8% chez les noirs brésiliens; environ 20% des femmes afro-Américaines sont hétérozygotes et 1% sont homozygotes.

Une partie des déficits est méditerranéenne: en Sardaigne, l'incidence varie de 35% à faible altitude à 3% au-delà de 600 mètres; en Grèce, la fréquence est élevée dans les basses terres (20 à 30%).

En Asie, l'incidence du déficit est de 14% au Cambodge, 5% en Chine du Sud, et de 2,5% en Inde, et quasi nulle (0,1%) au Japon.

1.1. Génétique et classification des déficits en G6PD:

Le gène de la G6PD est localisé sur le chromosome Xq28. Hommes et femmes sains ont la même activité enzymatique, expliquée par l'hypothèse de Lyon. **Un déficit enzymatique s'exprime surtout chez les hommes portant un gène variant**, alors que les femmes hétérozygotes sont habituellement cliniquement normales. Cependant, selon le

degré de lyonisation, l'activité enzymatique chez ces femmes peut être normale, faiblement diminuée ou fortement diminuée. Une femme hétérozygote avec 50% d'activité G6PD a 50% d'hématies normales et 50% d'hématies déficitaires: les hématies déficitaires de ces femmes sont aussi vulnérables à l'hémolyse que les hématies déficitaires des hommes.

Près de quatre cents variants ont été définis, la plupart sporadiques et quelques uns survenant avec une grande fréquence.

La forme active de l'enzyme est un dimère composé de deux chaînes de 515 AA.

L'OMS a classifié les variants selon l'intensité du déficit enzymatique et de la sévérité de l'hémolyse.

Les variants classe I ont un déficit enzymatique sévère (< 10-20% de la normale) et ont une hémolyse chronique.

Les variants de classe II ont une activité enzymatique également sévère (< 10%) mais n'ont habituellement qu'une hémolyse intermittente (qui peut être sévère).

Les variants de classe III ont un déficit modéré (10 à 60% de la normale): l'hémolyse est intermittente et en général associée seulement à une infection ou à la prise de médicaments.

Les variants de classe IV n'ont pas de déficit d'activité enzymatique ni d'hémolyse et les variants de classe V ont une activité enzymatique augmentée (ces 2 dernières classes ont essentiellement un intérêt biologique mais aucune signification clinique).

Les divers allèles.

- **L'allèle sauvage et la G6PD B.**

- **L'allèle polymorphique le plus fréquent est G6PD A+** : retrouvé chez 25% des africains. L'activité enzymatique est presque normale et il n'y a pas d'hémolyse (= classe IV).

NB: la différence entre les lettres A et B se réfère à la mobilité électrophorétique relative des deux enzymes.

- **L'autre variant fréquent chez les noirs (10-15%) est A-** : il correspond à l'enzyme responsable de la sensibilité à la Primaquine; C'est le variant le plus fréquent associé à une hémolyse faible à modérée (classe III). C'est une enzyme instable dont l'activité catalytique baisse rapidement dans les globules rouges âgés. (plusieurs variants se rencontrent également en Asie du Sud-Est)

- **Les variants méditerranéens (appelés B-)** sont le plus fréquemment retrouvés dans la race blanche: mobilité électrophorétique identique à celle de l'enzyme B, mais synthèse plus lente et activité catalytique beaucoup plus faible. Associée à une hémolyse qui peut être sévère (classe II).

- **Les variants de classe I (rares)** :les mutations sont surtout localisées au niveau de l'exon 10 du gène, région qui gouverne la formation du dimère actif .

1.2. Physiopathologie de l'hémolyse:

Les globules rouges déficitaires en G6PD et exposés aux oxydants perdent rapidement tout leur glutathion réduit. L'hémoglobine est oxydée et se transforme en sulf- ou en met- hémoglobine, qui forme de petites masses insolubles collées à la membrane et appelées **corps de Heinz**, et quand les protéines membranaires sont oxydées, les globules rouges deviennent rigides. Tous ces GR sont alors phagocytés par les macrophages du SRH, du foie et de la rate.

Une hémolyse extravasculaire aussi bien que intravasculaire peut survenir, donnant naissance à une hémoglobinémie et une hémoglobinurie.

1.2.1. La crise hémolytique d'installation aiguë, brutale.

En dehors de l'accident hémolytique, il n'y a ni anémie ni anomalie de la morphologie des globules rouges.

L'accident hémolytique survient pour les variants A- et méditerranéens: c'est une hémolyse sévère qui survient après exposition à certains agents toxiques, l'ingestion de

fèves, ou une infection. Les globules rouges ayant la plus faible activité G6PD qui sont éliminés: les cellules les plus jeunes ainsi que les réticulocytes qui ont une forte activité (5 fois plus que les GR âgés) ne sont pas hémolysés pour les variants modérés.

- Deux à quatre jours après la prise du toxique (par exemple Primaquine), on observe ictère, pâleur, des urines sombres, avec ou sans douleur abdominale et dorsale, d'installation brutale.

- Chute rapide de l'hémoglobine, de 3 à 7 g/dl.

- Sur frottis sanguin: morphologie érythrocytaire normale ou anomalies non spécifiques (anisocytose, polychromasie). Des fragments de cellules ou/et des microsphérocytes sont fréquemment décrits. **Les hématies mordues ("bite" cells, "cellules fantômes")** sont souvent citées dans le déficit en G6PD, mais d'autres anémies hémolytiques de causes connues ou non peuvent présenter le même aspect morphologique.

- Paramètres biochimiques de l'hémolyse: haptoglobine effondrée, bilirubine libre augmentée, LDH élevée, hémoglobinurie parfois.

- En réponse à l'anémie, une crise réticulocytaire apparaît dans les 5 jours et est maximale 7 à 10 jours après début de l'hémolyse. Habituellement, le processus hémolytique cesse après une semaine, et l'hémoglobine redevient progressivement normale.

[L'enzyme étant présente dans tous les tissus de l'organisme y compris les leucocytes et les plaquettes, une petite neutropénie et une thrombopénie sont parfois associées aux crises hémolytiques]

Les agents responsables de la crise aiguë hémolytique:

Divers médicaments accélèrent la production intracellulaire de perhydroxyl ou d'autres agents oxydants, et doivent être proscrits:

Plusieurs antipaludéens (quinine et dérivés)

Sulfamides et sulfones

Nombreux anti infectieux (sulfamides, quinolones, nitrofurantoïnes et autres)

Divers composants comme: vitamine C, bleu de méthylène, analgésiques antipyrétiques, toxiques (naphtaline, nitrates...)

NB: selon le déficit enzymatique, certains médicaments peuvent cependant être utilisés à doses contrôlées (aspirine, certains antipaludéens).

L'infection est un facteur très fréquent d'hémolyse (infections bactériennes ou virales, notamment l'hépatite virale).

Les fèves ne sont toxiques que pour seulement quelques individus déficitaires, et principalement le variant méditerranéen.

1.2.2. L'anémie hémolytique chronique des déficitaires de classe I.

Un petit nombre de patients déficitaires en G6PD ont une anémie hémolytique chronique non sphérocytaire, en l'absence d'infection ou d'exposition à des médicaments. Ces variants de classe I sont extrêmement hétérogènes sur le plan biochimique mais ont en commun une très faible activité in vitro ou une forte instabilité ou les deux. La plupart de ces variants ont des mutations de l'ADN dans l'exon 10 du gène, ce qui affecte les interactions monomères-dimères et donc l'activité de l'enzyme. **L'anémie et l'ictère sont souvent notés dans la période néonatale** ; l'hyper bilirubinémie nécessite souvent un échange transfusionnel. L'hémolyse survient en l'absence d'agent toxique, mais l'exposition aux toxiques ou aux chimiques à potentiels oxydants amplifie le processus hémolytique. **Chez l'adulte, les signes et les symptômes de l'hémolyse sont plus discrets ou inconstants.**

1.3. Méthodes diagnostiques.

1.3.1. Examen du frottis sanguin. Pendant l'épisode hémolytique, la recherche des "bite cells" est possible mais pas spécifique: ce sont des globules rouges qui contiennent un coagulum d'hémoglobine qui s'est séparé de la membrane, laissant une région non colorée et dépourvue d'hémoglobine.

1.3.2. Recherche de corps de Heinz. Pendant l'épisode hémolytique, la dénaturation oxydative de l'hémoglobine apparaît sous forme petites masses collées à la membrane, visibles après coloration spéciale (bleu de crésyl ou cristal violet).

- En dehors des crises hémolytiques on peut ajouter au sang un oxydant (Acétyl Phényl Hydrazine ou APH) qui induit rapidement des corps de Heinz chez les patients déficitaires (= recherche de corps de Heinz provoqués).

1.3.3. Test de fluorescence de dépistage rapide (spot test de Butler). On ajoute à un hémolysat de GR tous les composants (NADP, glutathion, glucose, NADP) qui permettent la génération de NADPH si l'enzyme est présente. On dépose une goutte sur un papier buvard, on sèche et on observe avec une lampe UV: fluorescence en présence de NADPH (= enzyme présente); pas de fluorescence si déficit. Attention aux faux négatifs, dans les formes les plus modérées de déficit, notamment si l'analyse enzymatique est réalisée peu après un épisode aigu hémolytique, quand le nombre des réticulocytes est élevé (5X plus d'enzyme dans les réticulocytes que les GR âgés)

1.3.4. Technique spectrophotométrique quantitative. Plus complexe.

Les femmes hétérozygotes sont particulièrement difficiles à diagnostiquer par les techniques enzymatiques, et nécessitent les méthodes de diagnostic moléculaire mettant en évidence les substitutions de nucléotides.

1.4. Traitement.

Il faut absolument **proscrire tout médicament connu comme pouvant induire l'hémolyse**. Chez les sujets A-, l'hémolyse est aiguë et de courte durée même si l'agent oxydant continu à être utilisé. Ce n'est pas toujours le cas pour les variants méditerranéens les plus sévères pour lesquels l'agent toxique doit toujours être éliminé.

Parfois devant une anémie sévère et symptomatique, une transfusion sanguine peut être nécessaire.

En cas d'hémolyse chronique, une supplémentation en folates est parfois conseillée.

NB: Avantages du déficit en G6PD.

La distribution géographique des populations à haute fréquence génique de variants déficitaires se superpose étroitement à celle du paludisme. Il semble que la croissance des parasites soit inhibée dans les globules rouges déficitaires en G6PD, mais ceci n'est pas retrouvé avec tous les variants enzymatiques. Le mécanisme le plus probable serait une phagocytose augmentée des globules rouges déficitaires en G6PD contenant les formes avec parasites précoces: l'altération plus rapide des globules rouges parasités (protection plus faible) entraînerait leur destruction par phagocytose plus rapide.

Site : <http://www.g6pd.org/q6pd/>

2. Déficit en pyruvate kinase.

C'est l'enzyme érythrocytaire la plus couramment responsable d'anémie hémolytique congénitale.

2.1. Aspects génétiques et biochimiques.

La Pyruvate Kinase convertit le Phosphoénol Pyruvate en lactate, en générant de l'ATP. Il existe quatre iso enzymes différentes, générées par l'utilisation de deux promoteurs alternatifs de deux gènes distincts (LR et M2), qui ont une expression variable dans les divers tissus:

L'isoforme LR est unique aux globules rouges, et remplace progressivement l'isoforme M2 trouvée dans les progéniteurs érythroïdes précoces.

Le gène de la PK de type M est localisé sur le chr.15 et de type R est localisé sur le chr. 1. Il y a plus de 100 mutations de la PK : il n'y a pas de corrélation avec la localisation de la mutation et la sévérité de l'anémie hémolytique.

Le déficit est distribué dans le monde entier mais semble plus fréquent dans le Nord de l'Europe et sans doute la Chine.

Bien que non relié à une distribution géographique particulière, le déficit PK protège du paludisme.

2.2. Aspects cliniques

- **La transmission étant autosomale récessive, seuls les homozygotes (hommes et femmes) et les hétérozygotes pour 2 déficits différents sont atteints.**

Le mécanisme précis de l'hémolyse n'est pas clairement défini.

- **Sévérité de l'hémolyse très variable** : anémie parfois sévère (12 à 6 g/dl), allant du risque mortel jusqu'à des formes modérées complètement compensées et sans anémie.

- Réticulocytes: 5-15% des hématies (150-400 G/L) [voir plus bas]

- Les patients avec hémolyse sévère ont un ictère chronique et vont développer les complications cliniques des états hémolytiques chroniques (calculs biliaires, crises aplasiques transitoires liées au virus B19, déficit en acide folique, et plus rarement des ulcères cutanés).

- La splénomégalie est fréquente mais pas constante.

2.3. Méthodes diagnostiques.

Il n'y a pas d'anomalie morphologique particulière qui aide au diagnostic.

Il existe **un test de dépistage rapide** (équivalent du test de Butler) mais qui néglige plusieurs types de variants, et une méthode de dosage spécifique. Il faut absolument éliminer les leucocytes car ils contiennent jusqu'à trois cents fois le taux de celui des globules rouges.

Le diagnostic moléculaire n'est pas évident à mettre en place du fait du grand nombre de mutations différentes.

2.4. Traitement.

La splénectomie a un effet favorable en améliorant le degré de l'hémolyse et de l'anémie. On évite de splénectomiser les petits enfants avant 5-7 ans pour éviter les risques infectieux secondaires.

Chez les patients splénectomisés, la numération des réticulocytes est plus importante et peut atteindre 70%, par une survie plus longue des réticulocytes déficitaires en PK après splénectomie.

3. Déficit en pyrimidine 5' nucléotidase.

C'est la troisième cause la plus fréquente de déficit enzymatique entraînant une hémolyse. Cette enzyme participe à la dégradation de l'ARN dans les réticulocytes. L'accumulation de pyrimidines dans les globules rouges semble toxique et responsable de l'hémolyse.

Hérédité autosomale récessive.

Il existe une anomalie morphologique constante des hématies: les hématies à ponctuations basophiles (le plomb est un inhibiteur fort de cette enzyme).

Conclusion :

La plupart des enzymes de la glycolyse ont pu être rapportées comme déficitaires, avec des fréquences variables et le plus souvent très faibles.

Marc ZANDECKI, février 2006