

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD
FACULTE DE MEDECINE
DR. B. BENZERDJEB - TLEMCEM



وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي
جامعة أبو بكر بلقايد

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE POUR

L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Etude in vitro de l'influence de l'albumine sur la toxicité de
l'Amphotericine B (Fungizone®)**

Présenté par : BENDJAFER NAIMA

BENMOSTEFA AFAF

Soutenu le 20 Juin 2016

Le Jury

Président : DR.YOUCEF.A

Maitre assistante en pharmacologie

Membres :

DR.RAHMOUN.L

Maitre assistante en biophysique

DR.BEGHDADIS

Maitre assistante en chimie thérapeutique

DR.SEBBAGH.I

Maitre assistante en parasitologie

DR.BORSALI.N

Maitre assistant en pharmacologie

Encadreur : DR.BRIKCI NIGASSA.N

Maitre assistante en biophysique

Co-encadreur : DR.ZERGA.I

Assistante en biophysique

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Au premier lieu, nous remercions Dieu, notre créateur de nos avoir donné la force, la volonté et le courage afin d'accomplir ce travail modeste.

Nous adressons le grand remerciement à notre encadrante **Dr BRIKCI NIGASSA N**, maitre assistante en biophysique, qui a proposé le thème de ce mémoire et qui nous a encadrées et soutenue tout au long de l'élaboration de ce travail, qui a toujours su nous donner de précieux conseils et sans qui ce travail n'aurait pas eu lieu

Nos plus sincères remerciements à notre co-encadrante **Dr ZERGA I**, assistante en biophysique, pour son soutien, pour sa patience, pour sa disponibilité, pour ses conseils avisés et pour avoir accepté de codiriger ce travail de mémoire.

Sans oublier Mr le **Professeur BENYOUCEF**, Chef de service de Biochimie a qui nous sommes reconnaissantes de nous avoir accueillies au sein de son service tout en nous laissant une grande liberté de manœuvre quant au déroulement et à l'organisation de notre démarche scientifique.

Nous tenons également à remercier les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance, tout particulièrement : **Mme YUCEF A**, maitre assistante en pharmacologie, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. Nous souhaitons exprimer notre gratitude à **Mme SEBBAGH I**, **Mme BEGHDAI S**, **Mr BORSALI N** et **Mme RAHMOUN L** pour avoir lu et approuvé notre mémoire. Nous vous remercions pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et pour vos précieux conseils et remarques.

Ainsi nos gratitude et appréciation à **Dr BENCHACHOU K**, Résidente en Hydro-Bromatologie, pour son aide, sa sympathie et sa bonne humeur.

Nous voulons aussi remercier tous les membres du laboratoire central, service de Biochimie et le laboratoire des UMC du CHU Tlemcen pour leur aide, en particulier, **ZINA** et **MALIHA**.

Je dédie ce travail...

A ma très chère mère Zohra

Tu représentes pour moi le symbole la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A la mémoire de mon Père Si Houcine

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère sœur Rachida

A mes frères Mohammed, Dr.Si Ahmed et son épouse Hanane, Abderrahmen et son épouse Amel et Dr.abdallah

Vous avez cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

A mes neveux Fatima, Mohammed et Khawla

A mes tantes


Khadra, Keltoum et Fatiha

A mes amies

Afaf, Sihem, Soumia D, Somia H, Imène.

A tous les membres de ma promotion de 6^{ème} année pharmacie.

Bendjafer Naïma



Je dédie a ce travail à :

A mes parents pour votre amour qui m'a permis d'être ce que je suis aujourd'hui, et pour m'avoir soutenu dans mes choix personnels. Je ne pourrai jamais assez vous remercier. Ce travail est le fruit de votre grande patience, me voilà aujourd'hui Docteur en pharmacie.

A mes sœurs khawla ,malika , sara, fatima et nadjet : Merci pour votre encouragement et pour votre aide.

A mon frère Sidi Mohamedvous êtes toujours mon deuxième père.

A mes anges Ritedj, Ramzi,Rawan,Abdou st wissal vous êtes vraiment le charme de ma vie.

A mes chères khalti kheira et Asma :merci à votre présence dans ma vie.

A mes amis qui m'ont accompagne avant et pendant ma thèse : Naïma,Iméne, Siham et Hichem.

A tous mes amis de promotions de 6ème année pharmacie.

A tous ceux qui ont contribue de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Benmostefa afaf

Table des matières

Table des matières	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	
REVUE BIBLIOGRAPHIQUES	

CHAPITRE I : FUNGIZONE

1- Forme et présentation	3
2- Synthèse.....	3
3- Composition	4
4- Classe thérapeutique	4
5- Structure chimique.....	4
6- Condition de conservation	5
6-1 – Avant reconstitution	5
6-2- Après reconstitution.....	5
7- Caractéristiques physicochimique	6
8- Pharmacocinétique.....	7
8-1- Absorption.....	7
8-2- distribution	7
8-3- Métabolisme.....	8
8-4- Elimination.....	8
9- Mécanisme d'action.....	9
10- Spectre d'action	12
11- Indication	12
12- Contre-indications	13
13- Posologie	13

14- Précaution d'emploi	15
15- Effets indésirables.....	15
15-1- Réaction liée à la perfusion.....	15
15-2- Toxicité rénale	15
15-3- Troubles électrolytiques dus à l'AMB.....	16
15-4- Anémie sous Am B	16
16- Résistance	17
17- Interactions médicamenteuse.....	17
17-1- Interactions déconseillées	17
17-2- Interactions nécessitant des précautions	18
17-3- Interactions à prendre en compte	18
18- Toxicologie.....	18
18-1- Symptômes et traitements de surdosage	19
18-2- Mode d'action toxique	19

CHAPITRE II : GLOBULE ROUGE

1- Histoire	22
2- Structure du globule rouge	22
2-1- La membrane	23
2-1-1- Structure de la membrane	23
2-1-1-1- Lipides	23
2-1-1-2- Protéines	24
2-1-2- Propriétés de la membrane	25
2-1-2-1- Asymétrie	25
2-1-2-2- Fluidité	26
2-1-3- Echanges transmembranaires	26
2-2- l'hémoglobine	27
3- Physiologie	29
3-1- Erythropoïèse	29
3-2- L'homéostasie de globule rouge	29
3-3- Numération de la formule sanguine.....	30
4- Fonction.....	31

5- Métabolisme du globule rouge	31
---------------------------------------	----

CHAPITRE III : L'hémolyse

1- Définition.....	33
2- Signes de sénescence érythrocytaire.....	33
2-1- Modification de la membrane et du contenu.....	33
2-2- Modification de la membrane	33
2-3- Altération de la membrane.....	33
2-4- Catabolisme de l'hémoglobine	33
3- Site d'hémolyse	35
3-1- hémolyse extravasculaire (Physiologique)	35
3-2- Hémolyse vasculaire (Pathologique)	35
3-2-1- Hémolyse par anomalie de membrane du GR.....	35
3-2-2- Hémolyse par déficit enzymatique	36
3-2-3- Hémolyse d'origine iatrogène	37
4- Diagnostique de l'hémolyse	37

CHAPITRE IV : L'albumine

1- Définition.....	39
2- Synthèse de l'albumine.....	39
3- Métabolisme de l'albumine	39
4- Dégradation de l'albumine	40
5- Structure	40
6- Fonction.....	41
7- Hypoalbuménémie.....	42
8- Administration exogène d'albumine	42
8-1- Aspect	42
8-2- Précaution particulière de conservation.....	42
8-3- Pharmacocinétique.....	43
8-3-1- Absorption	43
8-3-2- Distribution.....	43
8-3-3- Métabolisme	43

8-3-4- Elimination	43
8-4- indications et usage clinique	44
8-5- Effets indésirables	45
8-6- Contre-indications.....	45
8-7- Surdosage.....	46

ETUDE EXPERIMENTALE

I. Introduction	48
II. Objectif.....	48
III. Matériel et méthode	49
III-1- Matériel.....	49
III-1-1- Appareils.....	49
III-1-2- Réactifs	50
III-1-3- Autre appareils.....	50
III-2- Méthodes.....	51
III-2-1- Protocole d'étude.....	51
III-2-1-1- Type d'étude.....	51
III-2-1-2- Population	51
III-2-1-3- Paramètres étudiés.....	51
III-2-2- Mode opératoire.....	51
IV. Résultats et interprétation	59
IV-1- Résultats.....	59
IV-1-1- Evaluation de la toxicité de FUNGIZONE	59
IV-1-2- Evaluation de l'effet de l'albumine sur la toxicité de FUNGIZONE.....	73
IV-1-2-1- Pré incubation FUNGIZONE avec l'albumine.....	73
IV-1-2-2- Pré incubation avec les cellules	84
IV-1-2-3- Comparaison entre la pré incubation de l'Am B (fungizone) avec albumine et celle de l'APH B avec la cellule	124
IV-2- Interprétation des résultats	140
V. Discussion.....	142
Conclusion et perspectives	145

Bibliographie

Annexes

Liste des tableaux

Tableau1 : Les différentes modalités de l'administration du Fungizone injectable.	14
Tableau2 : Valeurs normaux de la ligne érythrocytaire.	29
Tableau 3 : les différentes fonctions de l'albumine.	41

Liste des figures

Figure 1 : La structure chimique des pièces distinctives de l'amphotéricine B.	5
Figure 2 : Modèle tridimensionnel avec les dimensions moléculaires de l'amphotéricine B	6
Figure 3 : Les quatre classes les plus communes des agents antifongiques systémiques utilisés dans le traitement des infections fongiques systémiques et leurs mécanismes d'action.....	9
Figure 4 : Modélisation tridimensionnelle du pore formé par l'amphotéricine B au sein de la bicouche lipidique de la membrane fongique d'après Baginski et al (1997). Amphotéricine B : blanc(H), rouge(O), vert (C), bleu (N), ergostérol : rose.	10
Figure 5 : structure schématisée d'un pore amphotéricine B-stérol	11
Figure 6 : A) un pore unique de plusieurs molécules Am B. B) double pore à la taille d'une molécule de glucose (rayon = 4.6 °).....	11
Figure 7: Interaction amphotéricine B- cholestérol.....	20
Figure 8 : Structure du globule rouge.....	22
Figure 9: Schéma représentative de la structure de la membrane érythrocytaire.....	25
Figure 10 : Paires de chaînes polypeptidiques contenant une porphyrine contenant un atome de FER	27
Figure 11: Molécule de l'hème	28
Figure 12 : Catabolisme de l'hémoglobine	34
Figure 13: Représentations tridimensionnelles de l'albumine.	40
Figure 14 : Spectrophotomètre.....	49
Figure 15 : Agitateur magnétique.....	49
Figure 16 : Vortex	Erreur ! Signet non défini.
Figure 17 : Préparation de l'échantillon de travail.....	52

Figure 18: Préparation des SCF de la première partie.....	53
Figure 19: Préparation des points test de la première partie.....	54
Figure 20: Préparation des SCF de la deuxième partie.....	55
Figure 21: Préparation des points test de la deuxième partie.....	58
Figure 22 : Effet de la fungizone sur [Hb] (test 01).	59
Figure 23 : Effet de la fungizone sur la [k ⁺] (test 01).....	60
Figure 24: Effet de la fungizone sur [protéines] (test 01)	60
Figure 25: Rapport [k ⁺]/ [protéines] (test 01).....	61
Figure 26 : Effet de la fungizone sur [Hb] (test 02)	61
Figure 27 : Effet de la fungizone sur la [k ⁺] (test 02).	62
Figure 28 : Effet de la fungizone sur [protéines] (test 02).	62
Figure 29: Rapport [k ⁺]/ [protéines] (test 02).....	63
Figure 30 : Effet de la fungizone sur la [Hb] (test 03)	63
Figure 31 : Effet de la fungizone sur la [k ⁺] (test 03).....	64
Figure 32 : Effet de la fungizone sur [protéines] (test 03).	64
Figure 33 : Rapport [k ⁺]/ [protéines] (test 03).....	65
Figure 34 : Effet de la fungizone sur la [Hb] (test 04).	65
Figure 35 : Effet de la fungizone sur la [k ⁺] (test 04).....	66
Figure 36: Effet de la fungizone sur [protéines] (test 04).	66
Figure 37 : Rapport [K ⁺]/ [protéines] (test 04).....	67
Figure 38: Effet de la fungizone sur la [Hb] (test 05).	67
Figure 39 : Effet de la fungizone sur la [k ⁺] (test 05).....	68

Figure 40 : Effet de la fungizone sur [protéines] (test 05).	68
Figure 41: Rapport $[k^+]$ / [protéines](test 05).....	69
Figure 42 : Effet de la fungizone sur la [Hb] (test 06).	69
Figure 43 : Effet de la fungizone sur la $[k^+]$ (test 07).....	70
Figure 44 : Effet de la fungizone sur [protéines] (test 06).	70
Figure 45: Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 06).....	71
Figure 46: Effet de la fungizone sur la [Hb] (test 07).	71
Figure 47: Effet de la fungizone sur la $[k^+]$ (test 07).....	72
Figure 48: Effet de la fungizone sur [protéines] (test 07).	72
Figure 49: Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 07).....	73
Figure 50 : Effet de la fungizone sur la [Hb] en présence et en absence.....	73
Figure 51 : Effet de la fungizone sur la $[k^+]$ en présence et en absence.....	74
Figure 52 : Effet de la fungizone sur la [protéine] en présence et en l'absence de l'HSA (test 08).	74
Figure 53: Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 08).....	75
Figure 54: Effet de la fungizone sur la [Hb] en présence et en absence.....	75
Figure 55 : Effet de la fungizone sur la $[k^+]$ en présence et en absence.....	76
Figure 56 : Effet de la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 09). ...	76
Figure 57 : Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 09).....	77
Figure 58: Effet de la fungizone sur la [Hb] en présence et en absence.....	77
Figure 59: Effet de la fungizone sur la $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 10).....	78
Figure 60 : Effet de la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 10). ...	78

Figure 61: Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 10).....	79
Figure 62 : Effet de la fungizone sur la [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 11).	79
Figure 63 : Effet de la fungizone sur la $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 11).....	80
Figure 64 : Effet de la fungizone sur la [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 11).	80
Figure 65 : Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 11).....	81
Figure 66 : [Hb] en fonction de différentes doses de fungizone.	81
Figure 67: $[k^+]$ en fonction de différentes doses de fungizone.....	82
Figure 68 : [protéines] en fonction de différentes doses de fungizone.....	82
Figure 69: [Hb] en fonction de différente dose de fungizone en présence de l'HSA.....	83
Figure 70 : $[k^+]$ en fonction de différente doses de fungizone en présence de l'HSA.	83
Figure 71 : [protéines] en fonction des doses de fungizone en présence de l'HSA.	84
Figure 72 : Effet de la fungizone sur la [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 12).	84
Figure 73 : Effet de la fungizone sur la $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 12).....	85
Figure 74 : Effet de la fungizone sur la [protéines] en présence et absence de l'HSA (test 12).	85
Figure 75: Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 12).....	86
Figure 76 : Effet de la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 13).....	86
Figure 77 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 13)	87
Figure 78 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 13)	87
Figure 79 : Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 13).....	88
Figure 80 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 14).....	88
Figure 81 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 14)	89

Figure 82 :Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 14)	89
Figure 83: Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 14).....	90
Figure 84 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 15).....	90
Figure 85 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 15)	91
Figure 86 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 15)	91
Figure 87: Rapport $[k^+]$ /[protéines] (test 15).....	92
Figure 88: Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 16).....	92
Figure 89 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 16)	93
Figure 90 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 16)	93
Figure 91 : Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 16).....	94
Figure 92: Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 17).....	94
Figure 93 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 17)	95
Figure 94: Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 17)	95
Figure 95 : Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 17).....	96
Figure 96 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test18).....	96
Figure 97 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 18)	97
Figure 98 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 18).....	97
Figure 99: Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 18).....	98
Figure 100 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 19).....	98
Figure 101 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 19)	99
Figure 102: Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 19)	99
Figure 103: Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 19).....	100

Figure 104 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 20).....	100
Figure 105 : Effet la fungizone sur [k ⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 20)	101
Figure 106 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 20)	101
Figure 107 : Rapport [k ⁺]/ [protéines] (test 20).....	102
Figure 108 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 21).....	102
Figure 109 : Effet la fungizone sur [k ⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 21)	103
Figure 110 : Effet la fungizone sur [k ⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 21)	103
Figure 111: Rapport [k ⁺]/ [protéines] (test 21).....	104
Figure 112 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 22).....	104
Figure 113 : Effet la fungizone sur [k ⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 22)	105
Figure 114 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 22)	105
Figure 115 : Rapport [k ⁺]/ [protéines] (test 22).....	106
Figure 116 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 23).....	106
Figure 117 : Effet la fungizone sur [k ⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 23)	107
Figure 118 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 23)	107
Figure 119 : Rapport [k ⁺]/ [protéines] (test 23).....	108
Figure 120 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 24).....	108
Figure 121 : Effet la fungizone sur [k ⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 24)	109
Figure 122 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 24)	109
Figure 123 : Rapport [k ⁺]/ [protéines] (test 24).....	110
Figure 124 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 25).....	110
Figure 125 : Effet la fungizone sur [k ⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 25)	111

Figure 126 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 25)	111
Figure 127 : Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 25).....	112
Figure 128 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 26).....	112
Figure 129 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 26)	113
Figure 130 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 26)	113
Figure 131: Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 26).....	114
Figure 132 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 27).....	114
Figure 133 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 27)	115
Figure 134 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 27)	115
Figure 135: Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 27).....	116
Figure 136 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 28).....	116
Figure 137 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 28)	117
Figure 138 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 28)	117
Figure 139 : Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 28).....	118
Figure 140 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 29).....	118
Figure 141 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 29)	119
Figure 142 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 29)	119
Figure 143 : Rapport $[k^+]$ / [protéines] (test 29).....	120
Figure 144 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 30).....	120
Figure 145 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 30)	121
Figure 146 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 30)	121
Figure 147 : Rapport $[k^+]$ /[protéines] (test 30).....	122

Figure 148: Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 31).....	122
Figure 149 : Effet la fungizone sur [k ⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 31)	123
Figure 150: Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 31)	123
Figure 151 : Rapport [k ⁺]/ [protéines] (test 31).....	124
Figure 152 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 32).....	124
Figure 153 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 32)	125
Figure 154 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 32).....	125
Figure 155 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 33).....	126
Figure 156: Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 33).	126
Figure 157 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 33).....	127
Figure 158 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 34).....	127
Figure 159 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 34)	128
Figure 160 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 34).....	128
Figure 161 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 35).....	129
Figure 162 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 35)	129
Figure 163 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 35).....	130
Figure 164 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 36).....	130
Figure 165 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 36)	131
Figure 166 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 36).....	131
Figure 167 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 36).....	132
Figure 168 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 36)	132
Figure 169 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 36).....	133

Figure 170 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA.....	133
Figure 171 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 38)	134
Figure 172: Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 38).....	134
Figure 173 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 39).....	135
Figure 174 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 39)	135
Figure 175 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 39).....	136
Figure 176 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 40).....	136
Figure 177 : Concentration du potassium intracellulaire en présence d'HSA (test 40)	137
Figure 178 : Concentration des protéines en présence d'HSA (test 40).....	137
Figure 179 : Concentration de l'hémoglobine en présence d'HSA (test 41)	138
Figure 180 : Concentration du potassium intracellulaire en présence d' HSA (test 41)	138
Figure 181: Concentration des protéines en présence d'HSA (test 41).....	139

Liste des abréviations

°C: degré Celsius.

2-3 DPG: 2-3Diphosphoglycérate.

Å: Angstrom.

ADP: Adénosine diphosphate.

AmB : Amphotéricine B.

ATP: Adénosine triphosphate.

BCS: Système de Classification Biopharmaceutique.

C: Carbone.

CCMH: La concentration corpusculaire hémoglobinique moyenne.

Chr : Chromosome.

CMC: Concentration Micellaire Critique.

CMI: Concentration Maximal Inhibitrice.

CO₂: dioxyde de carbone.

DCI : Dénomination commun international.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

FDA: Food and Drug Association.

fl: femtolitre.

g/dl: gramme par décilitre.

g/j: gramme par jour.

G/L: Globule par litre

g/l: gramme par litre.

G: gramme.

G6PD: glucose-6-phosphate déshydrogénase.

GR : Globule Rouge.

H: Hydrogène.

Hb: Hémoglobine.

HDL:High Density Lipoproteine.

HSA: Serum albumin humaine

IV: Intra veineuse.

kDa: Kilo Dalton.

L/Kg: litre par killogramme

LDH: Lactate deshydrogénase.

LDH:lactatedéshydrogénase.

LDL:Low Density Lipoprotein.

M: Molaire.

Mg/ml: milligramme par millilitre.

Mg: milligramme.

MGG:May-Grünwald Giemsa

min: minute

mM:millimole.

N: Azote.

NADH: nicotinamide adénine dinucléotide hydrogène.

NADPH:nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène.

NFS: Numération de la Formule Sanguin.

nm : nanomètre.

pg/c: picogramme par cellule.

RMN²³Na :Résonance Magnétique Nucléaire en sodium 23.

SCF : suspension cellulaire fille

SCM : suspension cellulaire mère.

TCMH: La teneur globulaire moyenne en hémoglobine

TNF α :Tumor Necrosis Factor α .

TPBS:Tampon phosphate salin.

tr/min :tour par minute.

VGM : volume globulaire moyen.

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine.

Introduction

Les mycoses invasives sont des pathologies sévères dont l'incidence augmente, en raison des facteurs de risque dominés par l'immunodépression (VIH, malades traités par immunosuppresseurs ou chimiothérapie et les transplantés d'organes ou de cellules souches hématopoïétiques). Le National Nosocomial Infections Study System fait état d'une augmentation de l'incidence des infections fongiques de 2 à 3,8 ‰ au cours de la décennie 1980–1990. Le taux de mortalité et de morbidité associé aux infections fongiques invasives est très élevé, souvent supérieur à 50 % selon les germes et le terrain(1,2).

Plusieurs molécules ont une activité antifongique, le plus ancien est la nystatine dont la forte toxicité limite son utilisation puis arrive en deuxième position l'amphotéricine B, qui est un antibiotique de polyène découvert il y a plus de 50 ans pour le traitement des infections fongiques et parasitaires systémiques. L'avantage clinique important de l'AmB est que seulement quelques cas de résistance à cette drogue ont été rapportés(3,4).

Ce médicament est caractérisé par une fourchette thérapeutique étroite, et montre des effets secondaires toxiques graves, particulièrement la néphrotoxicité exigeant l'hospitalisation qui peut durer jusqu'à 30 jours, ces inconvénients ont conduit au développement de formulations liposomales qui partagent le même spectre antifongique mais différent dans l'efficacité et la toxicité(5,6).

Vu le coût élevé de l'amphotéricine B liposomale et sa non-disponibilité dans les pays du Maghreb(7), nous proposons d'étudier et évaluer l'effet anti oxydant de l'albumine sur l'amphotéricine B.

Première partie
Revue
bibliographique

Chapitre I

Fungizone

1 Forme et Présentation

L'amphotéricine B (AmB) est un antibiotique macrolide de polyène, au départ isolé à partir de *Streptomyces nodulus* en 1955 à Venezuela par Gold et al mais sa structure chimique complète n'a été établie qu'en 1970. En raison de son activité antifongique efficace, l'AmB a été rapidement présenté comme le traitement de la mycose systémique et elle a reçu l'approbation de FDA en 1958 bien avant que sa structure chimique ne soit connue(8–10).

C'est un agent antifongique et antiparasitaire puissant et est le médicament de choix pour le traitement de la leishmaniose viscérale et les infections fongiques systémiques potentiellement mortelles de *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* chez les patients immunodéprimés. AmB appartient à la classe IV dans le système de classification biopharmaceutique (BCS) avec une solubilité aqueuse limitée et une faible perméabilité intestinale(9).

Une dispersion micellaire de désoxycholate (Fungizone®) a été la première formulation disponible de l'AmB en intraveineuse (iv) (4).

L'AmB peut être commercialisé sous forme de :

- Suspension buvable 10% (orangée) : Flacon de 40 ml.
- Suspension buvable 10% nourrisson et enfant : Flacon de 40 ml + 1 pipette doseuse de 1 ml.
- Poudre pour solution injectable à 50 mg (en perfusion Intraveineuse) : flacon, boîte unitaire (11,12).

2 La synthèse

Aujourd'hui la synthèse des polyènes par les bactéries du genre *Streptomyces* se fait par l'intermédiaire d'un cluster de gènes relativement bien conservés entre les différentes espèces de ce genre.

le cluster contient des gènes codant plusieurs polykétides synthétases, des transporteurs membranaires de type ABC, des enzymes à cytochrome P450 et des enzymes chargées de la synthèse ainsi que de l'attachement du groupement mycosamine(13).

Bien que les polyènes puissent être synthétisés chimiquement, ils sont encore produits aujourd'hui, pour des raisons économiques, à partir de cultures de *Streptomyces spp* (14,15).

3 Composition

Principe actif : Amphotéricine B (DCI)

Excipients : désoxycholate de sodium, phosphate disodique dodécahydraté, phosphate monosodique dihydraté.

Teneur en sodium : environ 7 mg par flacon (11).

4 Classe thérapeutique

Antifongique de la famille des polyènes (11).

5 Structure chimique :

Nom propre : Amphotéricine B.

Nom chimique : acide carboxylique de [1R(1R, 3S, 5R, 6R, 9R, 11R, 15S, 16R, 17R, 18S, 19E, 21E, 23E, 25E, 27E, 29E, 31E, 33R, 35S, 36R, 37S)]-33-[(3-amino-3,6-didésoxy-β-Dmannopyranosyl)oxy]-14, 39-dioxabicyclo[33.3.1]nonatriaconta-19, 21, 23, 25, 27, 29, 31-heptane-36. (16).

Formule développée : c'est une macrolactone polyénique qui comporte 47 atomes de carbone (17).

La molécule comprend : un système de 7 liaisons conjuguées, 10 fonctions hydroxylées dont 8 libres, une engagée (réversiblement) dans un hémicétal et une dans une liaison osidique, une fonction carboxylique libre et une fonction cétone engagée dans l'hémicétal.

En plus, 3 groupements méthyle sont fixés sur la chaîne.

L'aglycone (amphotéronolide B) qui contient 14 carbones asymétrique, porte en C19 un ose, la mycosamine (18).

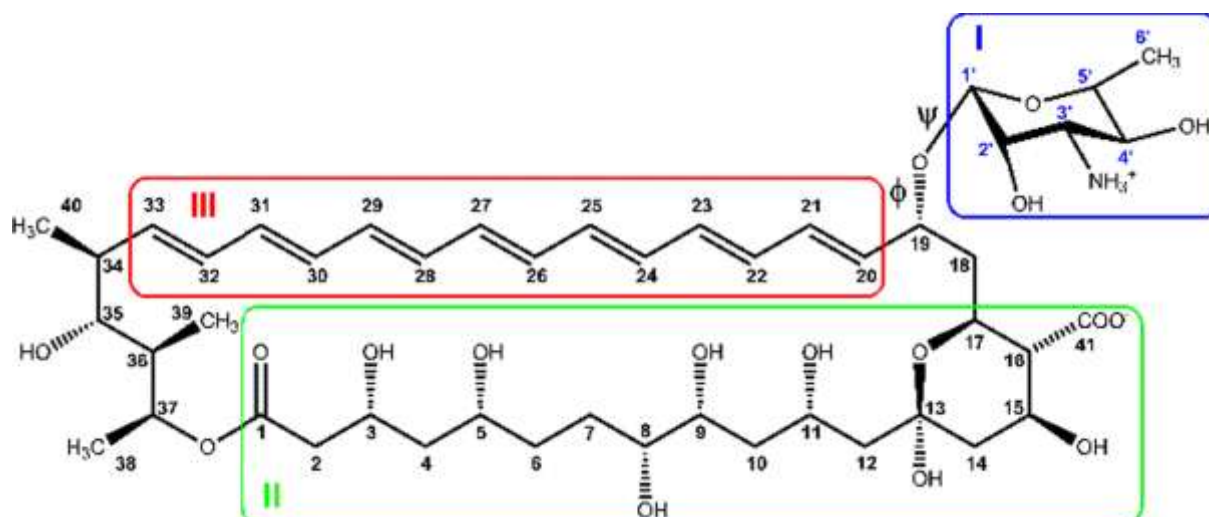


Figure 1 : La structure chimique des pièces distinctives de l'Am B(19).

Trois parties de la structure d'AmB ont été marquées, responsable de l'organisation moléculaire et des propriétés spectroscopiques dans la région d'UV-Force : un mycosamine de sucre (I), côté polaire de l'anneau de macrolide (II) et une chaîne de polyène constituée par 7 liaisons C = C conjuguées (III) (19).

Formule empirique : C₄₇H₇₃NO₁₇

Poids moléculaire : 924,1 (16).

6 CONDITIONS DE CONSERVATION

6.1 Avant reconstitution

La conservation du conditionnement primaire se fait dans l'emballage extérieur, à l'abri de la lumière à une température comprise entre + 2 °C et + 8 °C.

Dans des cas exceptionnels, un flacon non ouvert peut être conservé sans réfrigération à une température ne dépassant pas 25 °C pendant une période de 7 jours. A tout moment durant ces 7 jours, il peut être remis, non ouvert, au réfrigérateur. Tout flacon non réfrigéré pendant plus de 7 jours doit être détruit (11,12).

6.2 Après reconstitution

- Solution concentrée (50 mg dans 10 ml) : 24 heures à une température comprise entre + 2 °C et + 8 °C.
- Solution pour perfusion (0,1 mg/ml ou moins) : à utiliser immédiatement (11,12).

7 Caractéristiques physicochimiques

L'Am B se présente sous forme de poudre jaune qui ne possède pas de point de fusion défini. Il est pratiquement insoluble dans l'eau et dans les solvants peu polaires (CHCl_3 , benzène, hexane...), très faiblement soluble dans l'éthanol ($0.4\mu\text{g/ml}$) et soluble dans le DMSO ($30\mu\text{g/ml}$). Ces solubilités dépendent du pH : ainsi, en milieu acide ou basique, la solubilité dans le méthanol est multipliée par 10. En milieu aqueux, l'adjonction de l'aurylsulfate de sodium ou le désoxycholate de sodium permet une augmentation sensible de la concentration(18).

Il fait partie de la famille des macrolides polyéniques (famille d'agents macrocycliques), et comporte dans sa structure deux parties :

- ✓ Des groupes chimiques carboxyliques et aminés, confèrent à la molécule le caractère amphotère, dont les pK sont de 5,7 et 10,0.
- ✓ Deux chaînes polaires et apolaires (Figure N°01, b), lui confèrent un caractère amphiphile et une forme allongée en bâtonnet.

Cette structure stéréochimique avec des dimensions moléculaires de 6Å de hauteur, 7Å de largeur, et 24Å de longueur (Figure N°02 b), est responsable en grande partie de la formation des pores(18,20–22).

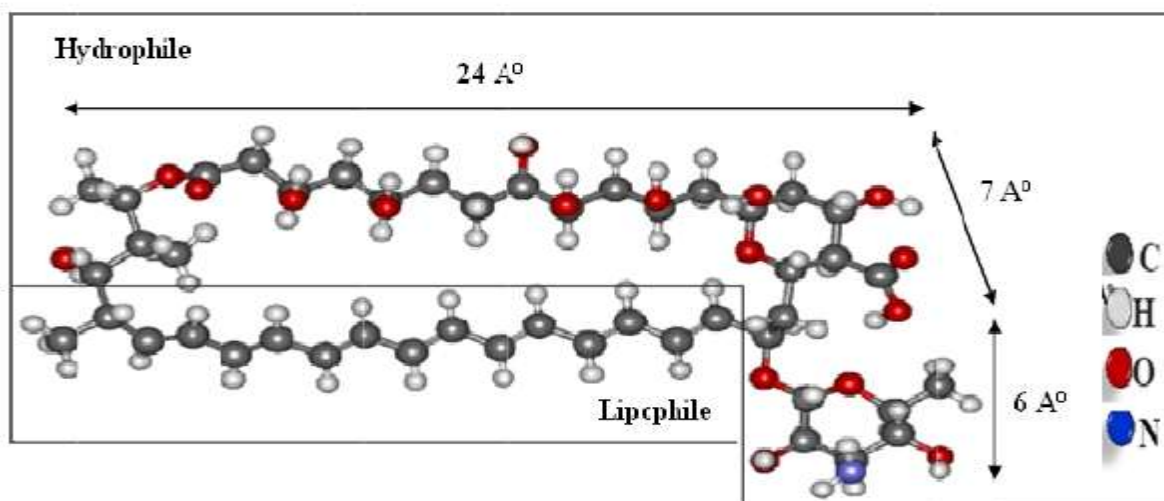


Figure2 : modèle tridimensionnel avec les dimensions moléculaires (b) de l'Am B(23) .

L'amphotéricine B se trouve schématiquement sous trois formes :

- Agrégée responsable de la toxicité ;
- Oligomérique(essentiellement dimère) douée d'une moindre toxicité ;
- Monomérique peu toxique responsable de l'activité antifongique.

L'équilibre entre ces trois formes n'est pas figé, il varie selon la concentration de l'antifongique, le milieu dans lequel il est solubilisé et l'action des surfactants ou autres excipients. Nous comprenons alors l'importance du choix du support de solubilisation pour réduire la proportion de la forme toxique de cette drogue(24).

La molécule d'Am B est sensible à la lumière et à l'hydrolyse alcaline ou acide, En milieu acide (HCl, H₂O), la mycosamine est libéré et dans les conditions plus poussées, elle est classiquement transformée en 5-méthylefurfural(18).

8 Pharmacocinétique

8.1 Absorption

L'amphotéricine c'est une macromolécule qui n'est pas, ou très peu, absorbée par voie orale. Les formes pharmaceutiques destinées à cette voie sont donc uniquement destinées à combattre, in situ, des infections digestives. Pour être efficaces sur les infections systémiques, l'Am B doit être administré par voie parentérale et seule la voie intraveineuse peut être utilisée(25).

8.2 Distribution

La distribution d'Am B dépend fortement de :

- la formulation pharmaceutique,
- l'attache aux protéines plasmatiques,
- L'écoulement de sang aux organes,
- et le statut de la maladie qui peut également influencer le degré d'accumulation d'Am B dans les tissus(4,9).

Des concentrations élevées d'amphotéricine B sont trouvées dans le foie (14 à 41 % de la dose administrée), les reins (0,3 à 2 %) et les poumons (1,2 à 6 %)(26).

Il est fortement lié aux protéines (> 95%), de manière significative à l'albumine, à l'acide α 1- glycoprotéine et aux lipoprotéines (en particulier aux fractions de HDL du plasma et LDL ; Les récepteurs pour LDL sont exprimés plus fortement sur les cellules endothéliales glomérulaires et peut contribuer à la concentration relativement élevée d'AmB dans les reins)(4,9,27,28).

la distribution suit un modèle tricompartimental avec un volume de distribution de 4 L/kg comprenant un compartiment central et deux compartiments périphériques, l'un d'équilibration rapide, l'autre d'équilibration lent, ce dernier contenant les 2/3 de la quantité totale d'Am B dans l'organisme(29).

le taux plasmatiques est de 3 à 4 $\mu\text{g/ml}$ dès le début de la perfusion et de 1 à 2 $\mu\text{g/ml}$ après 20 heures (concentrations efficaces de = 0.5 à 2 $\mu\text{g/ml}$), le passage méningé est assez faible (0.46 $\mu\text{g/ml}$)(30).

Une fois l'amB atteint les tissus, elle y restera accumulé un certains temps puis sera relargué de nouveau à la circulation sanguine et éliminé plus tard (31).

8.3 Métabolisme

Aucune voie métabolique n'a été identifiée pour AmB (4).

8.4 Elimination

L'amphotéricine B est éliminée très lentement par les reins, 2 à 5 % de la dose administrée étant éliminés sous forme biologiquement active. Après arrêt du traitement, le produit peut être détecté dans les urines pendant 3 ou 4 semaines du fait de sa lente élimination(11).

Les dégagements biliaires et métaboliques expliquent seulement 3-40% de l'élimination totale, l'élimination rénale est faible et prolongée; 20 à 30% de la dose injectée sont souvent retrouvées dans les urines au 7eme jour(4,32).

L'amphotéricine B est un produit non dialysable(30).

Les modalités d'élimination de l'AmB ne sont pas connus, de ce faite il n'existe pas de métabolite connu, d'ailleurs, les concentrations sériques en AmB ne sont influencées ni par l'insuffisance hépatique ni par l'insuffisance rénale, cette dernière notion étant indépendante de la toxicité rénale qu'exerce l'AmB.

Le mode d'élimination de l'Am B est biphasique : la demi-vie plasmatique initiale est de 24 à 48 heures et la demi-vie d'élimination terminale d'environ 15 jours(25,33).

9 Mécanisme d'action

L'activité antifongique de l'amphotéricine B est due à sa liaison sélective à l'ergostérol de la membrane fongique(34).

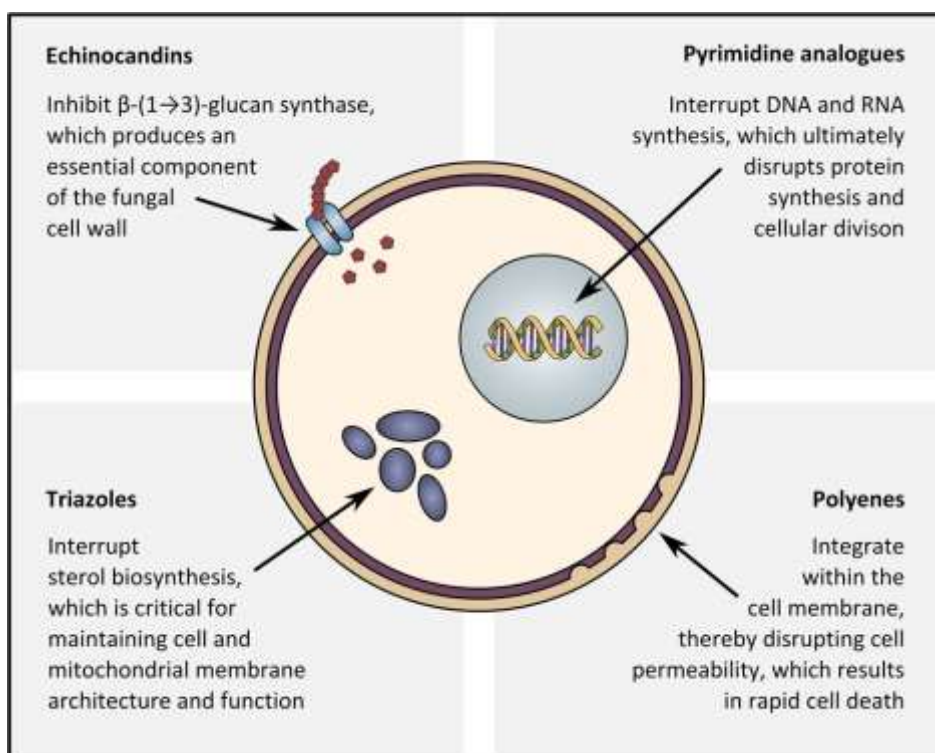


Figure 3 :Les quatre classes les plus communes des agents antifongiques systémiques utilisés dans le traitement des infections fongiques systémiques et leurs mécanismes d'action(35).

Il semble que ce mécanisme soit plus complexe et résulte de la formation de structures plus organisées transmembranaires ; les molécules d'Amp B s'organisent entre elles en tubules présentant une face externe lipidique (partie polyénique) se fusionnant à la membrane phospholipidique et une face interne (partie polyol), hydrophile, et permettant le passage des ions (structure en barillet)(18).

Les données de résonance magnétique nucléaire indiquent que 8 molécules d'AmB s'associent à 8 molécules d'ergostérol par leur partie polyénique tandis que les faces hydrophiles ménagent un canal central de 70 à 100 nm de diamètre (Figure 4)(36).

La fuite par ces pores des constituants cytoplasmiques, notamment le sodium et le potassium, est responsable de la mort cellulaire(34).

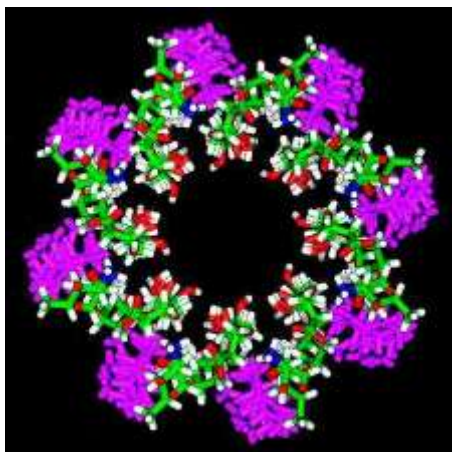


Figure 4 : Modélisation tridimensionnelle du pore formé par l'Am B au sein de la bicouche lipidique de la membrane fongique Am B : blanc(H), rouge(O), vert (C), bleu (N), ergostérol : rose(36).

Elle agit aussi par la stimulation de la consommation d'oxygène et la transformation de l'ATP en ADP en aboutissant à l'altération de la perméabilité cellulaire.

Elle présente une activité fongistatique à faible concentration et fongicide pour des concentrations élevées (0.5 à 2 fois la CMI)(37).

Le rôle de ces antibiotiques polyéniques dans la perturbation de la dynamique des échanges ioniques à travers la membrane a été mesuré par RMN ^{23}Na .

De plus, il semble que l'Am B favorise des réactions d'oxydation dommageable pour le champignon.

Agissant simplement par ses propriétés physicochimiques, l'Am B n'entraîne pas de sélection de souche résistante, mais les résistances sont dues à une moindre concentration de la membrane en stérols(18).

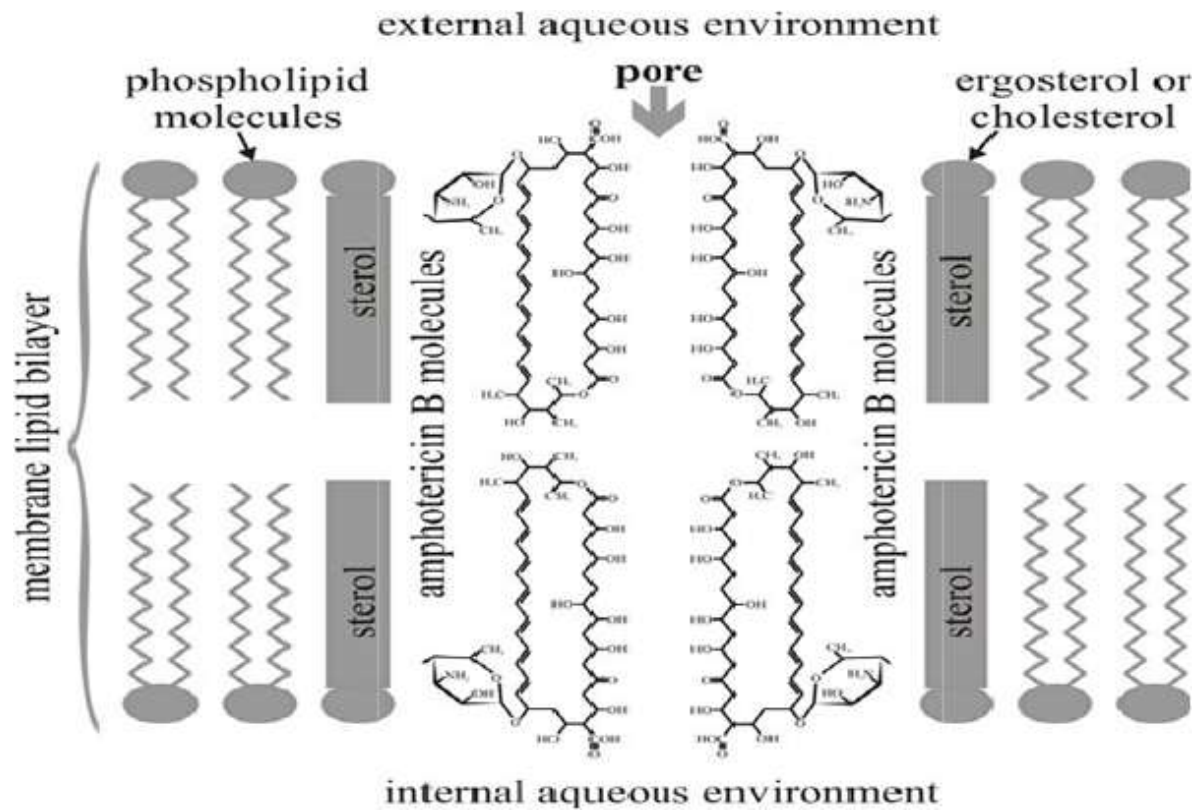


Figure 5 : structure schématique d'un pore Am B-stérol (38).

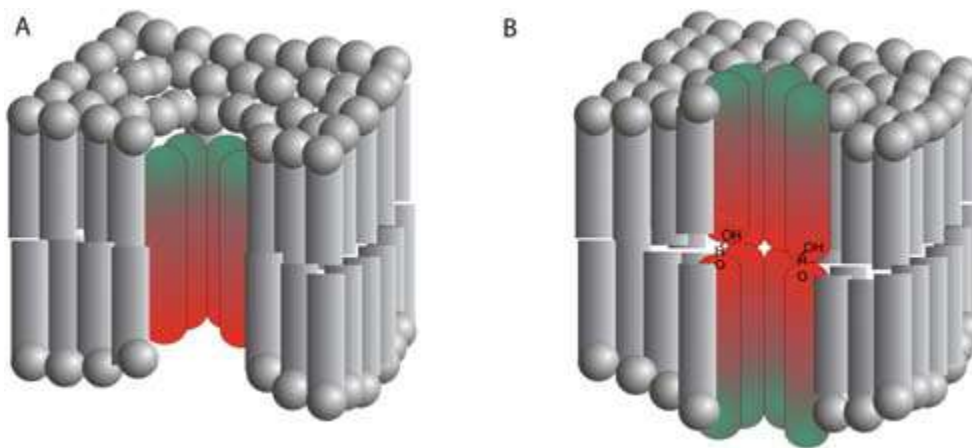


Figure 6 : A) un pore unique de plusieurs molécules AmB. B) double pore à la taille d'une molécule de glucose (rayon = 4.6 °)(10).

10 Spectre d'action

L'activité antifongique systémique de l'Am B s'exerce contre :

- des levures : *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Torulopsis glabrata* ;
- des *Aspergillus* ;
- *Blastomyces dermatitidis*, *coccidioide immitis* ;
- *Histoplasma capsulatum*(39).

11 Indication

Ce sont les mycoses profondes, septicémique ou viscérales, à germes sensibles exemples :

- candidose généralisée ou systémique = moniliase (septicémie, endocardite, méningite parfois ostéomyélite) ;
- aspergillose : aspergillome pulmonaire ;
- histoplasmosse (lésion pulmonaire initiale, puis dissémination hématogène, ulcérations bucco-pharyngées, nécrose surrénalienne...) ;
- coccidioidomycose (atteinte pulmonaire initiale, puis dissémination, passage à la chronicité = fièvre de San joaquim) ;
- cryptococcus (ou torulose) ;
- blastomycose nord américaine, et paracoccidioidomycose ou blastomycose sud-américaine ;
- torulepsis, sporotrichoses ;
- miningo-encéphalite amibienne primitive suraiguë ;
- la leishmaniose cutanéomuqueuse sans être le traitement de choix en première intention(39,30,12).

12 Contre-indications

FUNGIZONE® (amphotéricine B) est contre-indiqué chez les patients ayant des antécédents d'hypersensibilité à l'amphotéricine B ou à l'un des ingrédients de la préparation, sauf si l'avis du médecin la préconise ou si le pronostic vital est engagé et ne peut être traitée que par l'amphotéricine B(16).

Grossesse :

Compte tenu du bénéfice maternel attendu, ce médicament peut être administré avec précaution durant la grossesse. Une surveillance fœtale et néonatale est recommandée en raison du profil d'effet indésirable du produit (notamment surveillance rénale)(12).

13 Posologie

13.1 Traitements topiques

L'emploi de molécules antifongiques par voie topique peut être justifié. En effet, l'application de traitements locaux présente différents avantages comme :

- la diminution des effets systémiques de molécules potentiellement toxiques par voie générale,
- l'induction d'un effet adjuvant complémentaire à la voie systémique,
- le traitement de lésions localisées(40).

13.2 Traitement général (Voie intraveineuse (perfusion))

Ce médicament devra être administré en perfusion intraveineuse lente (environ 2 à 6 heures). La concentration pour la perfusion intraveineuse ne doit pas dépasser 0,1 mg/ml (1 mg/10 ml).

Comme la tolérance varie beaucoup selon les patients, la posologie de l'amphotéricine B doit être individualisée et ajustée selon les besoins spécifiques de chaque patient (tels que site et intensité de l'infection, agent étiologique, etc.). Compte tenu des risques allergiques.

- une dose-test initiale de 1 mg (IV lente).
- Dose habituelle 0.3 mg/kg/24 heures (perfusion IV).
- Puis augmenter progressivement si besoin de 5 à 10 mg/24 heures jusqu'à 1 mg/kg/24heures(11,41).

Tableau1 : Les différentes modalités de l'administration du Fungizone injectable(41).

Voie	Présentation	Préparation		administration
		Reconstitution	Dilution	
Sous-cutanée	ne pas injecter par cette voie			
Intramusculaire	Ne pas injecter par cette voie			
Intraveineuse pour la dose test uniquement	Poudre : flacon de 50mg.	Solvant : eau p.p.i Volume : 10 ml	Véhicule : glucosé 5%. Volume : 20ml pour 0,2ml de produit reconstitué.	IV lente en 20 à 30 minutes.
Perfusion IV	Poudre : flacon de 50mg.	Solvant : eau p.p.i Volume : 10 ml	Véhicule : glucosé 5%. Volume : 500ml	IV en 2 à 6 heures

Il faut adapter la posologie en cas

- d'insuffisance cardio-pulmonaire.
- réaction sévère à la dose test(41).

Autres voie d'administration

L'administration est possible très exceptionnellement (en complément des perfusions IV) en administration locale :

- Par voie intrarachidienne (0.5 mg × 1 à 2 fois /semaine dans les méningites à *cryptococcus*).
- Par voie intrapéritoniale(10 à 30 mg dans les péritonites à *candida*).
- Par voie intrapleurale (10 à 30 mg dans les pleurésies à *candida* ou à *aspergillus*)(30).

NB : Une perfusion trop rapide du médicament risque d'abaisser la tension artérielle et de provoquer une arythmie cardiaque (battements de cœur irréguliers).

Il est essentiel que les perfusions d'amphotéricine B soient suivies d'un traitement d'entretien consistant en l'administration d'antifongiques oraux tels le fluconazole et l'itraconazole(42).

14 Précautions d'emploi

Médicament toxique à n'utiliser qu'en milieu hospitalier spécialisé, sous surveillance clinique et biologique stricte (fonction rénal, NFS, ionogramme plasmatique chaque semaine, et si besoin détermination des concentrations plasmatiques du médicament).

Associer à un traitement préalable par aspirine ou paracétamol (60 minutes avant la perfusion), hydrocortisone (25 à 50 mg en IV directe juste avant la perfusion).

Insuffisance rénale (uniquement si indication vitale) : réduire la posologie ou espacer les perfusions, et déterminer les taux de l'Am B si possible → arrêt si la créatininémie > 30mg/l(30).

15 Effets indésirables des antifongiques systémiques

15.1 Réactions liées à la perfusion

Pour les effets généraux liés à la perfusion, il s'agit, de fièvre, de nausées, de vomissements et de céphalées... Plus localement, on peut signaler des phlébites dont l'incidence peut être réduite en respectant :

- les concentrations maximales recommandées,
- une durée minimale d'administration de 4 heures,
- en variant les sites d'administration, et notamment en utilisant un site veineux à gros débit sanguin ou une voie veineuse centrale (25).

15.2 La toxicité rénale

La toxicité rénale constitue un facteur limitant l'utilisation de l'AmB. Elle est consécutive à une diminution du débit de filtration glomérulaire et se manifeste par une augmentation de la créatininémie. L'amB peut bien évidemment être seule responsable de cette toxicité, mais les formes sévères sont plus souvent dues à un cumul de facteurs de risque : association avec d'autres médicaments néphrotoxiques tels que ciclosporine ou tacrolimus, les médicaments des patients greffés et sujets à des infections fongiques opportunistes. Les sels de platine utilisés pour traiter certains patients cancéreux également prédisposent aux infections fongiques...

Cet effet indésirable peut être diminué en intensité et en fréquence par des mesures d'hyperhydratation, avec 500 ml d'un soluté massif injectable isotonique, le NaCl 0,9 % par exemple. Il justifie le suivi quotidien de la fonction rénale pendant les deux premières semaines puis un suivi hebdomadaire (25).

15.3 Troubles électrolytiques dus à l'Am B

L'augmentation de la perméabilité de la membrane tubulaire distale est responsable de fuites ioniques de potassium, de magnésium... Ces fuites nécessitent des suppléments. Bien que l'hypokaliémie soit en général présente à l'esprit, il ne faut pas oublier le magnésium, d'autant que l'hypokaliémie ne peut être corrigée si l'hypomagnésémie persiste. Ces effets indésirables conduisent à une surveillance de l'ionogramme sanguin avant instauration du traitement puis de façon bihebdomadaire(25).

15.4 Anémie sous Am B

L'anémie est relativement fréquente. Caractérisée par une normochromie et une normocytose, elle peut survenir jusqu'à une dizaine de semaines après l'instauration du traitement. Cette anémie doit être dépistée en réalisant une numération-formule sanguine une fois par semaine(25).

Enfin, bien que rares, des réactions allergiques sévères, jusqu'au choc anaphylactique peuvent survenir. Elles sont détectées par l'administration du premier milligramme d'AmB avec prudence, donc lentement, sous surveillance étroite. Si aucune réaction d'intolérance n'apparaît durant les 30 premières minutes, le risque de choc peut en principe être écarté, et la perfusion être menée à son terme(25).

La fréquence de la toxicité rénale de l'Am B a conduit au développement de formulations lipidiques mieux tolérées. Les formulations ainsi développées ont abouti à trois conformations : des rubans lipidiques (ABLC, commercialisés sous le nom de spécialité Abelcet®), des discoïdes (ABCD, un temps disponible sous le nom d'Amphotec®, finalement non commercialisée) et, le plus abouti au plan galénique, des liposomes, commercialisés sous le nom d'AmBisome®(25).

Sur le plan du devenir dans l'organisme, les formulations lipidiques d'AmB sont caractérisées par une captation rapide par le système réticulo-endothélial(25).

16 La résistance

La résistance aux polyènes résulte soit d'une réduction quantitative, soit d'une altération de la nature de l'ergostérol membranaire, avec pour conséquence, une diminution de liaison polyène-ergostérol. L'utilisation antérieure de dérivés azolés, capable d'interférer avec la synthèse d'ergostérol, peut induire de résistance aux polyènes. La chimiothérapie et la radiothérapie ont été incriminées dans l'acquisition de résistance chez les patients immunocompromis n'ayant jamais reçu d'antifongique antérieurement. En fait, un des mécanismes d'action invoqué pour les polyènes est l'oxydation létale pour les cellules fongiques. Des traitements de conditionnement par chimiothérapie ou radiothérapie peuvent générer, par mutation, des cellules fongiques capables de résister aux effets toxiques des superoxydes(33).

17 Interactions médicamenteuses

Les risques d'interactions sont liés aux effets néphrotoxiques, hypokaliémiques et hématotoxiques de l'amphotéricine B(11).

17.1 Interactions déconseillées

- Médicaments donnant des torsades de pointes (terfénadine, vincamine, astémizole, bépridil, érythromycine IV, halofantrine, pentamidine, sparfloxacine, sultopride) : l'hypokaliémie est un facteur favorisant de même que la bradycardie et un espace QT long préexistant. Utiliser des substances ne présentant pas l'inconvénient d'entraîner des torsades de pointes en cas d'hypokaliémie (11,12).

17.2 Interactions nécessitant des précautions d'emploi

- Digitaliques : hypokaliémie favorisant les effets toxiques des digitaliques. Surveillance de la kaliémie et, s'il y a lieu, de l'ECG.
- Médicaments hypokaliémisants : diurétiques hypokaliémisants (seuls ou associés), laxatifs stimulants, gluco et minéralocorticoïdes (voie générale), tétracosactide : risque majoré d'hypokaliémie (effet additif). Surveillance de la kaliémie et si besoin correction, à prendre particulièrement en compte en cas de thérapie digitalique associée.
- Médicaments donnant des torsades de pointes (amiodarone, brétylium,
- disopyramide, quinidinique, sotalol) : prévention de l'hypokaliémie et, si besoin, correction.
Surveillance de l'espace QT. En cas de torsades, ne pas administrer d'antiarythmique (entraînement électrosystolique)(11,12).

17.3 Interactions à prendre en compte

- Zidovudine : augmentation de la toxicité hématologique (addition d'effets de toxicité médullaire). Contrôle plus fréquent de l'hémogramme.
- Aminosides : risque accru de néphrotoxicité.
- Ciclosporine, tacrolimus : augmentation de la créatinine plus importante que sous l'immunosuppresseur seul (synergie des effets néphrotoxiques des deux substances) (11).

18 Toxicologie

Une autre propriété importante de l'amphotéricine B est sa toxicité relativement élevée pour les cellules de mammifères lorsqu'elle est administrée par injection intraveineuse. D'après les études sur les cellules animales et sur les animaux, l'activité de l'Am B dépend de sa concentration. Cette activité se manifeste si la concentration d'Am B est supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC) à partir de laquelle la forme agrégée de l'Am B apparaît (43).

Il est possible que les structures de pores, dans lesquels on trouve un assemblage multimoléculaire hydrophobe de molécules de cholestérol ou d'ergostérol et d'antibiotique, soient formées plus facilement à partir des agrégats d'Am B. Malheureusement, la toxicité de l'antibiotique dépend aussi fortement de la dose administrée. Cependant, la dose quotidienne maximale d'Am B, limitée à 1,0 mg/kg, peut être insuffisante pour un traitement clinique efficace (43).

18.1 Symptômes et traitements du surdosage

Le surdosage à l'amphotéricine B peut provoquer un arrêt cardiaque ou un arrêt cardiorespiratoire potentiellement mortel. Lorsqu'on soupçonne un surdosage, il faut arrêter le traitement et surveiller l'état clinique du patient (par exemple : fonctions cardiorespiratoire, rénale et hépatique, résultats hématologiques, électrolytes sériques) et administrer le traitement de soutien, si cela est nécessaire. L'amphotéricine B ne peut être éliminée par hémodialyse. Il faut stabiliser l'état du patient et corriger les carences électrolytiques avant d'amorcer de nouveau le traitement(16).

18.2 Mode d'action toxique

L'Am B lié également aux composants de cholestérol des cellules mammifères et donc est généralement associée aux événements défavorables toxiques, même si l'amphotéricine B se fixe préférentiellement à l'ergostérol des cellules fongiques, elle a également une action sur le cholestérol des membranes des cellules animales (Figure N°07), conduisant à une toxicité importante, notamment rénale, mais avec une faible affinité pour le cholestérol par rapport à l'ergostérol. Elle pourrait être responsable d'une réaction oxydative et stimulation de l'immunité cellulaire de l'hôte. Elle stimulerait les lymphocytes, les macrophages, et les polynucléaires neutrophiles et induirait la production d'interleukine-1 et du TNF α (44,45). Cette toxicité est due partiellement à la peroxydation lipidique exercée par l'amphotéricine B au niveau des membranes cellulaires.

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés quelle que soit leur origine sont concernés(46).

In vivo, la peroxydation lipidique est un phénomène également très important. Les membranes des cellules sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (30 à 50 %) présents dans les phospholipides, les sphingolipides et les cardiolipides(46).

La lipoperoxydation des membranes va altérer leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...) (46).

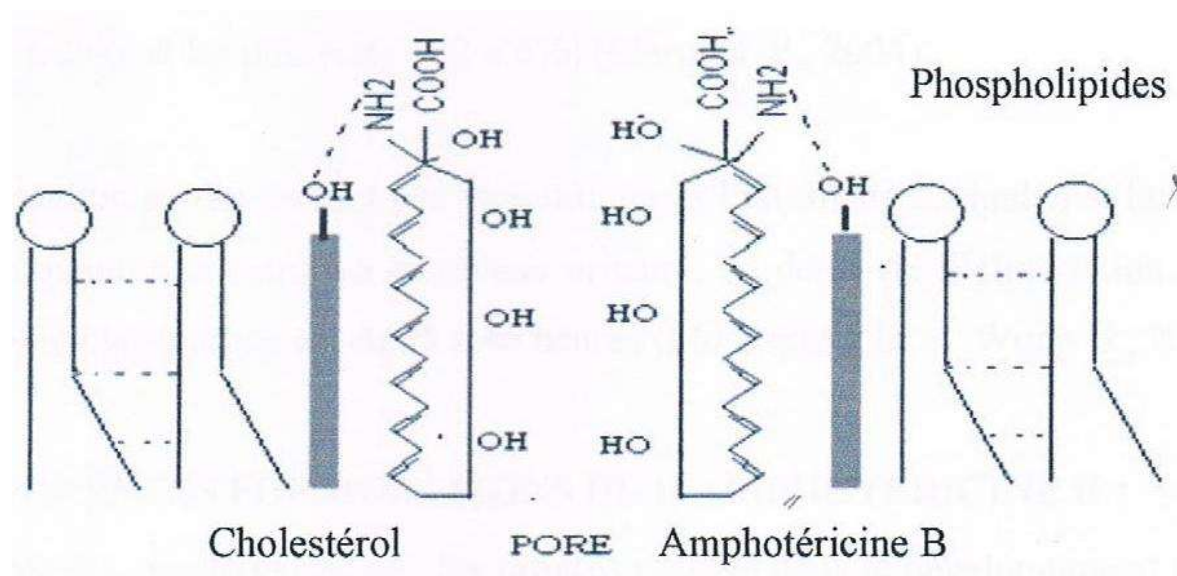


Figure 7: Interaction Am B- cholestérol (47).

Cette observation a orienté les chercheurs vers le choix des antioxydants pour piéger les radicaux libres afin de protéger ou bien empêcher la propagation de ce mécanisme de dommage irréversible.

En effet ANDREWS et coll., (1977) ainsi que BEGGS et coll., (1977), ont montré que l'addition de quelques antioxydants (n-propyl gallate, hydroxyanisolebutylé, hydroxytoluènebutylé, acide nordihydroguaiarétique et l'acide D- α -tocopherolsuccinate) avec l'AmB permet de stabiliser la molécule d'AmB contre l'autodégradation afin de prolonger l'activité antifongique vis-à-vis de *C. albicans* (35).

Dans notre travail, nous avons associé le sérum albumine à l'amphotericineB pour étudier et évaluer l'effet anti oxydant de l'albumine sur la toxicité du fungizone®.

Chapitre II

Globule rouge

1 Histoire

Décrit pour la première fois en 1674 sous le terme de globule rouge par le hollandais Leeuwenhoek, l'érythrocyte ou hématie est une cellule mature formée dans la moelle osseuse lors du processus de l'érythropoïèse(48).

Les érythrocytes ou hématies sont les globules rouges, transporteurs d'oxygène, approvisionnant tous les processus métaboliques de l'organisme.

Ce sont, avec les plaquettes, les seules cellules anucléées du système sanguin. Leur forme physiologique de disque avec un gros bourrelet périphérique traduit un rapport surface-volume excédentaire et leur fournit une déformabilité optimale(49).

La durée de vie des érythrocytes de circulation est limitée près de 100-120 jours(50).

2 Structure du globule rouge

Le globule rouge, cellule mature de la lignée érythrocytaire, à la forme d'une lentille biconcave. son diamètre est de $8\mu\text{m}$. C'est une cellule anucléée. elle prend une coloration rose vive au MGG, avec en son centre, une zone plus claire.

Le globule rouge est souvent comparé à un "sac" contenant de l'hémoglobine et les molécules énergétiques indispensables à sa survie. Sa structure se décompose schématiquement en trois éléments : la membrane, les enzymes, et l'hémoglobine(51).

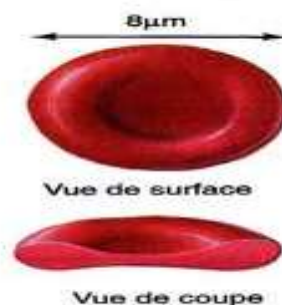


Figure 8 : Structure du globule rouge(51) .

2.1 La membrane

2.1.1 Structure de la membrane érythrocytaire

La membrane d'érythrocyte a été intensivement étudiée, comme système modèle de membrane et pour étudier son rôle dans l'échange et le transport de gaz(51) .

La membrane est composée de 40 % de lipides, de 52 % de protéines et de 8 % de glucides(52).

2.1.1.1 Lipides

Les phospholipides sont les constituants principaux des membranes biologiques, et leur classe principale est les glycerophospholipids.

En 1972, SINGER et NICOLSON ont proposé le modèle de « la mosaïque fluide » pour la structure de membrane, qui suggéré que les membranes soient des structures dynamiques composées des protéines et des phospholipides dans une matrice a double couche phospholipidiques(52).

La membrane érythrocytaire comporte des protéines et des lipides intriqués dans une structure complexe.

Les lipides (65 % de phospholipides, 25 % de cholestérol non estérifié, 10 % de glycolipides) sont répartis en double couche de 40 Å d'épaisseur avec des groupements non polaires hydrophobes se faisant face tandis que les groupements polaires hydrophiles sont rejetés vers l'extérieur.

- Dans cette bicouche phospholipidique baignent de volumineuses molécules protéiques enchâssées plus ou moins profondément dans les deux feuillets lipidiques.

Du côté interne, le réseau protéique constitue le cytosquelette qui confère la forme discocytaire au globule rouge, assure sa grande déformabilité.

Du côté externe, se situent les récepteurs et les motifs antigéniques du globule rouge(51).

2.1.1.2 Protéines

✚ Cytosquelette :

Le cytosquelette est à la base de beaucoup d'aspects de la physiologie de cellules, y compris la mitose, la division de cellules, la commande de volume, la rigidité de cellules, la polarité de cellules et la matrice extracellulaire.

Ces événements effectuent à leur tour le développement et la différenciation du tissu. Le cytosquelette reçoit, intègre et transmet des sélections de signalisation intracellulaires et extracellulaires(54).

Le squelette protéique comporte 3 protéines principales : la spectrine, l'Actine ou protéine 5 et la protéine 4.1.

La spectrine est en réalité formée de deux chaînes polypeptidiques différentes nommées alpha et bêta qui sont polymérisées sous formes de tétramères qui soutiennent la couche phospholipoprotéique membranaire grâce à des liaisons avec les protéines 3 (via l'Ankyrine) et avec les glycophorines (via la protéine 4/1 et l'Actine). Toutes ces protéines peuvent être phosphorylées(55).

✚ Protéines transmembranaire :

Les protéines transmembranaires jouent un rôle essentiel dans les échanges du globule rouge avec le milieu extérieur.

Les plus importantes sont les ATPases Na^+/K^+ dépendantes qui permettent le transport actif des cations Na^+ et K^+ , le ATPases Ca^{++} dépendantes et aussi elles permettent le transport des anions, de l'eau et du glucose. (Figure9)

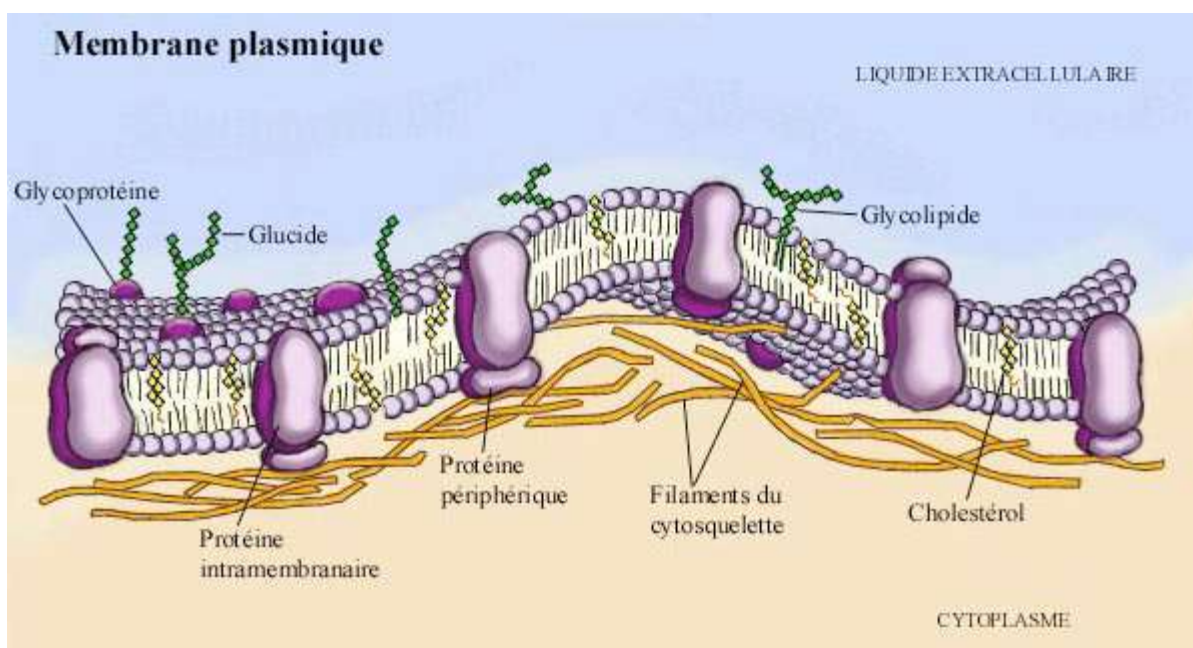


Figure 9: Schéma représentative de la structure de la membrane érythrocytaire(55).

2.1.2 Propriétés de la membrane

2.1.2.1 Asymétrie

Toutes les membranes biologiques sont constituées de deux feuillets dont les compositions lipidiques sont différentes, sauf le cholestérol qui se trouve en quantité équivalente pouvant basculer facilement de l'un à l'autre.

- Le **feuillet interne** est caractérisé par les phosphatidyl-sérine (amphotère) et phosphatidyl-éthanol-amine (charge négative).
- Le **feuillet externe** est caractérisé par la sphingomyéline (charge négative) et la phosphatidyl-choline (charge négative).

L'asymétrie des lipides entraîne ainsi une asymétrie de la charge globale de chaque feuillet. On visualise également une asymétrie des protéines présente dans la double couche phospholipidique; ces protéines participent à caractériser les propriétés de la membrane, que cela soit du côté intracellulaire ou extracellulaire.

La plus grande asymétrie est celle présente au niveau des glucides, en effet tous les motifs glucidiques sont localisés sur le feuillet externe de la membrane plasmique.

« L'arbre glucidique » présent au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique forme ce que l'on appelle le **glycocalix** »(56).

2.1.2.2 Fluidité

La mobilité des lipides est nécessaire pour l'activité cellulaire. Ils peuvent se mouvoir de différentes manières au sein de la membrane : rotation, diffusion latérale et flip flop (passage d'un feuillet à l'autre). Certaines protéines vont être bloquées par des structures intracellulaires ou extracellulaires via des interactions protéines-protéines ou interactions avec le cytosquelette. La fluidité membranaire intervient dans différentes fonctions cellulaires : absorption, sécrétion, protection, adhérence, communication, interaction avec la matrice, etc. La fluidité est influencée par différents facteurs, des facteurs externes comme la température (une augmentation de la température entraîne la fluidification de la membrane) et des facteurs internes :

- La composition en acides-gras : Plus les chaînes carbonées des acides-gras sont courtes et insaturées plus la membrane est fluide.
- La proportion de cholestérol : Le cholestérol renforce la solidité et rigidité membranaire et correspond jusqu'à 50% des lipides totaux de la membrane.
- Le nombre de protéines : Les protéines diminuent la fluidité membranaire(56).

2.1.3 Echanges transmembranaires

Les échanges à travers la membrane sont essentiellement de deux ordres : par diffusion simple, et par un processus actif agissant contre un gradient de concentration.

a) La diffusion simple : intéresse l'eau et les anions inorganiques et semble se faire à travers des pores de la membrane, dont le diamètre serait de l'ordre de 3,5 à 4,5 Å(57).

Le transport passif se à travers des «pores» de la membrane suivant le gradient de concentration des ions(58).

b) Transport actifs: différents types de transporteurs actifs primaires sont décrits dans la membrane du globule rouge. La pompe Na^+/K^+ permet le maintien d'une forte concentration intracellulaire en potassium (environ 140 mM) et d'une faible concentration en sodium (environ 10 mM).

Les échanges des cations se font pour leur plus grande part, par mécanisme actif.

Les concentrations en Na^+ et K^+ intracellulaires sont maintenues par un système complexe de « pompes à sodium- rejetant vers l'extérieur le sodium ayant pénétré passivement dans l'érythrocyte et maintenant le K^+ à l'intérieur de celui-ci.

Ce processus actif demande un apport énergétique fourni essentiellement par l'ATP, il agirait par une modification conformationnelle exposant alternativement des sites d'affinité pour le Na^+ et le K^+ vers les deux faces de la membrane, modification s'accompagnant d'un changement d'affinité des sites, tels que trois Na^+ sont rejetés vers l'extérieur en échange de deux K^+ maintenus dans l'intérieur.

Un second système d'échange constitue le co-transport $\text{Na}^+ \text{K}^+$. Ce système estbidirectionnel et transporte Na^+ et K^+ vers et en dehors de la cellule. Le passage d'un ion à travers la membrane est obligatoirement dépendant de la présence du second ion du même côté de la membrane(59).

2.2 L'hémoglobine

Pendant plus de 100 ans, on a connu l'hémoglobine comme la molécule à gaz c'est la molécule trouvée dans des globules rouges qui est responsable de livrer l'oxygène aux tissus et enlever par la suite le dioxyde de carbone. Elle est présente en grande concentration dans les érythrocytes(60)(61).

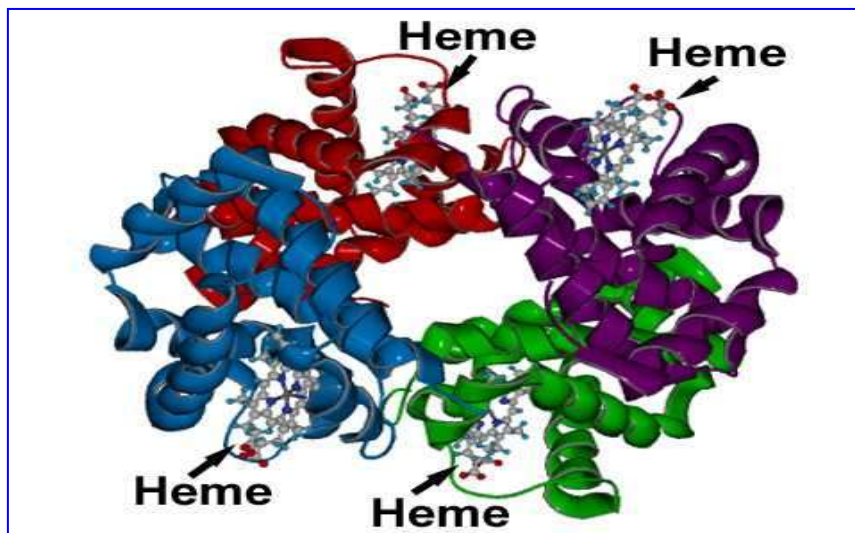


Figure 10 : paires de chaînes polypeptidiques Contenant une porphyrine contenant un atome de Fer (62).

On trouve au cœur de la molécule un cycle hétérogène porphyrinique (noyau tétrapyrrolique), l'hème contient un ion de fer, cet ion est le site de fixation de l'oxygène.

L'ion ferreux établit 5/6 liaisons de coordinence : quatre avec les quatre N de l'hème, une avec le N d'un acide aminé de la chaîne polypeptidique (l'histidine) et dans la forme oxygénée une liaison avec l'dioxygène(O₂).

Étant donné qu'une sous-unité de l'hémoglobine est formée par un hème enfermé dans une protéine globulaire le nom est très logique : « hémoglobine ». Il y a de nombreuses protéines contenant un hème, mais l'hémoglobine en est la plus connue(48).

Le fer peut exister sous 2 formes dans la molécule :

- sous forme ferreuse, ion Fe²⁺ : seule forme active de l'hémoglobine humaine. On parle d'oxyhémoglobine. (interaction réversible avec O₂).
- sous forme ferrique, ion Fe³⁺ : on parle de méthémoglobine.

On peut parler du pouvoir oxyphorique de l'hémoglobine. Ceci correspond à la quantité de dioxygène qu'elle peut fixer. Cette valeur est de 1,34 ml d'O₂/g d'Hb (48).

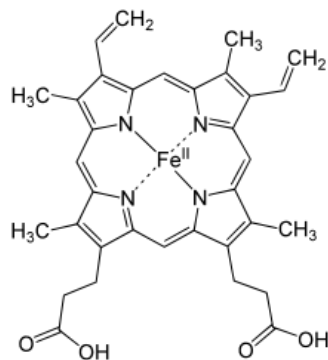


Figure 11: molécule de l'hème(48)

3 Physiologie du globule rouge

3.1 Érythropoïèse

Érythropoïèse (du grec «erythro» qui signifie «rouge» et «poïétique» qui signifie «faire») est le processus qui produit des globules rouges (érythrocytes). Elle est stimulée par une diminution de l'O₂ dans la circulation, ce qui est détecté par les reins, qui vont ensuite sécréter l'hormone érythropoïétine. Cette hormone stimule la prolifération et la différenciation des précurseurs des globules rouges, ce qui active l'érythropoïèse augmentée dans les tissus hématopoïétiques, produisant finalement les cellules du sang(63).

Tableau2 : Valeurs normaux de la ligne érythrocytaire(64).

	Unités	Enfant (3ans)	Homme	Femme
Hématies	Nombre en millions/mm ³	4-5,2	4,5-5,7	4,2-5,2
Hémoglobine	g/dl	12-14	13-17	12-15
Hématocrite	Femtolitre (fl)	74-88	80-100	80-100
VGM	Picogramme (pg)	24-30	27-32	
TCMH	%	28-33	32-35	32-35
Réticulocytes	Nombre/mm ³	20000-80000	20000-80000	20000-80000

3.2 L'homéostasie de globule rouge

L'entretien de l'homéostasie cellulaire de volume est essentiel pour la survie de l'érythrocyte. La perturbation de cette homéostasie, c'est un dispositif de plusieurs anémies hérités, mène aux érythrocytes anormaux.

Les interactions complexes entre les corps dissous, leur charge nette, la conductibilité de la membrane aux anions et aux cations monovalents, la superficie de membrane, et les voies de transport d'ion déterminent le statut d'hydratation d'érythrocyte, y compris le contenu d'ion et la concentration en hémoglobine (65).

Plusieurs voies négocient l'homéostasie de l'eau et de corps dissous en cellules rouges normales, où le volume cellulaire est principalement commandé par l'intermédiaire du règlement du contenu monovalent de cation. La pompe d'ATPase de potassium de sodium (Na^+/K^+ ATPase) maintient le bas sodium intracellulaire, et la composition élevée de potassium érythrocytaire en transportant activement le sodium hors et le potassium dans la cellule. Toute déshydratation intracellulaire, augmente la viscosité et fragilise la cellule(65).

3.3 Paramètres pour étudier un GR

Le taux d'hémoglobine est exprimé en grammes par décilitre (g/dL).

Le taux normal d'hémoglobine dépend de l'âge et, à partir de l'adolescence, du sexe de la personne. Les valeurs normales sont les suivantes :

- Nouveau-né : 17 à 22 g / dL
- Bébé d'une semaine : 15 à 20 g / dL
- Bébé d'un mois : 11 à 15gm/dL
- Enfant : 11 à 13 g / dl
- Adulte homme : 14 à 18 g / dL
- Adulte femme : 12 à 16 g / dl
- Homme d'âge mûr : de 12,4 à 14,9 g / dl
- Femme d'âge mûr : de 11,7 à 13,8 g / dl.

Une des constantes principales du globule rouge est le **VGM** ou volume globulaire moyen. Le **VGM** est actuellement mesuré directement par les appareils automatiques lors d'un hémogramme:

Le **V.G.M** définit la normocytose (**VGM** de 80 à 100 fl), la microcytose (**VGM**< à 80 fl) et la macrocytose (**VGM**> à 100 fl).

• Autres constantes du globule rouge :

La teneur globulaire moyenne en hémoglobine (**TCMH**). C'est une valeur calculée; rapport de l'hémoglobine sur le nombre de globules rouges, la TCMH définit la normochromie (TGMH de 27 à 33 pg/ c) et l'hypochromie (TCMH < à 27 pg/c).

La concentration corpusculaire hémoglobinique moyenne (**CCHM** ou **CCMH**) = 32 à 36 g/dl (= concentration en Hb dans 100 ml de GR)

Hypochromie : < 32 g/dl définit les anémies hypochromes

Normochromie : 32 – 36 g/dl définit les anémies normochromes

• **Réticulocytes = 0.5 – 2% des GR (20 – 80 G/L)** ont une durée de vie de 3j, et contiennent encore quelques organites. Leur détermination va définir les capacités de régénération de la moelle osseuse. Une anémie est régénérative si les réticulocytes sont > 150 G/L (sinon =anémie non régénérative)(65).

4 Fonction

Les érythrocytes transportent le dioxygène (O₂) des poumons à toutes les cellules de l'organisme et une partie du dioxyde de carbone (CO₂) des cellules aux poumons.

Les globules rouges sont responsables des groupes sanguins, car ils en portent les antigènes en surface des cellules(49).

4.1 Métabolisme du globule rouge

✚ Maintenir en activité un système réducteur puissant NADH-NADPH :

En effet ce système est nécessaire pour que l'Hb soit protégé contre l'oxydation de ses constituants (fer et globine). Dans ce système, le NADH est fourni par la voie principale de la glycolyse et le NADPH est fourni exclusivement par la voie accessoire.

✚ Production de l'ATP : celui-ci est nécessaire au bon fonctionnement de la

pompe Na⁺/K⁺ et par conséquent à l'équilibre osmotique du GR (lutte contre l'hyperhydratation). Il est fourni par la glycolyse essentiellement assurée par la voie principale(66).

Chapitre III

L'hémolyse

1 Définition

C'est la destruction prématurée des globules rouges, quand leurs durée de vie est de moins de 100 jours, plutôt que de 120 jours, qui ont un laps de temps normal. Une anémie va apparaître si la moelle ne réussit pas à compenser ; il résulte une libération d'hémoglobine et du contenu intracellulaire dans le plasma(67).

2 Les signes de la sénescence érythrocytaire

2.1 La modification du métabolisme énergétique

Les GR étant dépourvus d'appareil de synthèse, il a été proposé qu'une diminution progressive de l'activité des enzymes érythrocytaires entraîneraient secondairement une diminution de l'ATP et également du 2-3 DPG tout comme celle du NADH et NADPH, d'où la sensibilité accrue des hématies aux agents oxydants altérants la structure et la fonction de la membrane et de l'hémoglobine(50).

2.2 Modification de la membrane et du contenu

Trouble des échanges ioniques (du à la diminution de ATP) : Elle est assurée par l'équilibre du flux ionique (Na et K), lui même contrôlé par la pompe Na+K+ ATP dépendante la modification des flux ioniques, avec augmentation du Ca (et du sodium) et diminution du potassium intracellulaire, induisant une déshydratation et une diminution de la déformabilité (diminution de l'activité des canaux calciques)(68).

2.3 Altération de la membrane

Diminution de la charge négative de la membrane, par perte progressive d'acide sialique sur la partie externe des glycoprotéines membranaires, facilitant la phagocytose par les macrophages(68).

2.4 Catabolisme de l'hémoglobine

L'auto oxydation d'hémoglobine (Hb) est la source principale d'espèce réactive de l'oxygène à l'intérieur des érythrocytes.

Dans des conditions normales, un très peu de l'oxygène attaché au fer de l'hème de Hb dissocie comme anion de super-oxyde partant de l'hème ferrique. Ceci explique pourquoi, dans les personnes normales, 1 2% de Hb sont présents comme MetHb(69).

Le stress oxydant cause des changements sur le globule rouge dont le désordre de cytosquelette et la perte d'asymétrie lipidique.

Ces cellules deviennent plus rigides et subissent, ainsi, la lyse libérant plus facilement l'espèce cytotoxique dans la vascularisation ; dégageant de l'hémoglobine oxydé de GR, L'hème-Fe et le fer(70).

Des modifications oxydantes de GR ont été rapportées dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques telles que l'athérosclérose, la maladie de l'artère coronaire, le syndrome métabolique, et la sclérose en plaques(70).

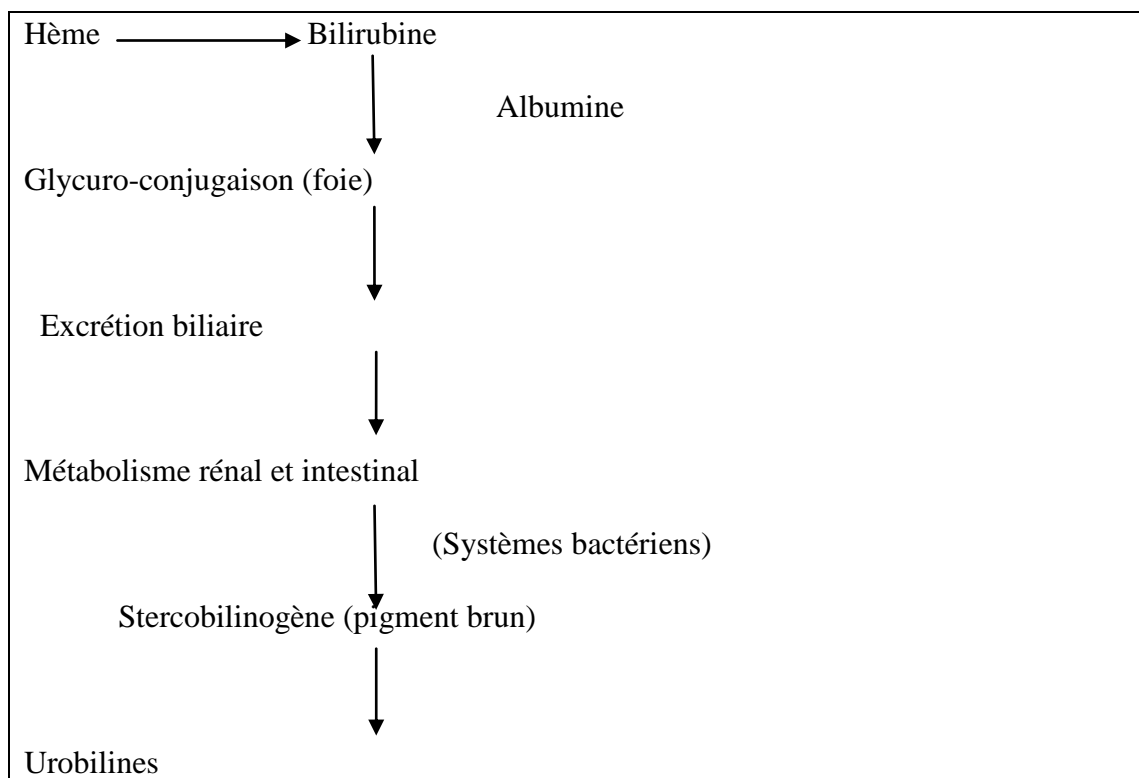


Figure 12 : catabolisme de l'hémoglobine (70).

3 Site d'hémolyse

3.1 L'hémolyse extravasculaire (physiologique)

L'hémolyse extravasculaire, dû à l'ingestion de globule rouge par des cellules du système mononucléaire de phagocyte (par exemple, cellules de Kupffer dans le foie et les macrophages spléniques), est un mécanisme particulièrement important pour dégager tous globule rouge normalement sénescents(71).

3.2 L'hémolyse intra vasculaire (pathologique)

3.2.1 Hémolyse par anomalies de membrane du GR

- ✓ Sphérocytose héréditaire

La sphérocytose héréditaire, caractérisée par la déformation sphérique des globules rouges, est la plus fréquente des anomalies de la membrane érythrocytaire en Europe du nord ; La mutation du gène ANK 1, codant pour l'ankyrine, est la plus fréquente (environ 60 % des cas) et est responsable de formes cliniquement manifestes de SH, de transmission dominante(72).

- ✓ L'elliptocytose héréditaire

Il s'agit d'une affection généralement transmise sur un mode autosomique dominant, caractérisée par la présence de globules rouges elliptiques(72).

- ✓ la poïkilocytose transitoire de la prime enfance

Il s'agit de formes hétérozygotes simples, qui pour des raisons encore mal connues et non prévisibles, associent une anémie hémolytique sévère à une fragmentation(72).

- ✓ La poïkilocytose des états homozygotes

L'homozygotie pour une mutation sur le gène alpha de la spectrine ou celui de la protéine 4.1 a été décrite à maintes reprises. Elle donne lieu à une anémie sévère dès les premiers jours de vie, souvent transfusion dépendante jusqu'à la splénectomie (72).

✓ La stomatocytose héréditaire :

Les stomatocytoses héréditaires sont des maladies de la perméabilité membranaires aux cations Na^+ et K^+ . Elles ont été initialement identifiées par la présence de stomatocytes sur le frottis sanguin. Les stomatocytes sont des globules rouges avec un centre clair, non plus circulaire, mais limité à une barre en forme de bouche. Il existe deux formes de stomatocytoses héréditaires, l'une s'accompagnant d'une hyperhydratation des hématies, tandis que dans l'autre forme les globules rouges sont déshydratés(73).

✓ L'ovalocytose du Sud-Est asiatique

Il s'agit d'un trait asymptotique à l'état hétérozygote, très répandu dans une région s'étendant de la Thaïlande à la Mélanésie. Il se caractérise par la présence de stomato-ovalocytes sur le frottis sans autre anomalie hématologique, avec une perte totale de déformabilité élastique à l'ektacytométrie(74).

3.2.2 Hémolyse par déficit enzymatique

- Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase, ou déficit en G6PD,

C'est le déficit enzymatique le plus répandu dans le monde, se caractérisant par une destruction des globules rouges (hémolyse). La maladie est transmise génétiquement sur le mode récessif, lié au chromosome sexuel X où se situe le gène G6PD produisant l'enzyme.

Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase bloque la première réaction d'oxydation de la voie des pentoses phosphates. Ainsi, la sous-production de NADPH qui en résulte, réduit fortement les capacités cellulaires à lutter contre le stress oxydant

- Déficit en pyruvate kinase :

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 progénituresérythroïdes 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.

- 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 (74).

3.2.3 Hémolyse d'origine iatrogène

Divers médicaments sont responsable d'hémolyse ; nous citons en premier lieux l'Amphotericine B qui a fait l'objet de notre étude notamment pour son effet toxique sur le globule rouge, nous citons également d'autre médicament qui ont un effet hémolytique dont :

- 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...) (75)

4 Diagnostique de l'hémolyse

Lorsqu'il y a hémolyse, on trouve les résultats suivants :

- + taux sérique accru de lactatedéshydrogénase (LDH), enzyme présente en grande quantité dans les globules rouges et qui est libérée lors de leur destruction ;
- + taux réduit d'haptoglobine, protéine qui lie l'hémoglobine relâchée dans le plasma lors de l'hémolyse ;
- + taux de bilirubine indirecte augmenté (surtout lorsque l'hémolyse est grave ou chronique)(75).

Chapitre IV

L'albumine

1 Définition

Egalement appelée sérum albumine, l'albumine sérique est l'un des composants du plasma sanguin. Il s'agit d'une protéine fabriquée par le foie et qui joue un rôle dans le transport des liquides dans les vaisseaux sanguins et leur répartition entre tissus et vaisseaux. Un taux d'albumine sérique trop bas provoque des œdèmes. Un taux trop élevé est signe de déshydratation. Nommé albuminémie, il est établi lors d'une prise de sang. Dans tous les cas, la nutrition joue un rôle primordial dans la production de l'albumine sérique(76).

2 Synthèse de l'albumine

L'albumine est synthétisée par le foie et représente 50% de l'ensemble des protéines plasmatiques. La synthèse de cette protéine est soumise à une régulation très fine par le statut nutritionnel, l'insuline, le cortisol, le glucagon ou les hormones thyroïdiennes. La demi-vie est de deux à trois semaines puis la molécule est catabolisée par le système réticulo-endothélial (76).

L'albumine est synthétisée à raison de 10-15 g/j qui sont déversés presque intégralement dans la circulation et se répartissent entre le plasma et ensuite par diffusion dans les tissus interstitiaux (5% par heure) d'où ils sont résorbés par le système lymphatique (77).

3 Le métabolisme de l'albumine chez un sujet sain

L'albuminémie est en fonction du taux de synthèse et de dégradation de l'albumine, mais aussi de sa distribution entre le milieu intravasculaire et extravasculaire. Chez l'Homme le milieu intravasculaire contient environ 40% de l'albumine totale, et le milieu extravasculaire environ 60%. Le milieu extravasculaire est formé de deux compartiments. Le premier est composé des tissus à capillaires sanguins discontinus: fenestrés (villosités de l'intestin grêle, glomérules rénaux, glandes endocrines) ou sinusoides (foie, rate, os). Il a le temps de distribution de l'albumine le plus rapide. Le deuxième compartiment est composé des tissus à capillaires continus (muscles lisses et squelettiques, peau). La distribution de l'albumine y est plus longue(77).

4 La dégradation de l'albumine

Sa dégradation est importante, notamment par rapport aux autres protéines plasmatiques. Elle représente par exemple chez l'Homme 4% du taux total en albumine par jour. Elle est cependant compensée par sa haute concentration plasmatique. Le catabolisme de l'albumine a lieu dans la plupart des organes. Il est montré que 40 à 60% de la dégradation était d'origine musculaire et dermatologique, moins de 15% était d'origine hépatique, environ 10% était d'origine rénale, et que 10% était d'origine intestinale(78)

5 Structure

La protéine, qui est chargée négativement avec un poids moléculaire de 69 kDa, Est composée d'une chaîne d'acides amines organisée en plusieurs hélices alpha. Le centre de la molécule est composée de radicaux hydrophobes alors que les extrémités contiennent éléments hydrophiles, sites de liaison pour de nombreux ligands(79).

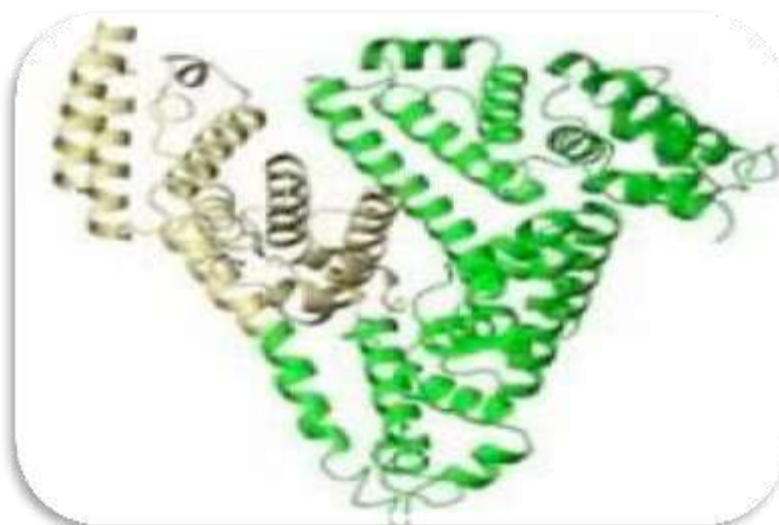


Figure 13: Représentations tridimensionnelle de l'albumine.

Un Tiers de l'albumine totale se situe dans le secteur intra vasculaire et deux tiers en extravasculaire (principalement au contact de la peau)(79).

6 Fonctions

Les principales fonctions de l'albumine intra vasculaire sont le maintien de la pression oncotique, la liaison a d'autres molécules (ions, protéines et bilirubine) pour leur transport ou leur dégradation ainsi qu'une action anti oxydante, un retentissement sur l'équilibre acide base et une action protectrice sur le complexe fonctionnel de la membrane capillaire (association fonctionnel du glycocalyx et de l'endothélium capillaire)(80).

Comme pour toutes les autres protéines plasmatiques avec un poids moléculaire élevé, le passage vers le secteur extravasculaire est faible.

Sa forte concentration plasmatique joue un rôle prépondérant dans l'établissement et le maintien de la pression oncotique du plasma. Elle participe ainsi a la régulation de la volémie.

En effet, les échanges transcapillaires sont régis par la loi de Starling et font intervenir les pressions hydrostatiques et colloïdo-osmotique plasmatiques ;l'albumine assure 70 a 80% de la valeur de cette dernière(80).

Tableau 3 : les différentes fonctions de l'albumine(80).

Fonction de l'albumine		
Vasculaire	Transport	Métabolique
<ul style="list-style-type: none"> - Pression oncotique. - Intégrité vasculaire 	<ul style="list-style-type: none"> -Hormones(stéroïde, thyroxine) - Acides gras - Bilirubine - Acides biliaires. - Métaux (Zinc, Ca, Mg). - Médicament (diazépam). 	<ul style="list-style-type: none"> -Equilibre acido-basique - Antioxydant. - Anti-inflammatoire.

7 Hypoalbuminémie

L'hypoalbuminémie se définit par un taux inférieur à 35 g/L. Le retentissement clinique devient important pour des taux inférieurs à 20g/L(81).

Elle se rencontre dans trois situations:

- Défaut de synthèse en cas de dysfonction hépatique,
- Un excès de dégradation en cas d'hypercatabolisme comme dans le sepsis
- Excès de pertes en cas d'ascite par exemple. Lorsque le complexe fonctionnel endothélial Vasculaire est intact, l'hypoalbuminémie entraîne une baisse de la pression oncotique.

Ceci a pour conséquences la formation d'œdèmes par une fuite capillaire et peut altérer la Perfusion tissulaire (81).

8 Administration exogène d'albumine

L'administration d'albumine exogène est extrêmement codifiée. Les indications actuelles d'administration d'albumine exogène au bloc opératoire sont encadrées par la conférence de consensus de 1995. Son administration est recommandée dans des situations très particulières

- Chirurgie hépatique
- Compensation d'une ponction d'ascite importante
- Réanimation des grands brûlés(82).

8.1 Aspect

Les solutions d'albumine sont limpides, de couleur jaune pâle à vert clair (11).

8.2 Précautions particulières de Conservation

- A conserver à une température ne dépassant pas 25°C.
- Ne pas congeler.
- Après ouverture, l'Albumine humaine doit être utilisée immédiatement.
- Conserver dans l'emballage extérieur d'origine, à l'abri de la lumière(11).

8.3 Pharmacocinétique

8.3.1 Biodisponibilité

L'albumine est immédiatement et complètement disponible après son administration par voie intraveineuse: l'augmentation de la masse sanguine est immédiate et dure de 6 à 8 heures(11).

8.3.2 Distribution

L'albumine se distribue dans 2 compartiments: - plasmatique = 40 à 45%, - extravasculaire = 55 à 60% (11).

8.3.3 Métabolisme

Il y a métabolisation de 4% du pool échangeable par jour (11).

8.3.4 Élimination

L'élimination est essentiellement intracellulaire par action des protéases lysosomiales(11).

8.3.5 Pharmacologie

- **L'albumine à 4%:** est une solution isotonique de pouvoir oncotique proche de celui d'un même volume de plasma.

- **L'albumine à 20%:** est une solution hypertonique de pouvoir oncotique 4 fois supérieur à celui d'un même volume de plasma.

L'albumine permet une restauration rapide et facile de la masse plasmatique: 1g d'albumine accroît le volume circulatoire de 15 à 20 ml. L'expansion plasmatique due à un appel d'eau du secteur interstitiel vers le compartiment vasculaire entraîne, avec l'hémodilution, une diminution de la viscosité sanguine et contribue indirectement à favoriser la diurèse et à drainer les épanchements et les œdèmes.

L'albumine exerce un pouvoir de captation et de transport vis-à-vis d'un grand nombre de substances exogènes et endogènes(11).

8.4 Indication et usage clinique

En raison de ses propriétés oncotiques et colloïdales, la solution d'albumine humaine à 25%(ou 20%), est utilisée pour rétablir ou maintenir le volume du sang circulant(11).

8.4.1 Traitement d'urgence du choc hypovolémique

La solution d'albumine humaine à 25%(ou 20%), est un agent hyper-oncotique qui est administré par voie intraveineuse, produit une augmentation supplémentaire du volume plasmatique équivalant à environ trois ou quatre fois le volume administré(83).

8.4.2 Traitement des brûlures

En présence de brûlures étendues, le régime thérapeutique optimal par les colloïdes, les cristalloïdes et l'eau n'est pas déterminé. De grandes quantités de cristalloïdes sont perfusées pour rétablir le volume du liquide extracellulaire au cours des 24 heures après que le patient ait subi des brûlures. Après 24 heures, la solution d'albumine humaine à 25%(ou 20%), peut être administrée pour assurer le maintien de la pression osmotique colloïdale du plasma(83).

8.4.3 Hypo protéinémie avec ou sans œdème

Une chirurgie lourde peut entraîner la perte de plus de la moitié de l'albumine circulante, ce qui donne lieu aux complications associées à l'insuffisance de la pression oncotique(84).

Il est de même chez les patients présentant une septicémie ou en unité de soins intensifs. L'administration de la solution d'albumine humaine à 25%(ou 20%), peut être utile dans ces situations(83).

8.4.4 Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte

Le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte résulte d'une oxygénation insuffisante causée par l'œdème interstitiel pulmonaire qui complique les états de choc ou les troubles faisant suite à une chirurgie. Quand les signes cliniques évoquent une hypoprotéinémie accompagnée d'une surcharge liquidienne, il peut être utile d'administrer la solution d'albumine humaine à 25%(ou 20%), en association à un diurétique(83).

8.4.5 Maladie hémolytique du nouveau-né

L'administration de la solution d'albumine humaine à 25% (ou 20%), peut être indiquée avant la transfusion d'échange pour lier la bilirubine libre et, ainsi, réduire le risque d'ictère nucléaire. Une dose de 1 g/kg de poids corporel est administrée environ une heure avant la transfusion d'échange. La prudence s'impose chez les nourrissons présentant une hyper volémie(85).

8.5 Les effets indésirables

Les effets indésirables suivants ont été rapportés dans le cadre de la surveillance post commercialisation :

- Affections du système immunitaire: réactions anaphylactiques, hypersensibilité/réactions allergiques.
- Affections du système nerveux: céphalées.
- Affections cardiaques: tachycardie.
- Affections vasculaires: hypotension.
- Affections respiratoires, thoraciques: dyspnée.
- Affections gastro-intestinales: vomissement.
- Affections de la peau et du tissu sous-cutané: urticaire, prurit.
- Troubles généraux: frissons, et anomalies au site d'administration.

Aucune donnée n'est disponible concernant des effets indésirables provenant d'essais cliniques contrôlés menés avec l'albumine humaine (11).

8.6 Contre-indications

- Une allergie à l'albumine ou à n'importe lequel des ingrédients du médicament.
- Une anémie grave (faible décompte cellulaire dans le sang, amenant une réduction de l'acheminement d'oxygène aux tissus du corps).
- Une insuffisance cardiaque par laquelle le coeur ne peut acheminer suffisamment de sang vers les autres organes du corps.
- Un oedème pulmonaire.
- Une réduction de la fonction rénale (11).

8.7 Surdosage

Une hyper volémie peut se produire lorsque la posologie et le débit de perfusion sont trop élevés. Il faut interrompre immédiatement la perfusion dès l'apparition des premiers signes cliniques de surcharge cardiovasculaire (céphalées, dyspnée, turgescence des veines jugulaires) ou d'une augmentation de la pression artérielle, de la pression veineuse centrale ou d'un œdème pulmonaire, et contrôler soigneusement les paramètres hémodynamiques du patient (11).

Deuxième partie

Etude expérimentale

I. Introduction

L'amphotéricine B est un antibiotique appartenant à la famille des macrolides, encore utilisé dans les infections fongiques ou parasitaires notamment les leishmanioses du fait de son efficacité, mais sa plus large utilisation est limitée à cause de sa hautetoxicité surtout la néphrotoxicité par sa grande affinité aux stérols des membranes cellulaires et donc exerce un effet oxydant vis-à-vis ces stérols et dans le cadre de développement de stratégie visant à augmenter l'index thérapeutique de cette molécule, l'étude de l'effet anti oxydant de l'albumine sur l'amphotéricine B a été l'objectif de plusieurs études vu son intérêt.

II. L'objectif du travail

D'abord, on commence par l'étude du mécanisme de toxicité de cette molécule (fungizone®) sur le globule rouge.

Ensuite on va étudier et évaluer in vitro, l'effet du sérum albumine humaine (HSA) sur la toxicité de l'amphotéricine B sur un modèle universel de cellule animal qui est le globule rouge humain d'un donneur sain unique.

III. Matériel et Méthodes

1.1 Matériels

1.1.1 Appareils

Spectrophotomètre

Appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution en fonction de la longueur d'onde à fin de déterminer sa concentration selon la loi de Beer Lambert, l'absorbance est proportionnelle à la concentration des solutions diluées.



Figure 14 : Spectrophotomètre

Agitateur magnétique

L'agitateur magnétique permet l'homogénéisation de la solution de travail.



Figure 15 : Agitateur magnétique

Ionomètre

Pour le dosage des ions (Na^+ , K^+ , Cl^-)

Centrifugeuse

✚ Vortex



Figure 16 : Vortex

✚ Chronomètre

1.1.2 Réactifs

✚ **L'albumine** : commercialisée sous forme de solution à 20%

✚ **Fungizone**

✚ **Solution de lavage glacée** : Elle doit être conservée au frigo à 2-5°C.

✚ **Solution tampon (TPBS)**: souvent abrégé PBS, de l'anglais phosphate buffered saline, son pH est de 7,4.

✚ **Folin(1N)**

✚ **Biuret**

1.1.3 Autre matériels

Tubes EDTA et des tubes héparinés.

Seringues.

Garrot.

Cuves.

Béchers.

Fiole 200ml.

Micropipette 1ml, 200µl.

Pots stériles.

Tubes à essais.

1.2 Méthodes

1.2.1 Protocole d'étude

1.2.1.1 Type d'étude

Il s'agit d'une étude expérimentale prospective faite sur le globule rouge au sein de laboratoire central service Biochimie CHU Tlemcen durant une période de cinq mois.

1.2.1.2 Population

Un donneur unique sain n'ayant pris aucun traitement.

1.2.1.3 Paramètres étudiés

- Dosage de la concentration du potassium par l'ionomètre.
- Dosage de l'hémoglobine.
- Dosage des protéines membranaires.
- Rapport $[k^+]$ / [protéines].

1.2.1.4 Mode opératoire

a) Préparation des solutions de travail

- ✓ **Fungizone®** à partir de la molécule de la Fungizone® qui est composé de :
 - 50mg d'Amphotericine B;
 - 41mg de Dioxyde de Sodium;
 - 20.2 mg de Tampon phosphate;

On a préparé une solution diluée au à partir d'une solution mère de Fungizone® à 10^{-2} M solubilisée dans le DMSO à la concentration de 10^{-2} M (c'est la solution mère), à partir de cette concentration nous avons préparé des solutions de Fungizone® à une concentration de 10^{-3} M (200µl de Fungizone® 10^{-2} M + 1,8 ml de DMSO) et de 10^{-4} M (200µl de Fungizone® 10^{-3} M + 1,8 ml de DMSO).

- ✓ **Solution de lavage glacée:** composé de NaCl, MgCl₂ et l'eau distillée.
- ✓ **Solution tampon PBS :** à pH = 7,4 ; est composée de Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ et le NaCl.

b) Préparation de l'échantillon (sang modifié)

✓ Prélèvement :

On réalise 430 points testes sur une série de 32 prélèvements du sang veineux d'un sujet sain à jeun à l'aide d'une seringue de 10 ml sur une période de 5 mois.

On évite l'agitation excessive de l'échantillon, l'aspiration trop rapide du sang au cours du prélèvement et la pose prolongée d'un garrot pour ne pas provoquer l'hémolyse mécanique.

On partage ce volume dans 2 tubes:

- 1 tube EDTA pour faire une FNS : pour s'assurer qu'il n'y a pas d'anémie.
- 1 tube héparine pour les tests.
- Centrifugation 5 min à 4000 tr /min ;
- Tracer le niveau du sérum;
- Eliminer le sérum et le remplacer par la solution de lavage glacée ;
- Mélanger doucement pour éviter l'hémolyse mécanique ;
- Un 2^{ème} lavage est nécessaire, centrifuger et éliminer le surnageant ; et on met la TPBS
- Mélanger légèrement ; c'est l'échantillon à étudier ;
- Faire une 2^{ème} FNS pour s'assurer qu'il n'y a pas une hémolyse mécanique.

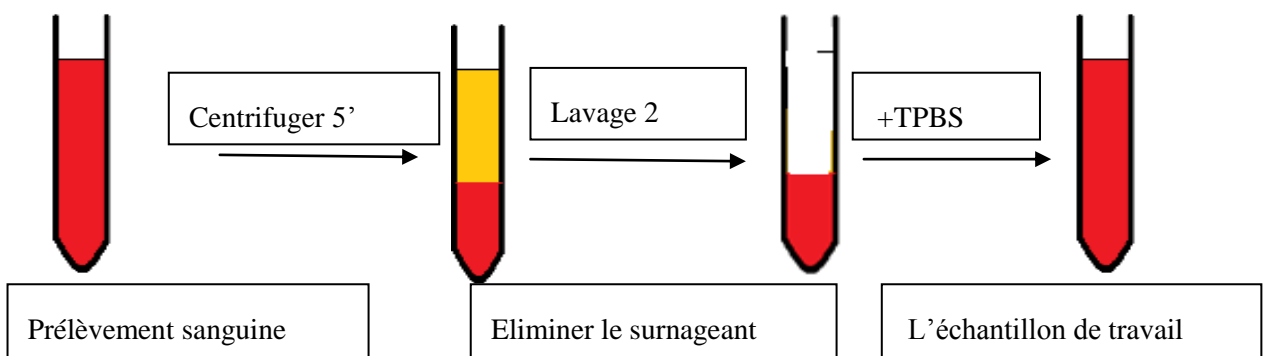


Figure 17 : Préparation de l'échantillon de travaille

- ❖ **La première partie :** Pour tester à quelle dose la Fungizone® a un effet toxique visible sur le globule rouge.
 - **Préparation de la suspension cellulaire mère :** pour un volume de 30 ml on met dans un bécher ; 29,7ml TPBS +300µl à partir de tube de l'échantillon déjà préparé.
 - **Préparation des suspensions cellulaires filles :** on partage les 30 ml dans deux pots stériles (A et B) à raison de 15 ml.

Pour Les 1^{ers} tests, on a commencé par la dose de 150 µl de Fungizone® :

■ D'abord à la concentration de 10^{-3} M comme suit :

- A: Suspension cellulaire fille sans Fungizone.
- B: Suspension cellulaire fille avec 150µl de la Fungizone à 10^{-3} M.

■ Ensuite, en raison des résultats obtenus on est passé à la concentration de 10^{-4} M :

- A: Suspension cellulaire fille sans Fungizone®.
- B: Suspension cellulaire fille avec 150µl de la Fungizone® à 10^{-4} M.

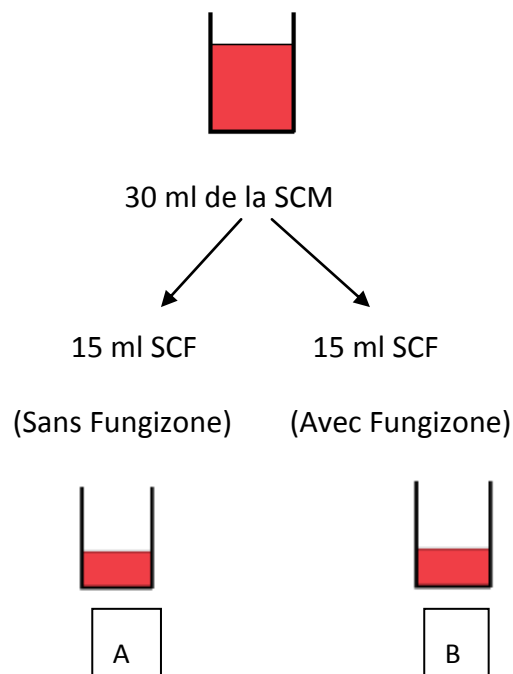


Figure 18 : Préparation des SCF de la première partie.

➤ **Les tubes à tester :**

- On prépare 10 tubes (points tests), 2 tubes pour chaque instant **T** (T0, T15, T30, T45 et T90).
- Dans chaque tube on met 3ml de solution de lavage glacée et 1 ml de la SCF;
- Centrifugation (4000 tr/min pendant 5 min) pour chaque tube préparé ;
- On sépare le surnageant du culot ;
 - ✓ **Le surnageant** pour le dosage de l'hémoglobine (lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm).
 - ✓ **le culot** : on met 1 ml d'eau distillée puis on le met sur le vortex afin de provoquer la lyse des cellules.

Pour chaque point test on fait le dosage des concentrations (K^+) par l'ionomètre et dosage des protéines par la méthode de **Lowry** :

200 μ l de l'échantillon + 1ml de Biuret \Longrightarrow incubation 10 min \Longrightarrow +200 μ l de folin \Longrightarrow 30min à l'abri de la lumière \Longrightarrow on obtient une complexe bleu violet \Longrightarrow lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 650 nm.

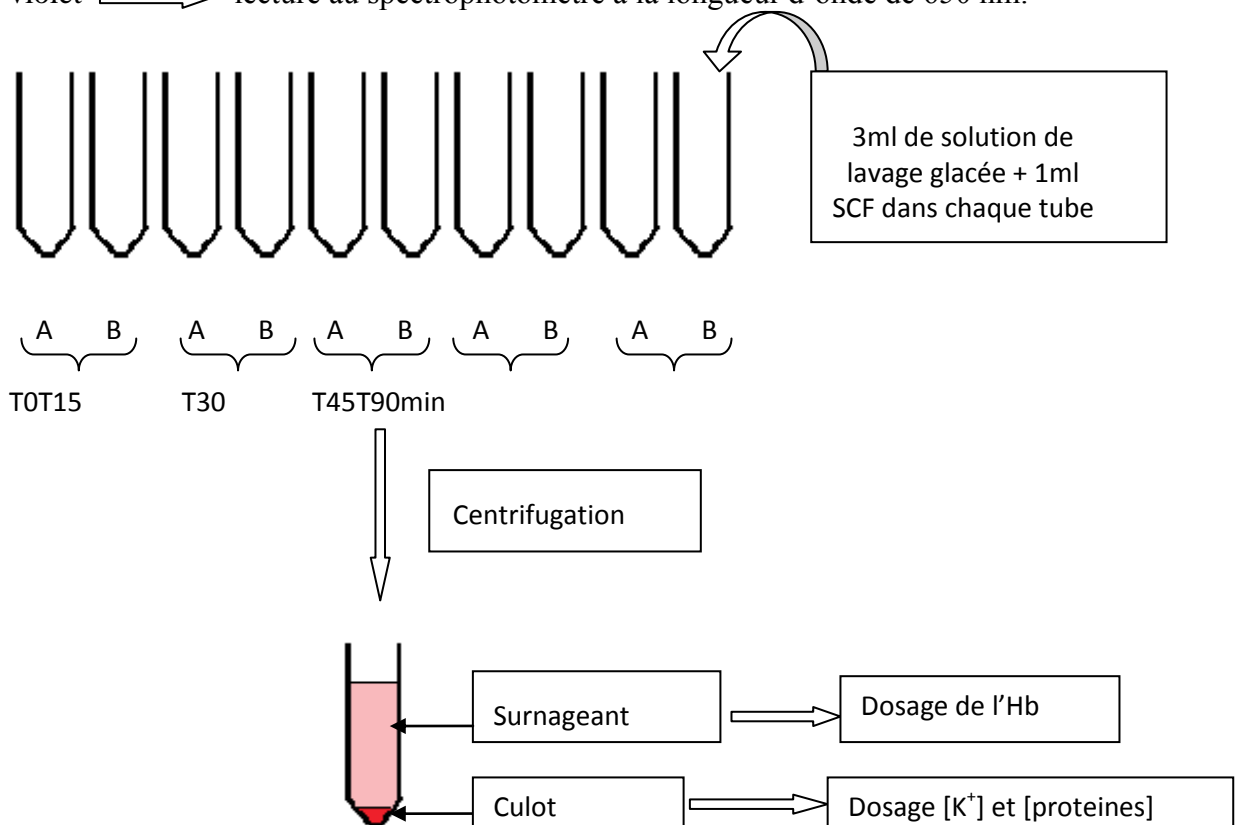


Figure 19: Préparation des points test de la première partie.

- ❖ **La deuxième partie : l'évaluation de l'effet de la sérum albumine humaine sur la toxicité de Fungizone® sur les globules rouge.**

- **Préparation de la suspensions cellulaire mère**

On prépare un volume de 66 ml de la suspension cellulaire mère : 63 ml de TPBS+ 3 ml de l'échantillon de travail qu'on met dans un bécher sur un agitateur magnétique afin d'homogénéiser la solution.

- **Préparation des suspensions cellulaires filles**

On partage le volume de 66 ml dans trois pots stériles (A, B et C) comme suit:

Les testes suivants on à utilisé la concentration de Fungizone® à 10^{-4} .

Pour chaque test on a 3 pots stériles qu'on partage dans 15 tubes à étudier donc au total on a 360 points tests.

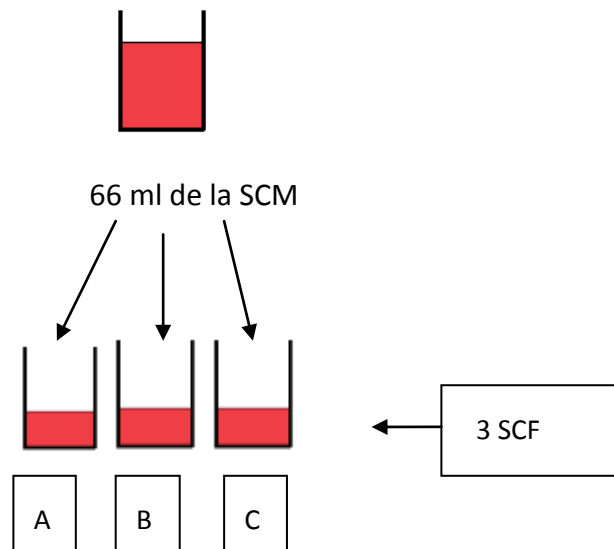


Figure 20:Préparation des SCF de la deuxième partie.

Le protocole est le suivant :

a Préincubation de la sérum albumine humaine avec la Fungizone® $10^{-4}M$

■ Le 1^{er} test on a utilisé la dose de 200 μ l:

- A : 16,8ml de la suspension cellulaire mère+3ml de sérum albumine humaine+200 μ l TPBS.
- B: 16,8mlde la suspension cellulaire mère+3ml TPBS+200 μ l de Fungizone®.
- C : (3 ml de la sérum albumine humaine + 200 μ l de la Fungizone®) après préincubation de 7 min + 16,8 ml de la suspension cellulaire mère.

■ Le 2^{ème} test on a utilisé la dose de 250 μ l:

- A : 16,8ml de la suspension cellulaire mère +3ml de sérum albumine humain+250 μ l TPBS
- B : 16,8ml de la suspension cellulaire mère+3ml TPBS+250 μ l de Fungizone®.
- C :(3 ml de la sérum albumine humaine + 250 μ l de la Fungizone®) après préincubation de 7 min + 16,8 ml de la suspension cellulaire mère.

■ Les 6tests suivant on a utilisé la dose de 500 μ l:

- A : 16,8ml de la suspension cellulaire mère+3ml de sérum albumine humain +500 μ l TPBS.
- B : 16,8ml de la suspension cellulaire mère+3ml TPBS+500 μ l Am B.
- C : (3 ml de la sérum albumine humaine + 500 μ l de la Fungizone®) après préincubation de 7 min + 16,8 ml de la suspension cellulaire mère.

■ Enfin 6 autres tests avec la dose de 1000 μ l:

- A : 16,8ml de la suspension cellulaire mère +3ml de sérum albumine humain +1000 μ l TPBS.
- B: 16,8ml de la suspension cellulaire mère+3ml TPBS+1000 μ l de Fungizone®.
- C : (3 ml de la sérum albumine humaine +1000 μ l de la Fungizone®) après préincubation de 7 min + 16,8 ml de la suspension cellulaire mère.

b En cas de la préincubation de la sérum albumine humaine avec la suspension cellulaire fille

■ 5 tests à partir de la dose de 500µl de la Fungizone®

A : 16,8ml de la suspension cellulaire mère+3ml de sérum albumine humain +500µl TPBS.

B : 16,8ml de la suspension cellulaire mère +3ml TPBS + 500 µl Am B.

C : (3 ml de la sérum albumine humaine + 16,8 ml de la suspension cellulaire mère) après préincubation de 7 min + 500µl de la Fungizone®.

■ 5 tests à partir de la dose de 1000µl de la Fungizone®

A : 16,8ml de la suspension cellulaire mère+3ml de sérum albumine humain +1000µl TPBS.

B : 16,8ml de la suspension cellulaire mère +3ml TPBS + 1000 µl Am B.

C : (3 ml de la sérum albumine humaine + 16,8 ml de la suspension cellulaire mère) après préincubation de 7 min + 1000µl de la Fungizone®.

➤ **Les tubes à tester**

- On prépare à chaque instant T (T_0 T_{15} T_{45} T_{90} T_{120}) 3 tubes : A, B et C (points test).
- On met dans chaque tube 3ml de la solution de lavage glacée;
- On met dans chaque point test, 2 ml de suspension cellulaire fille, on aura donc 15 tubes à tester (15 points tests) en respectant le temps.
- On centrifuge chaque tube au temps précis (4000 tr/min pendant 5 min) pour chaque tube préparé ;

- On sépare le surnageant du culot ;
 - ✚ **Le surnageant** pour le dosage de l'Hb ;
 - ✚ **le culot** : On met 1 ml d'eau distillée puis on le met sur le vortex afin de lyser les cellules pour le dosage des concentrations des ions K^+ à l'aide d'un ionomètre et des protéines par méthode de **Lowry**.

N.B : on met les 3 pots sur un agitateur magnétique tout au long de la manipulation pour homogénéiser les solutions.

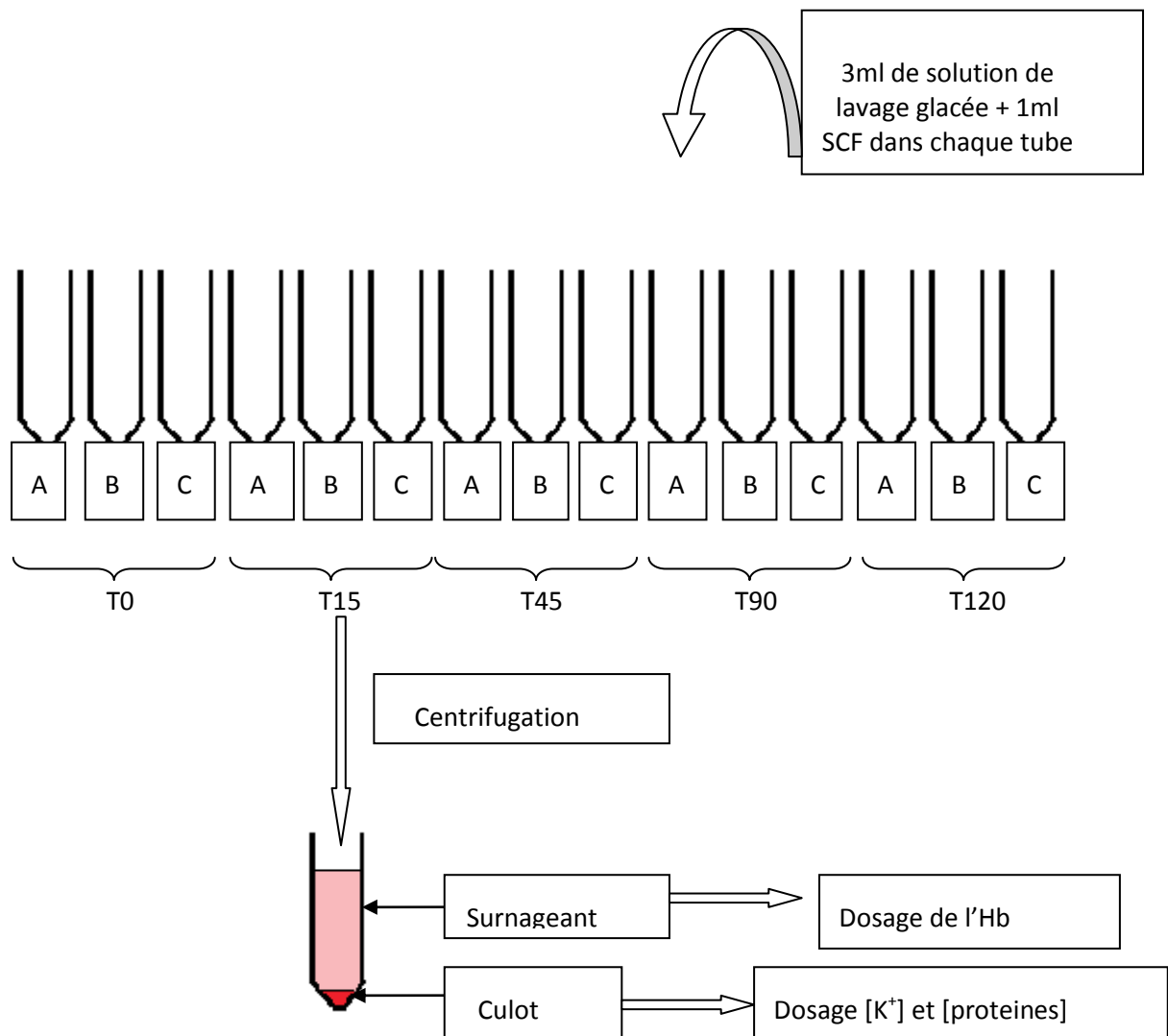


Figure 21: Préparation des points test de la deuxième partie.

IV. Résultats et interprétations

IV.1 Résultats

Toutes les expériences ont été menées dans les mêmes conditions de travail ; à T° ambiante et à pH 7,4.

L'effet du sérum albumine sur la toxicité de la Fungizone® vis-à-vis les globules rouges a été suivi d'une part par la perturbation de la perméabilité membranaire aux ions K^+ (ion intracellulaire par excellence) d'autre part par la libération de l'hémoglobine secondaire à l'hémolyse.

IV.1.1 Evaluation de la toxicité de Fungizone®

Test n°1

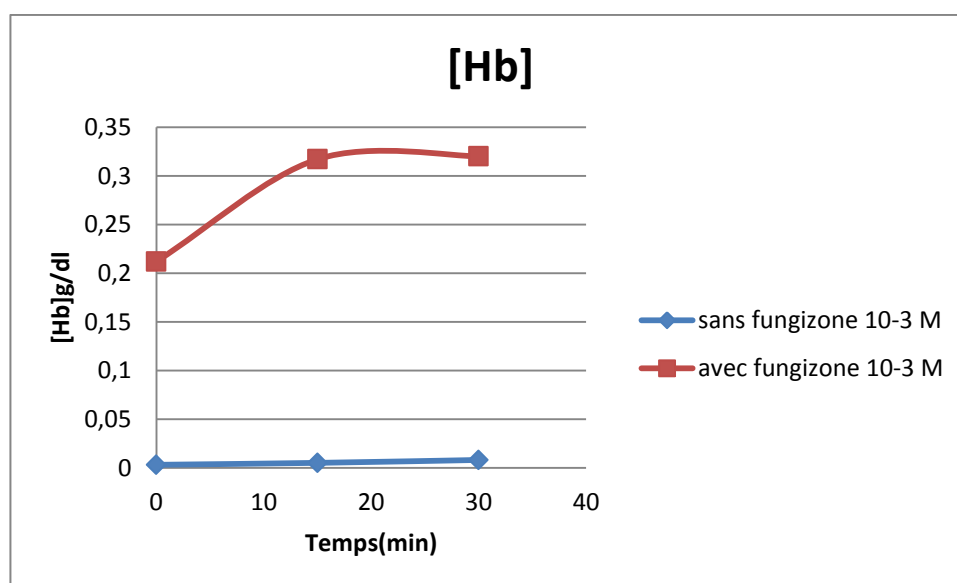


Figure 22 : Effet de la fungizone sur la [Hb] (test 01).

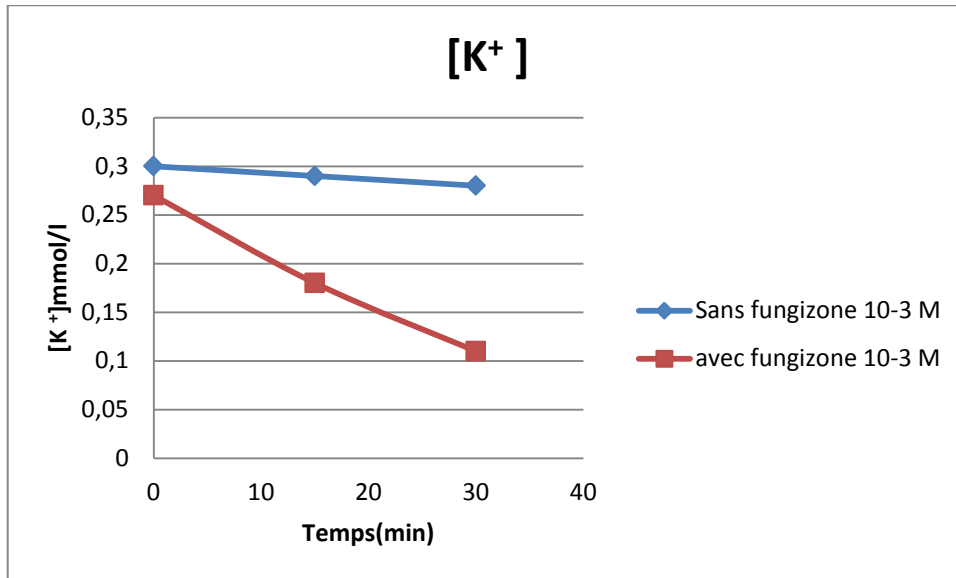


Figure 23 : Effet de la fungizone sur la [k⁺] (test 01).

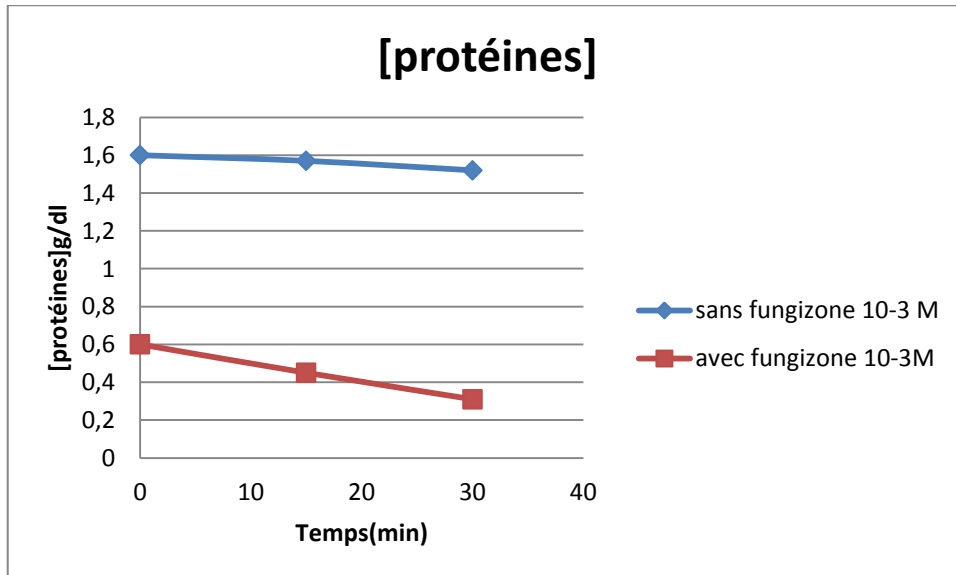


Figure 24: Effet de la fungizone sur [protéines] (test 01)

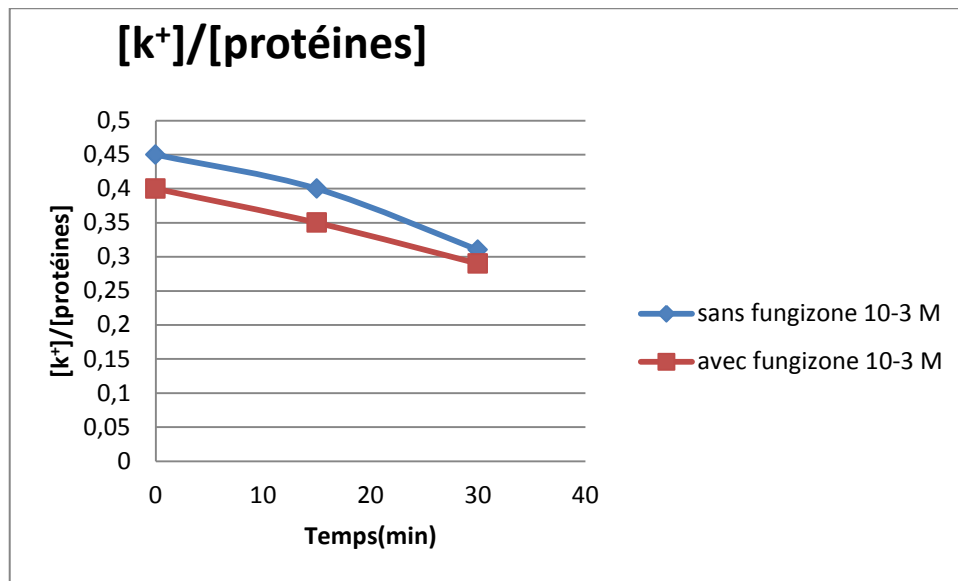


Figure 25: Rapport [k⁺]/ [protéines] (test 01)

Test n°2

On a remarqué durant la manipulation qu'il y a une hémolyse totale provoquée par fungizone à partir de T₃₀, donc on va diminuer la concentration de la fungizone (Am B) à 10⁻⁴ M dans les mêmes conditions.

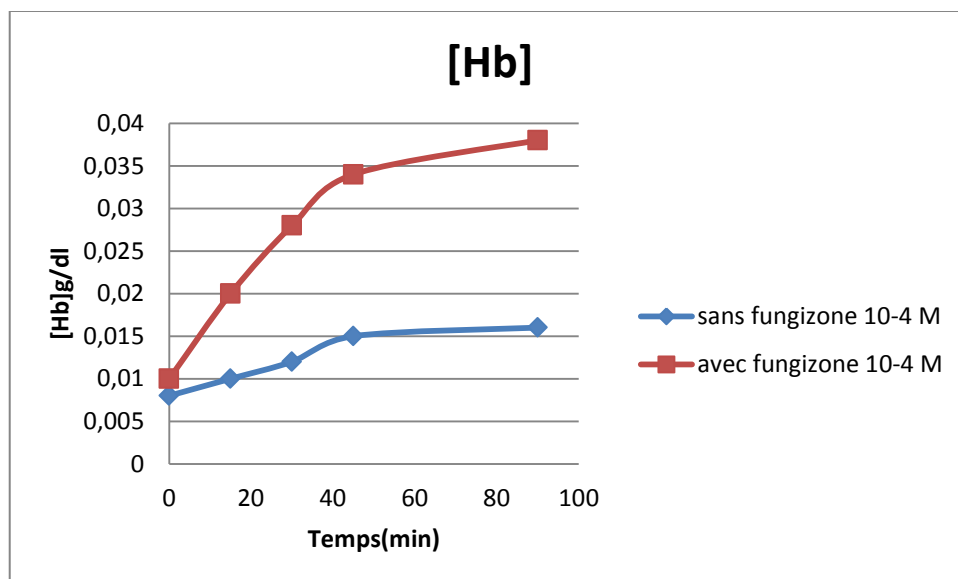


Figure 26 : Effet de la fungizone sur [Hb] (test 02)

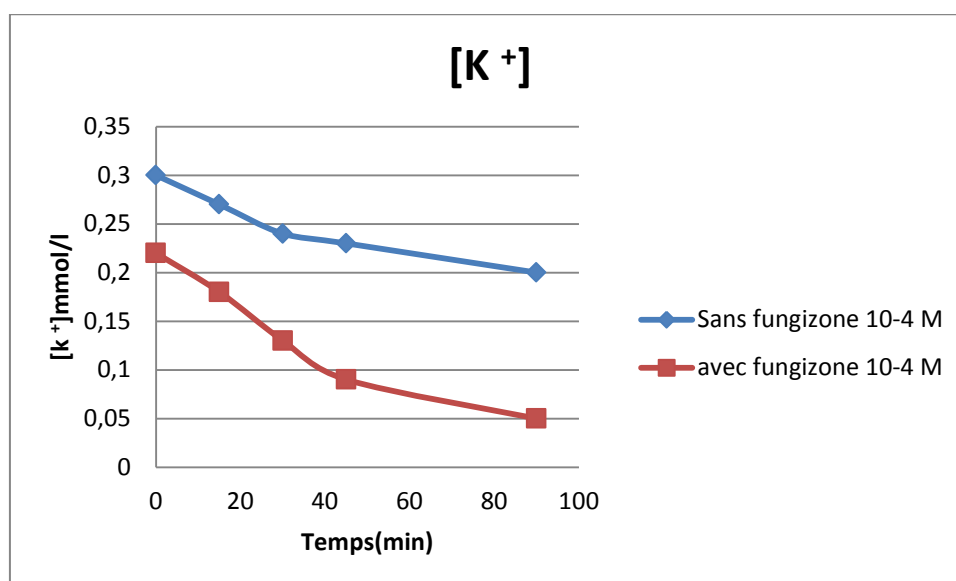


Figure 27: Effet de la fungizone sur la $[K^+]$ (test 02).

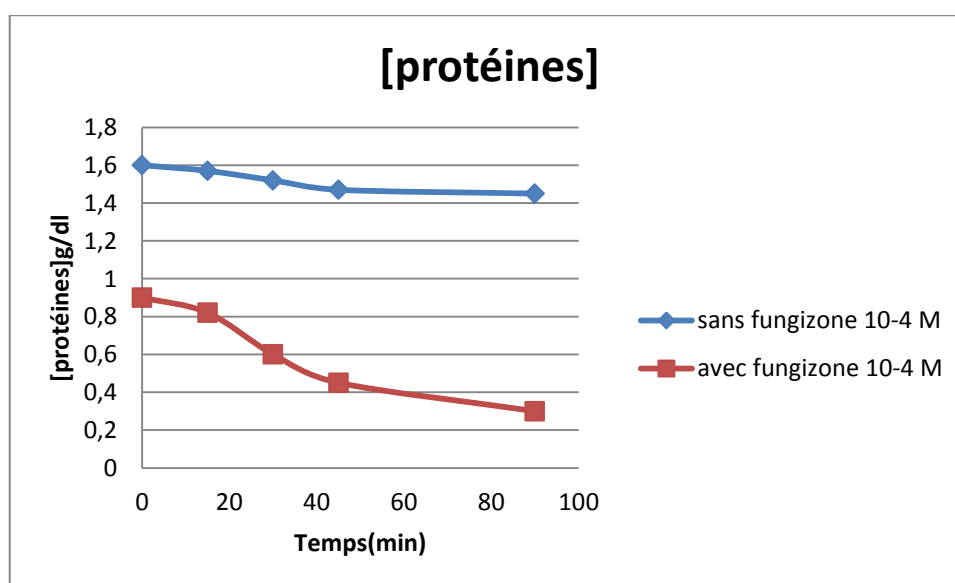


Figure 28 : Effet de la fungizone sur [protéines] (test 02).

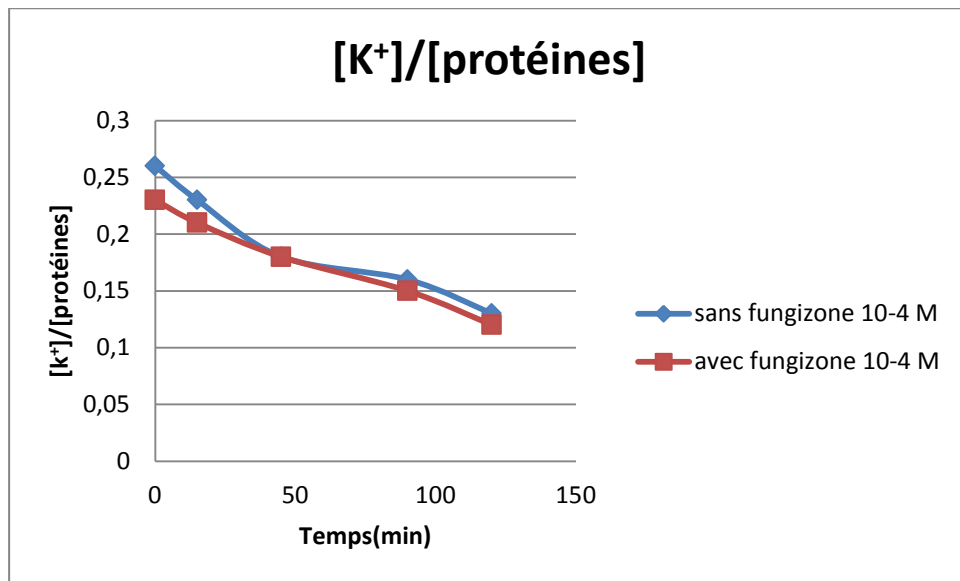


Figure 29: Rapport $[K^+]/[protéines]$ (test 02).

Test n°3

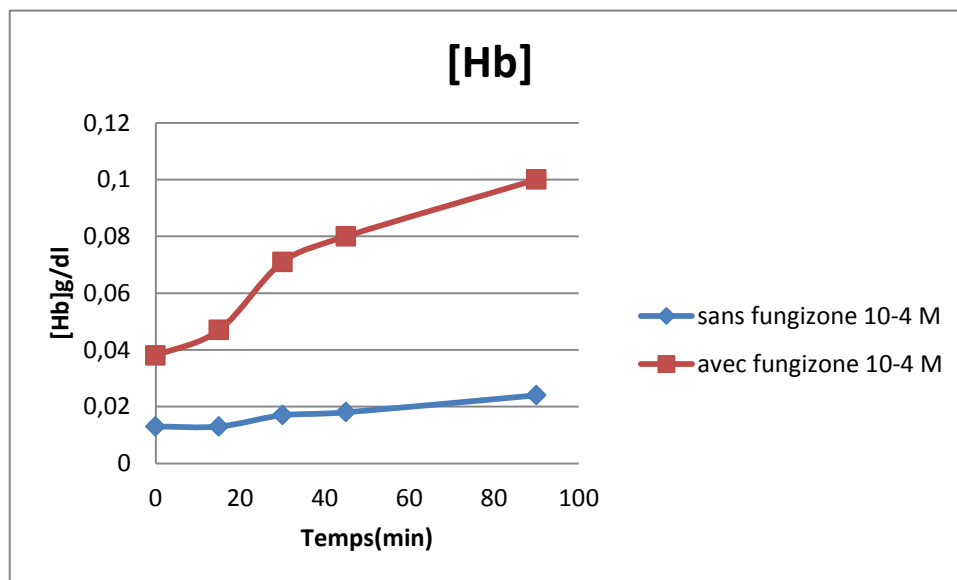


Figure 30 : Effet de la fungizone sur la $[Hb]$ (test 03).

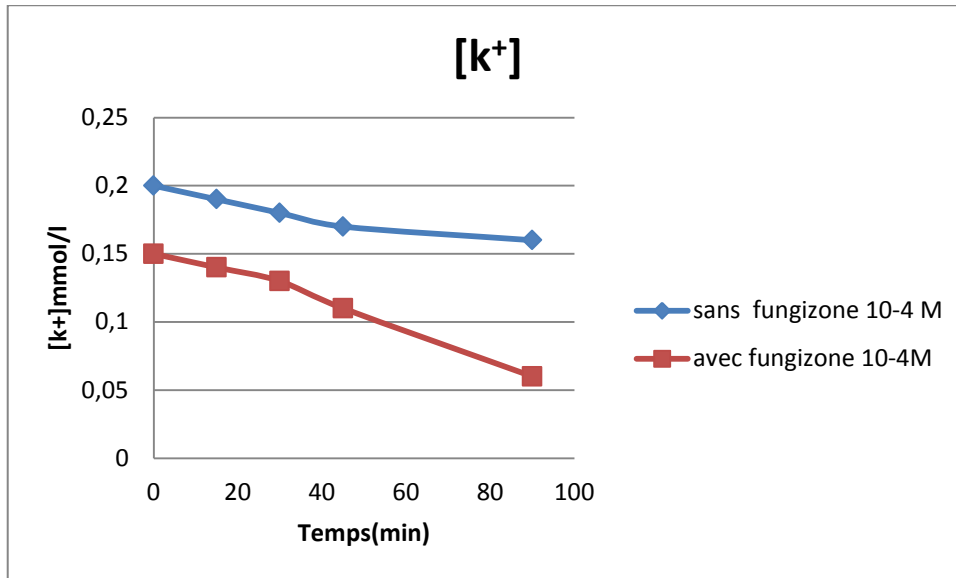


Figure 31 : Effet de la fungizone sur la [K⁺] (test 03).

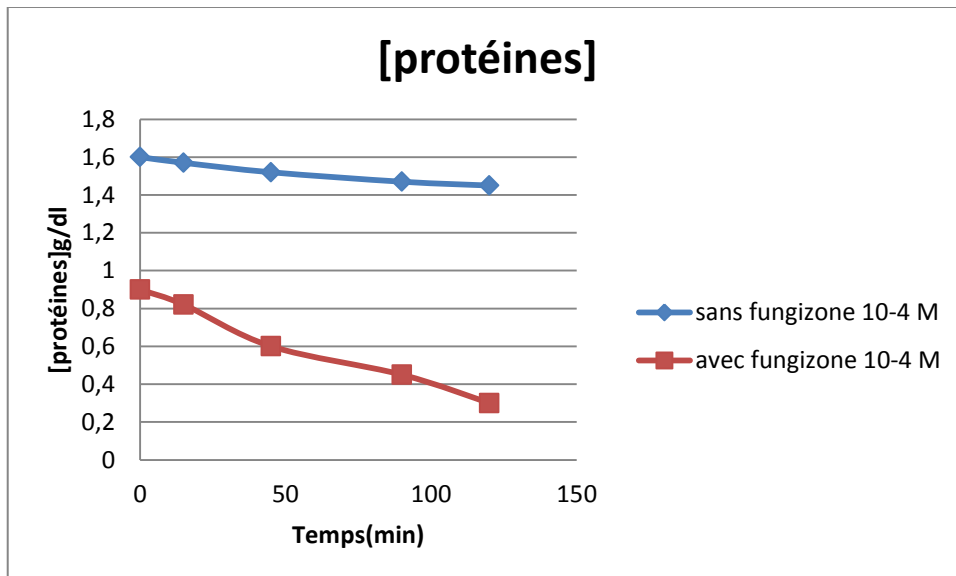


Figure 32 : Effet de la fungizone sur [protéines] (test 03).

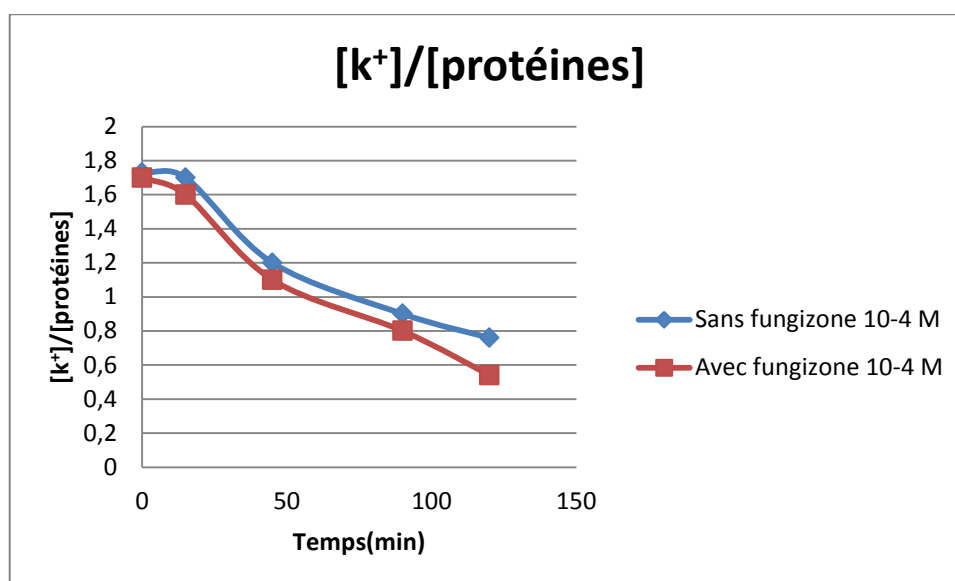


Figure 33: Rapport $[k^+]/[protéines]$ (test 03).

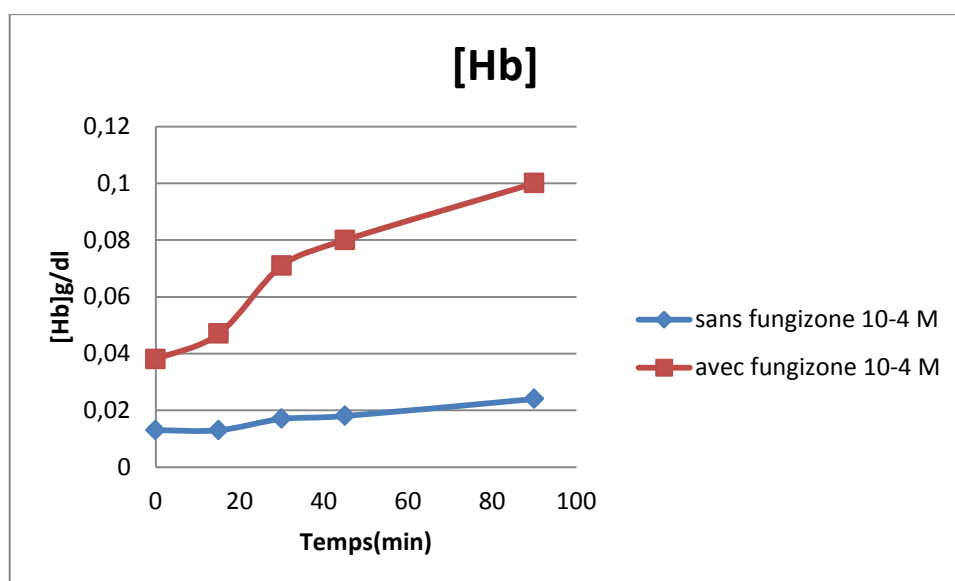


Figure 34 : Effet de la fungizone sur la $[Hb]$ (test 04).

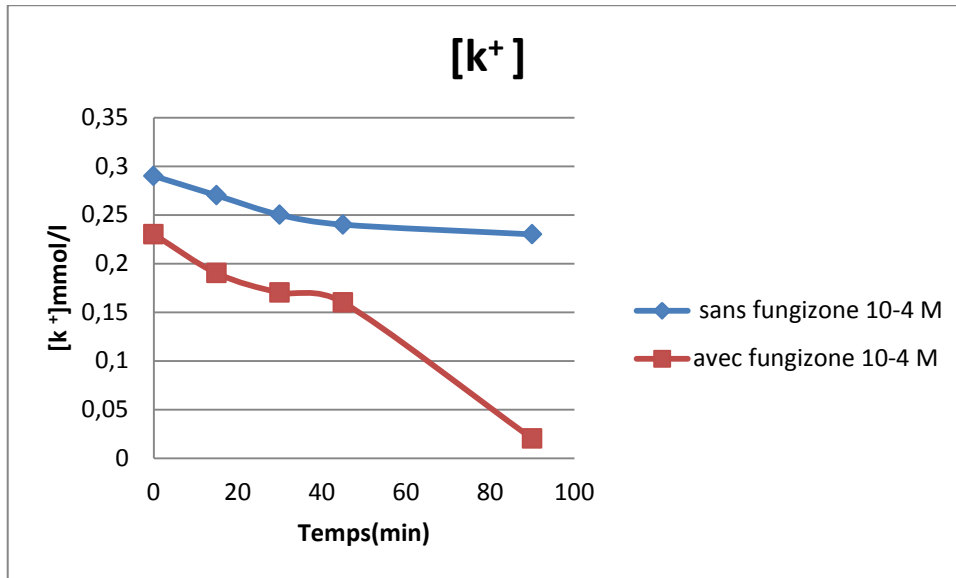


Figure 35 : Effet de la fungizone sur la [k⁺] (test 04).

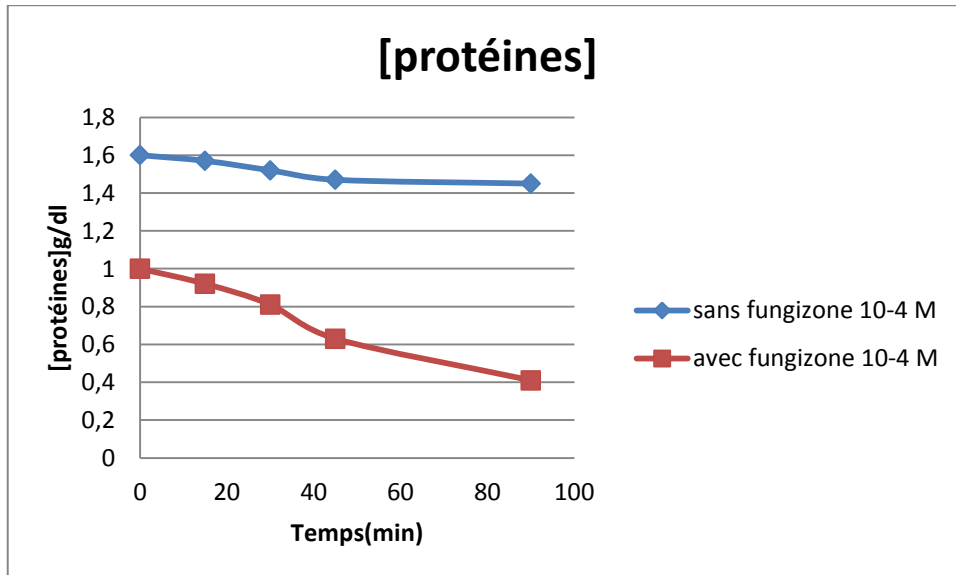


Figure 36 : Effet de la fungizone sur [protéines] (test 04).

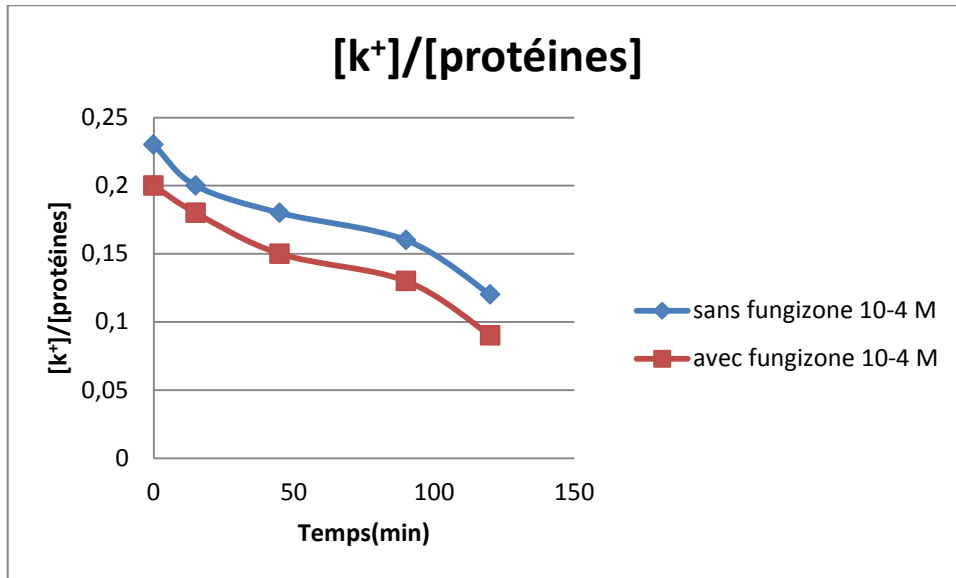


Figure 37 : Rapport [K⁺]/ [protéines] (test 04).

Test n° 5

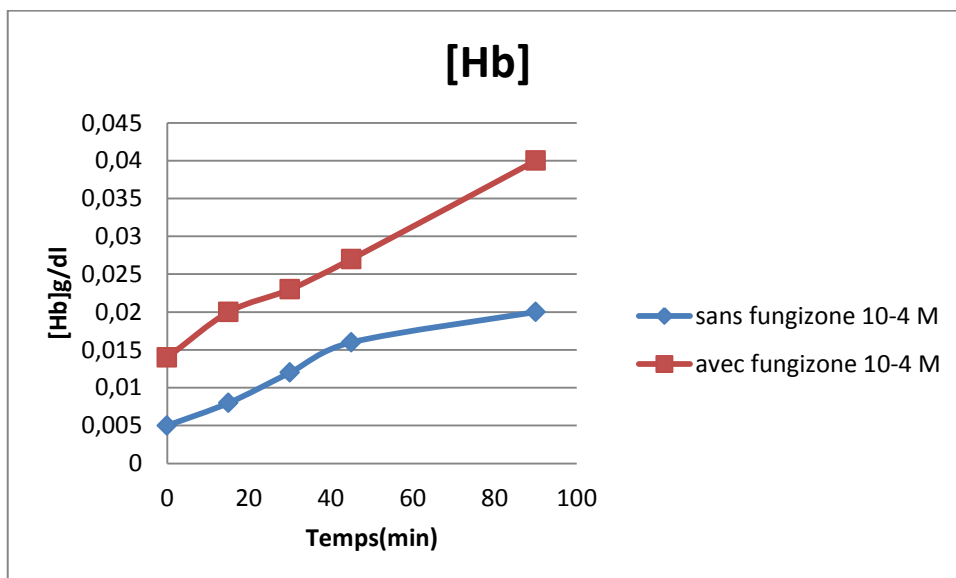


Figure 38: Effet de la fungizone sur la [Hb] (test 05).

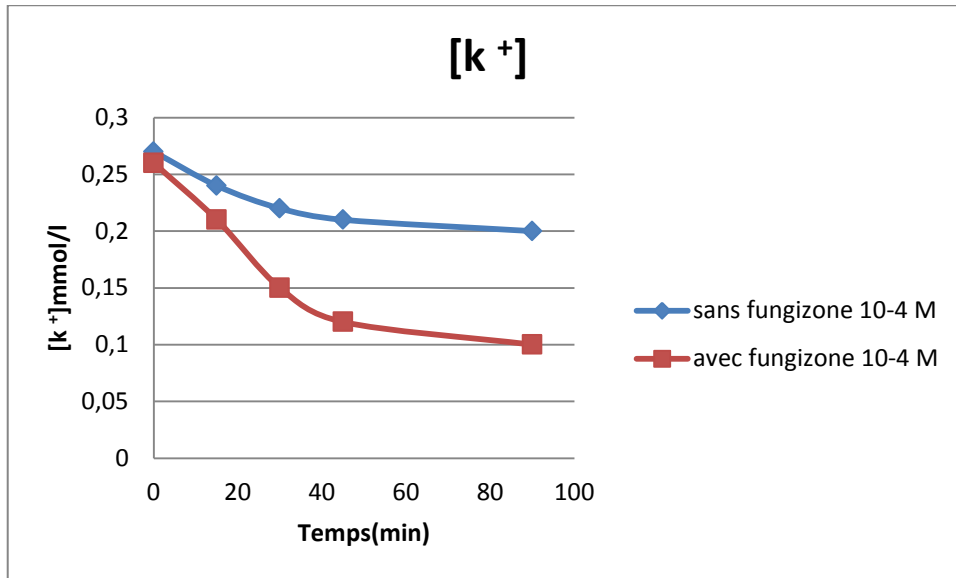


Figure 39 : Effet de la fungizone sur la [k⁺] (test 05).

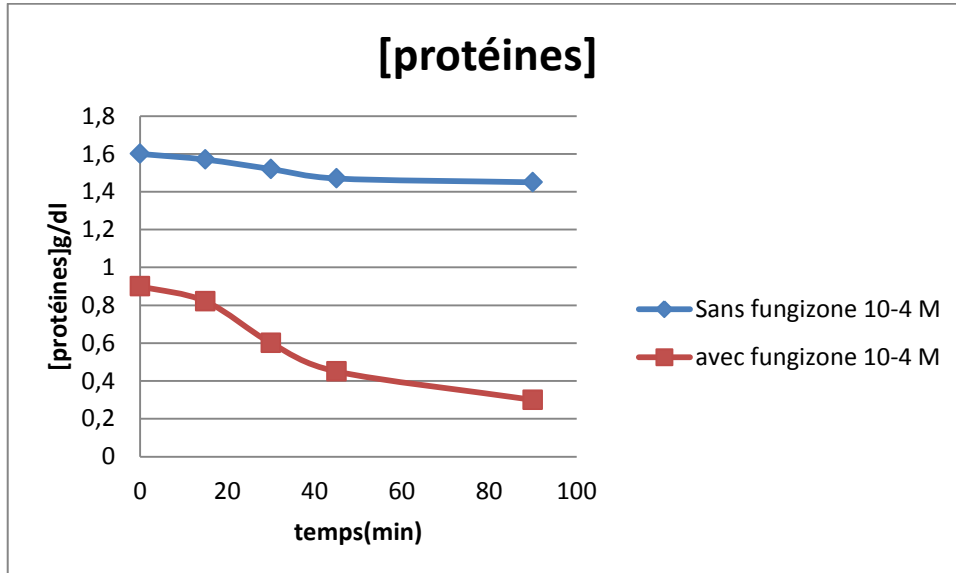


Figure 40 : Effet de la fungizone sur [protéines] (test 05).

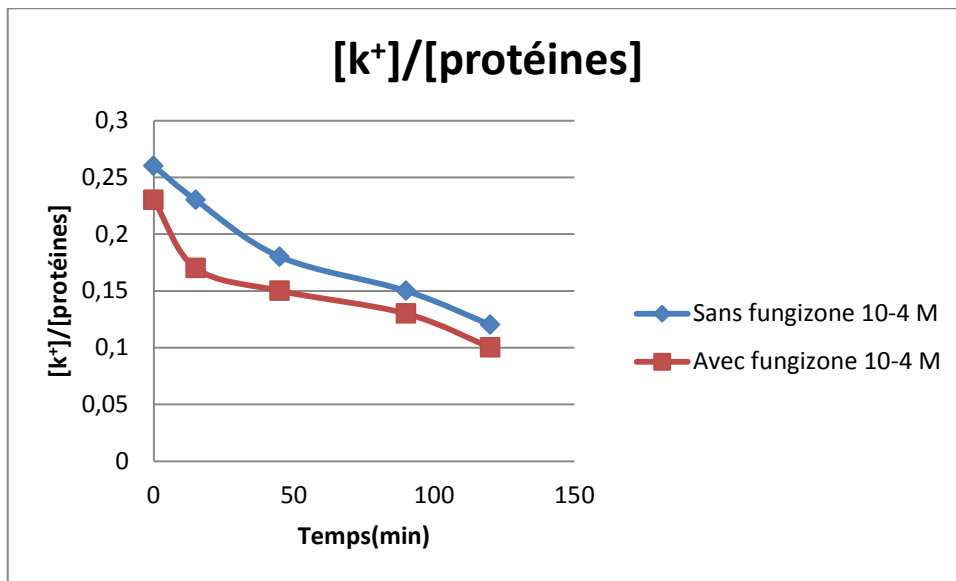


Figure 41: Rapport $[k^+]/[protéines]$ (test 05).

Test n°6

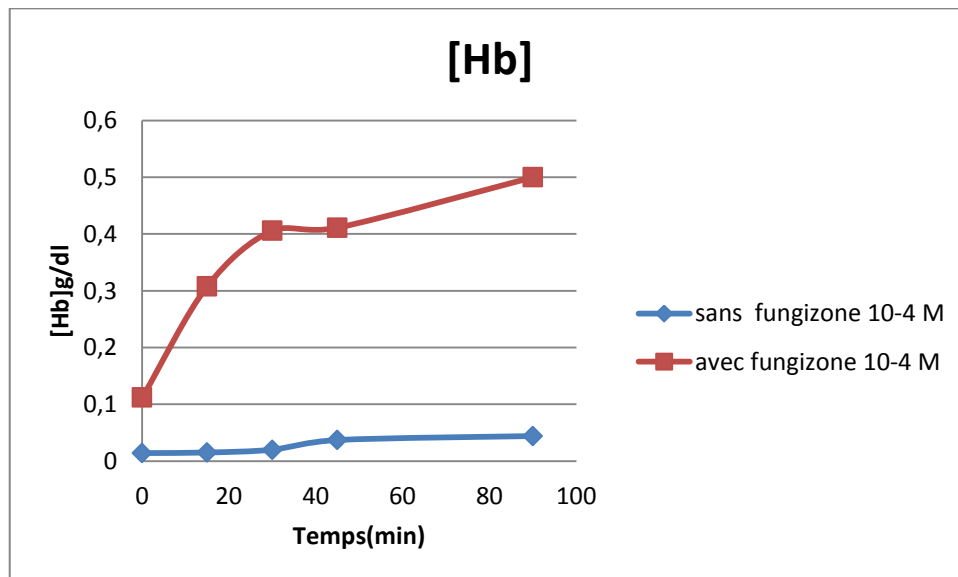


Figure 42 : Effet de la fungizone sur la $[Hb]$ (test 06).

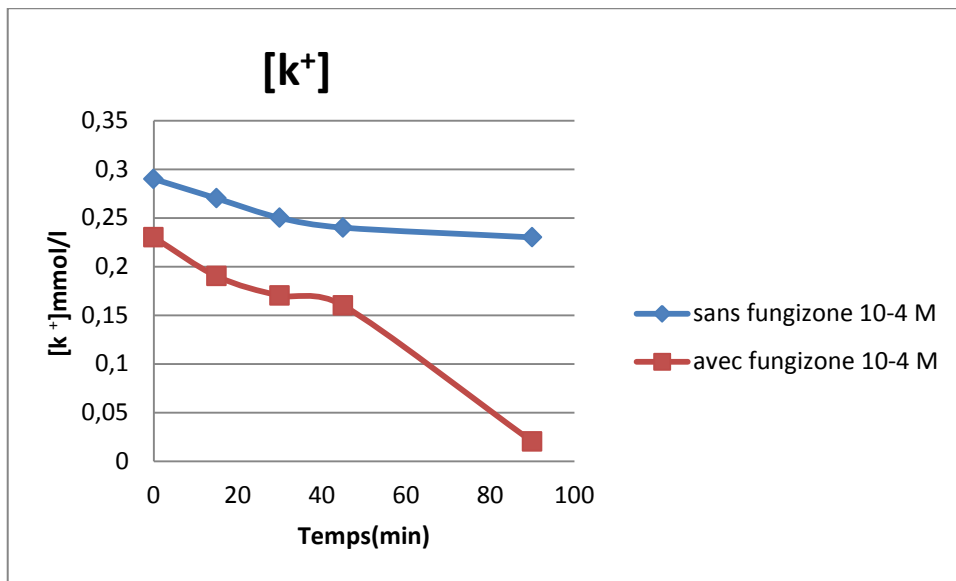


Figure 43 : Effet de la fungizone sur la [k⁺] (test 07).

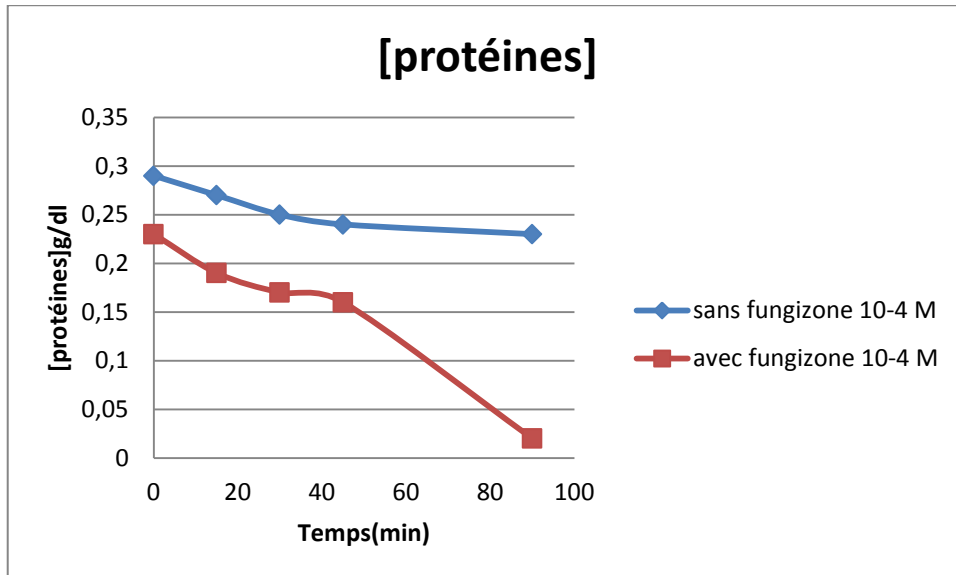


Figure 44 : Effet de la fungizone sur [protéines] (test 06).

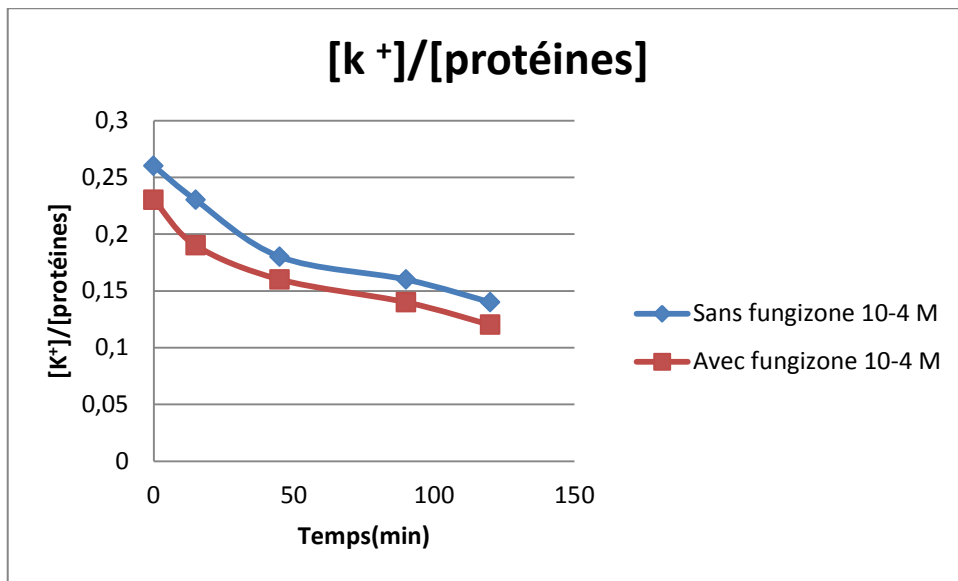


Figure 45 : Rapport [k⁺]/ [protéines] (test 06).

Test n°7

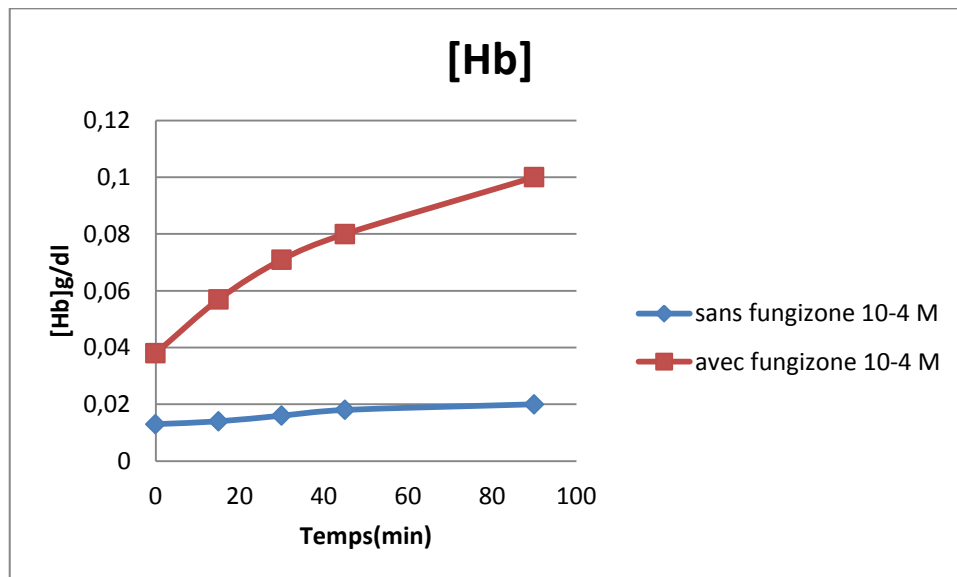


Figure 46: Effet de la fungizone sur la [Hb] (test 07).

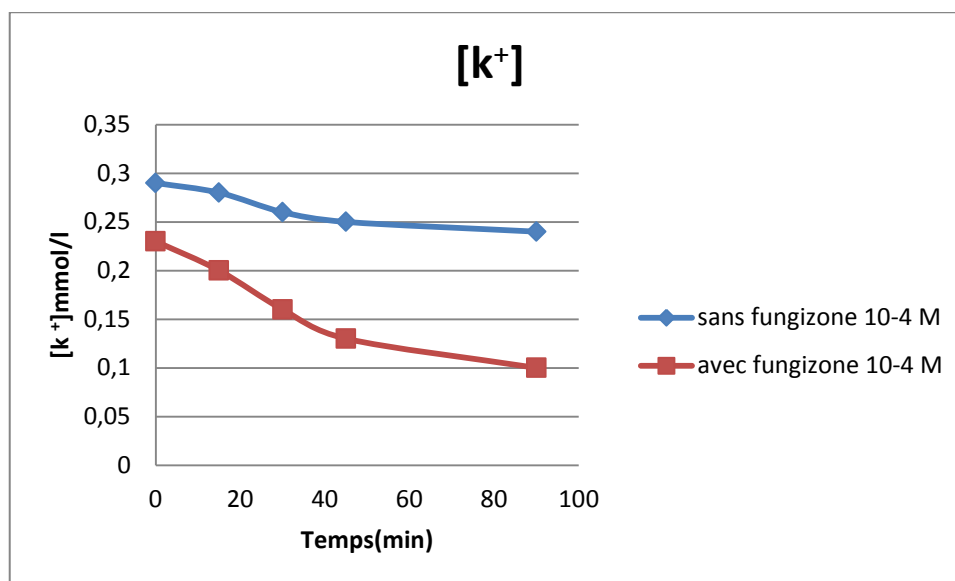


Figure 47: Effet de la fungizone sur la $[K^+]$ (test 07).

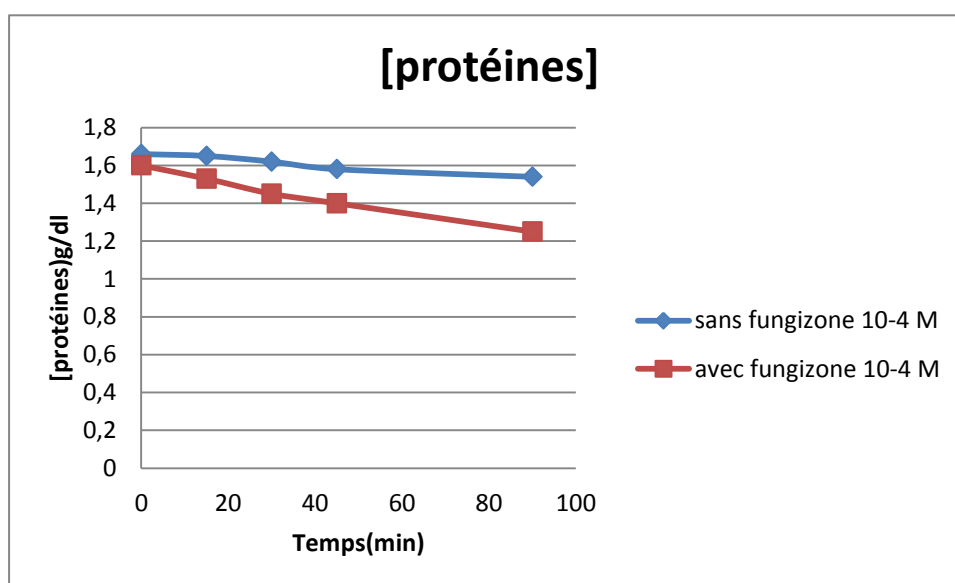


Figure 48: Effet de la fungizone sur $[protéines]$ (test 07).

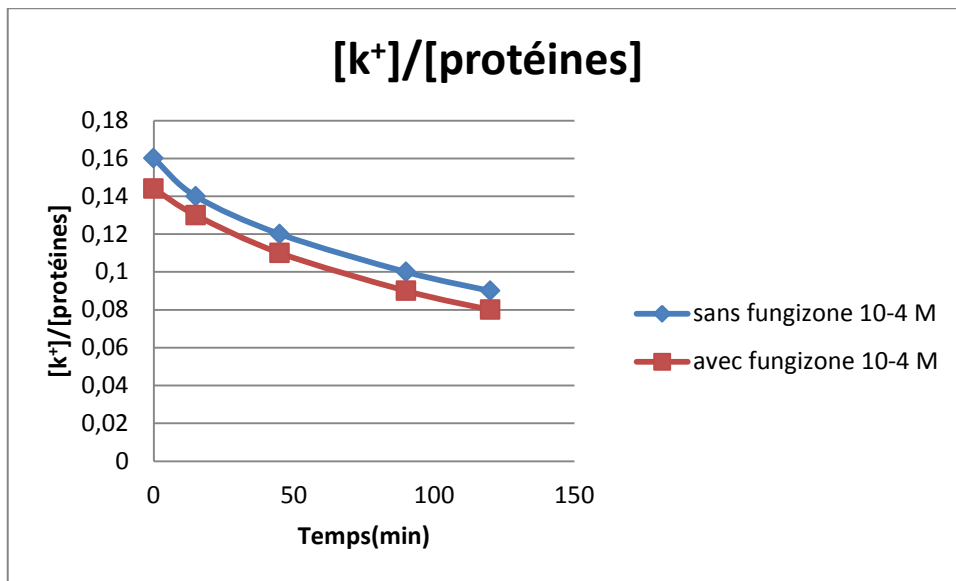


Figure 49: Rapport [k⁺]/ [protéines] (test 07).

VI.1.2 Evaluation de l'effet de l'albumine sur la toxicité de la Fungizone®

VI.1.2.1 Premier cas : incubation de la sérum albumine humaine avec la Fungizone®

Test n° 8 (200 µl)

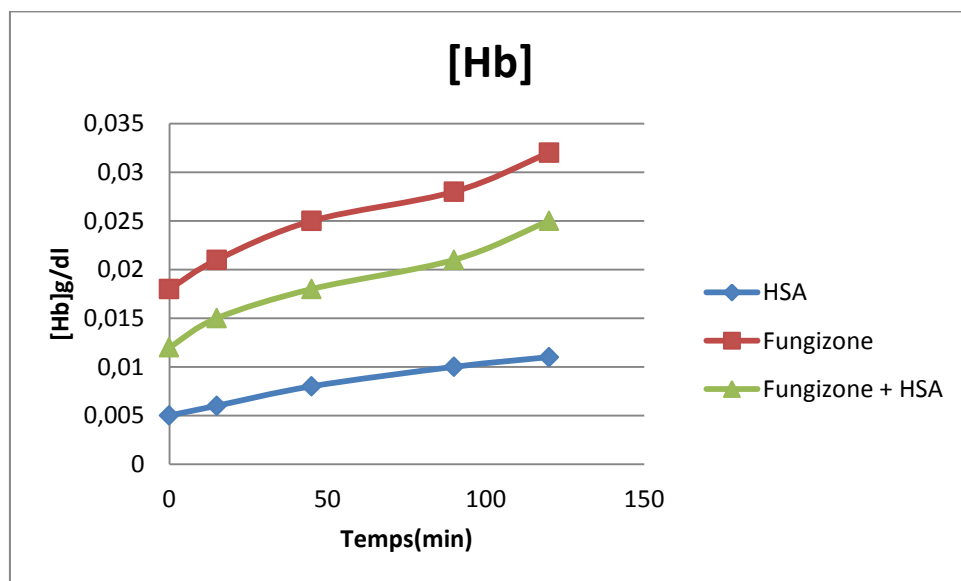


Figure 50 : Effet de la fungizone sur la [Hb] en présence et en absence de l'HSA (Test 08).

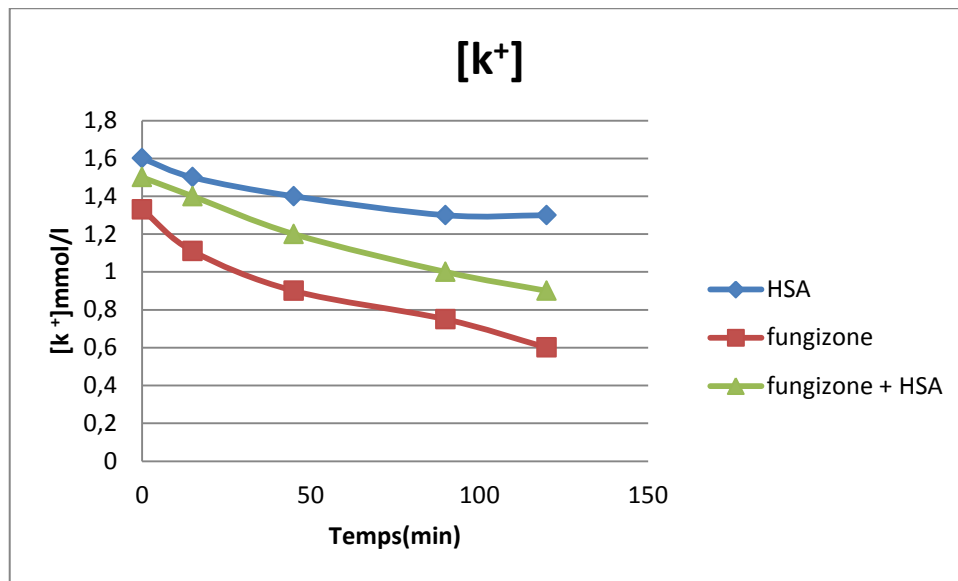


Figure 51 : Effet de la fungizone sur la [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 08).

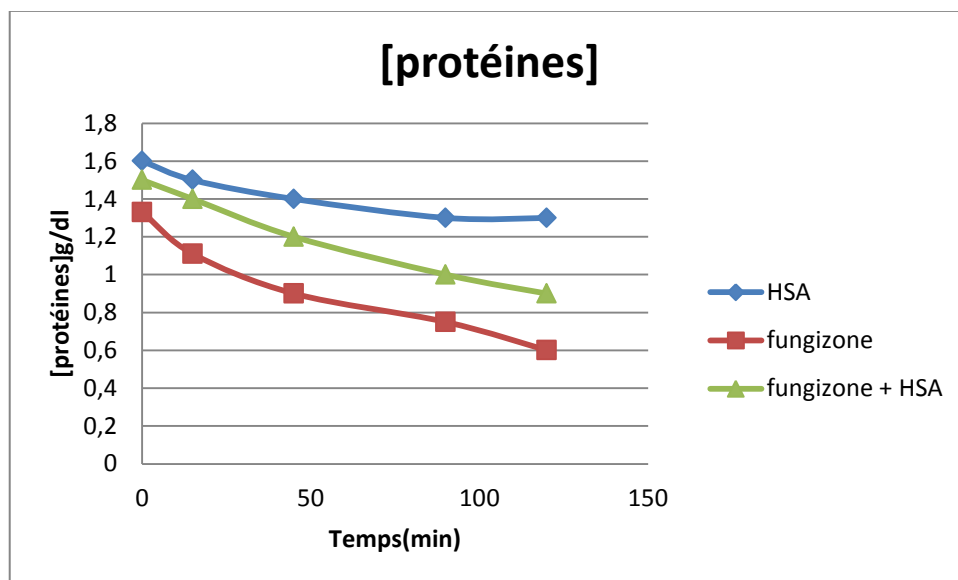


Figure 52 : Effet de la fungizone sur la [protéine] en présence et en l'absence de l'HSA (test 08).

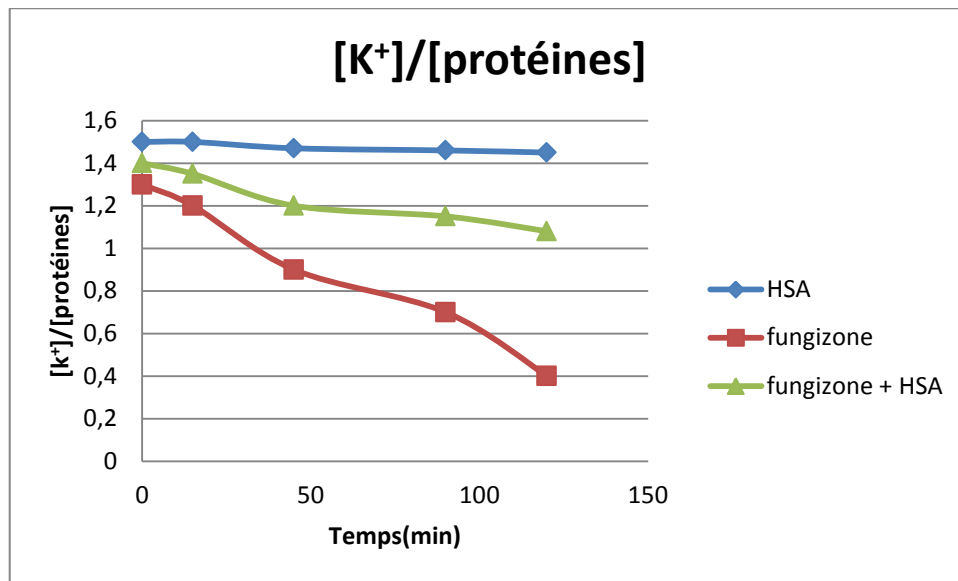


Figure 53: Rapport $[K^+]/[protéines]$ (test 08).

Test n°09 (250 μ l)

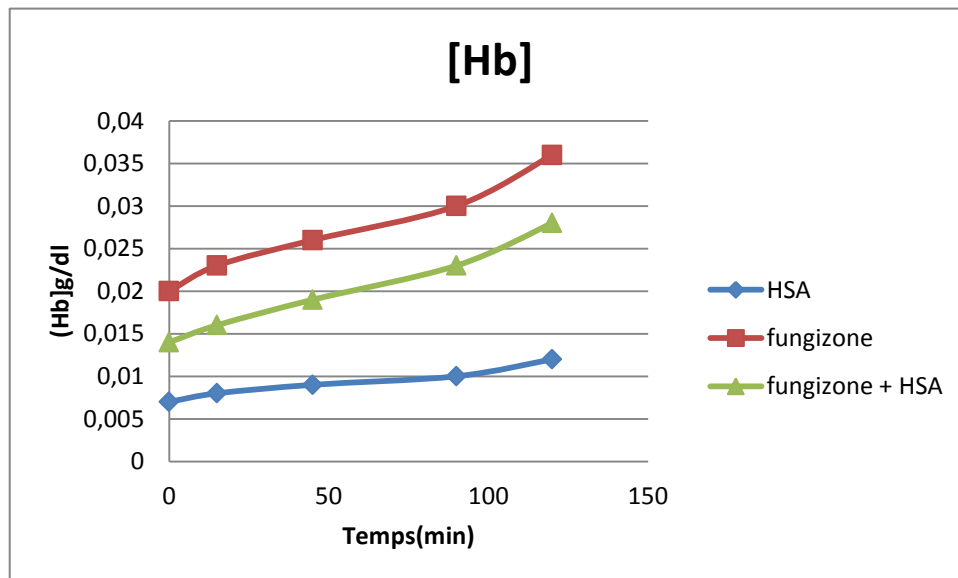


Figure 54: Effet de la fungizone sur la $[Hb]$ en présence et en absence de l'HSA (test 09)

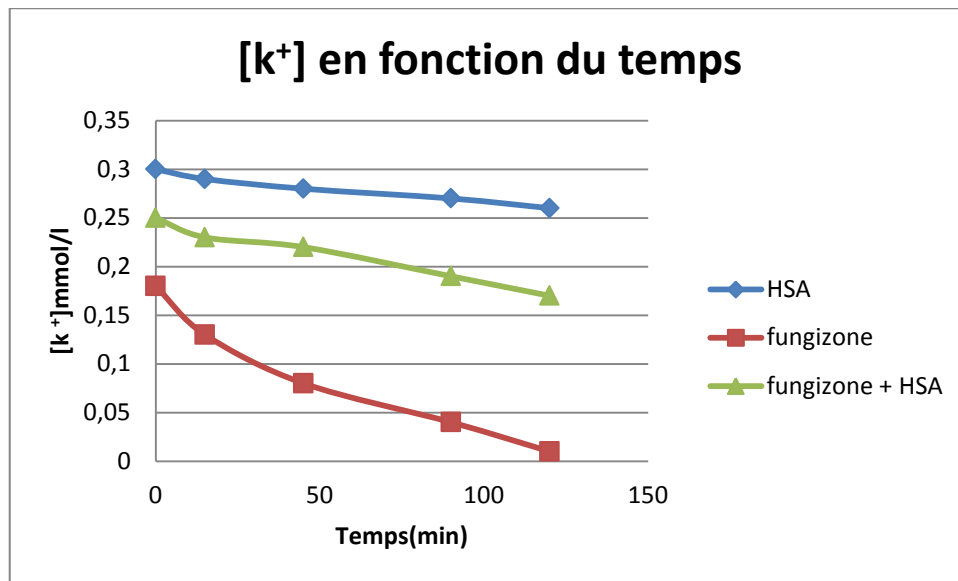


Figure 55 : Effet de la fungizone sur la [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 09).

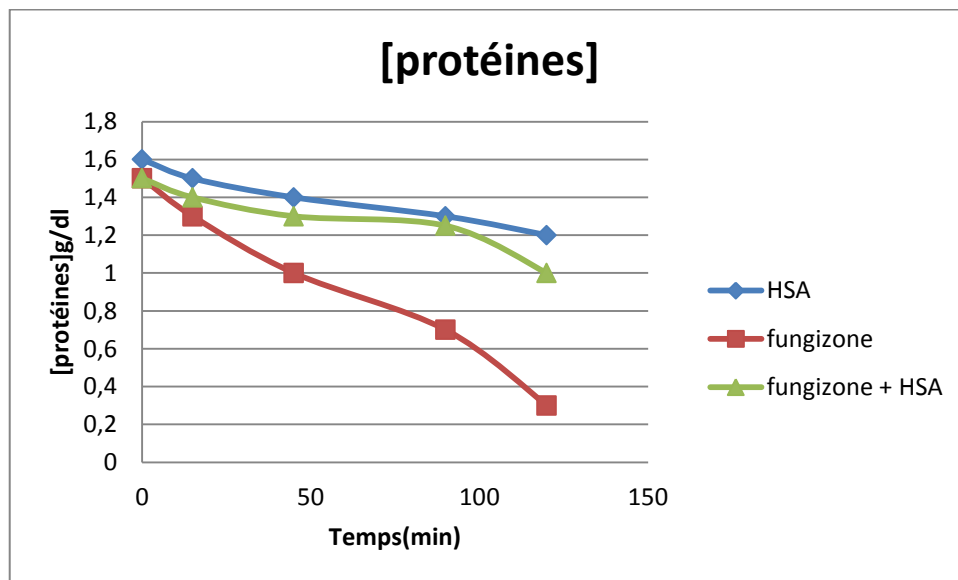


Figure 56: Effet de la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 09).

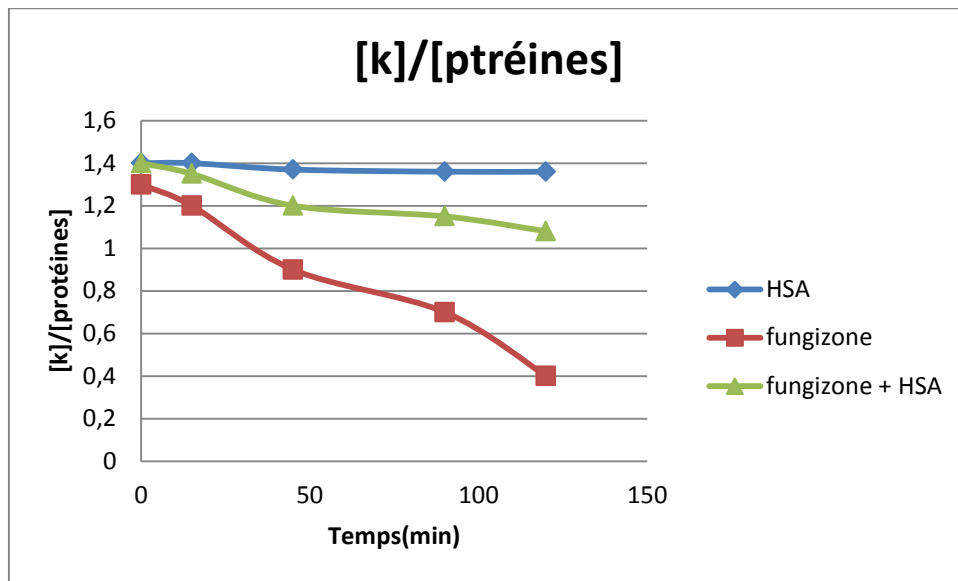


Figure 57: Rapport $[k^+]/[protéines]$ (test 09).

Test n° 10 (500 μ l)

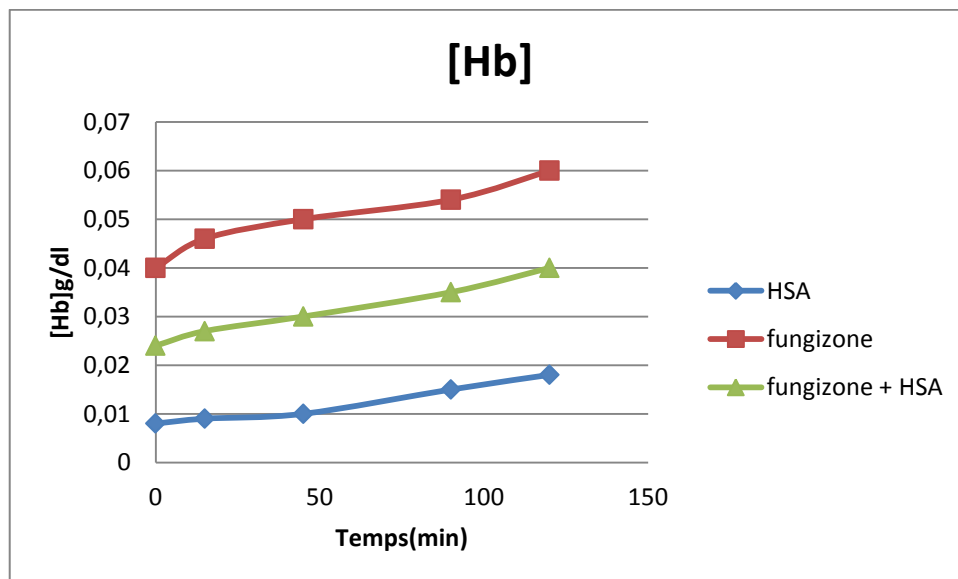


Figure 58: Effet de la fungizone sur la $[Hb]$ en présence et en absence de l'HSA (test 10).

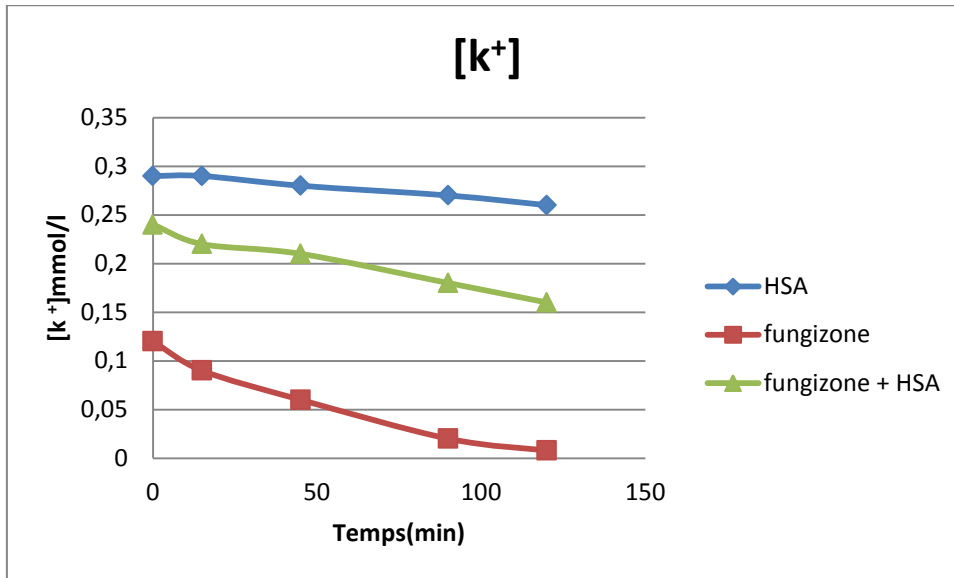


Figure 59: Effet de la fungizone sur la [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 10).

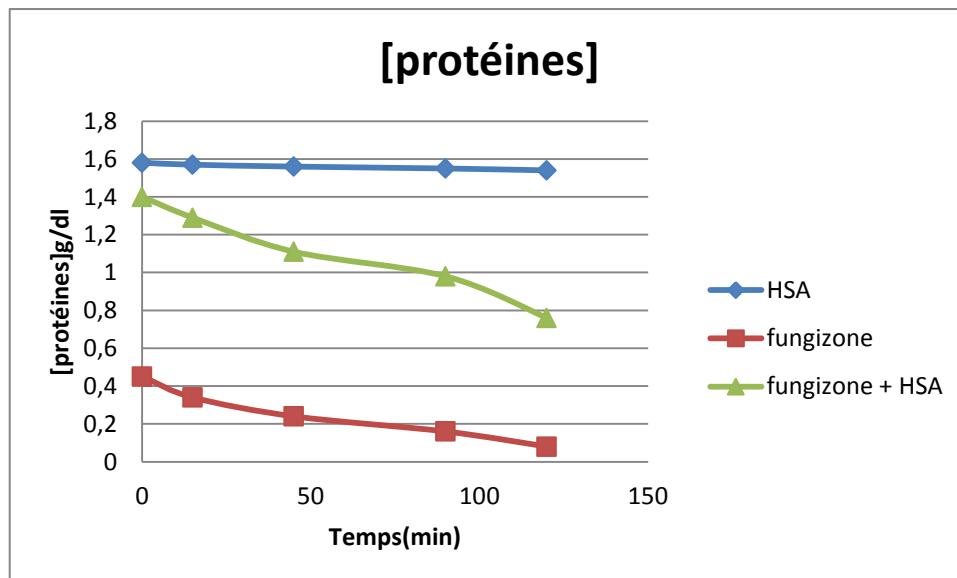


Figure 60 : Effet de la fungizone sur la [protéine] en présence et en absence de l'HSA (test 10).

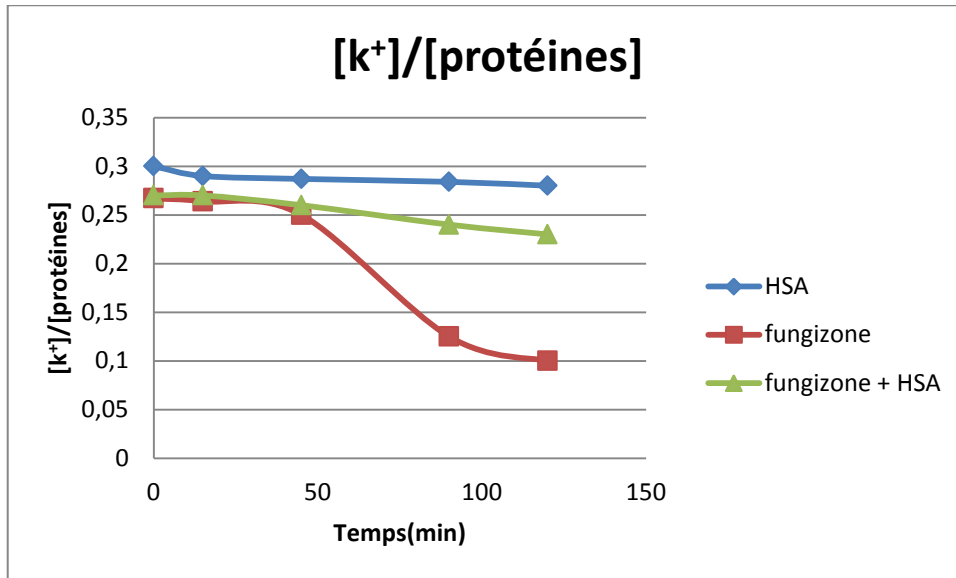


Figure 61: Rapport [k⁺]/ [protéines] (test 10).

Test n° 11 (1000 µl)

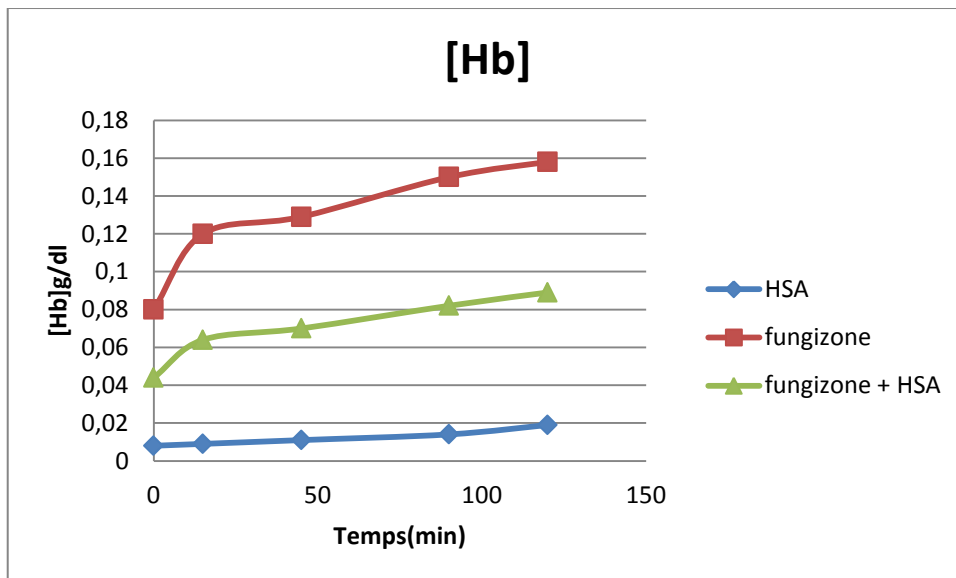


Figure 62 : Effet de la fungizone sur la [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 11).

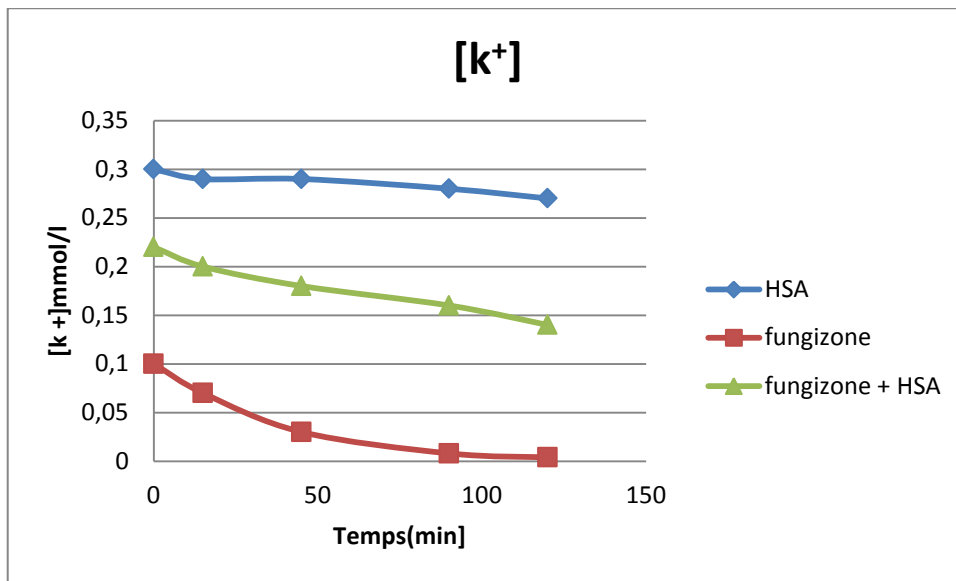


Figure 63 : Effet de la fungizone sur la [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 11)

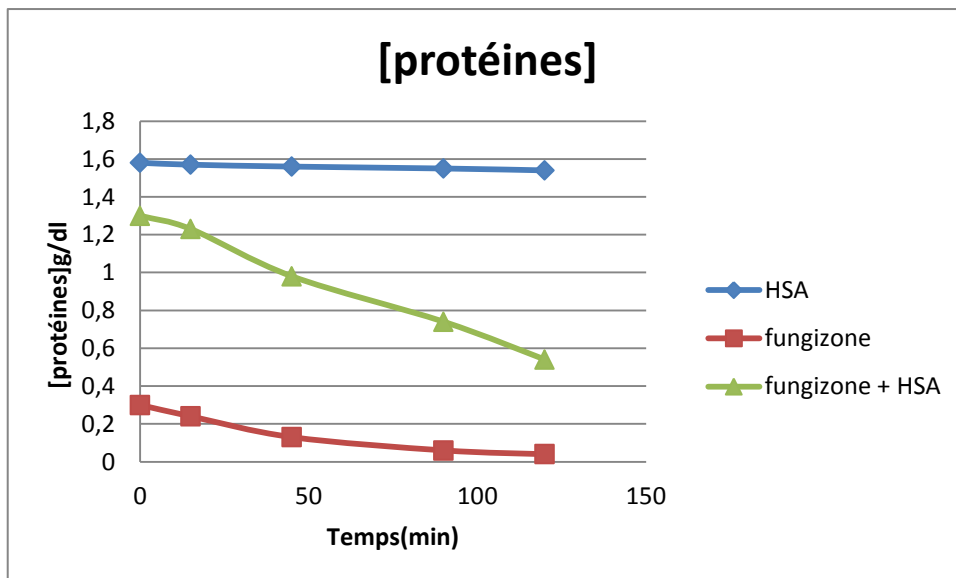


Figure 64 : Effet de la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 11).

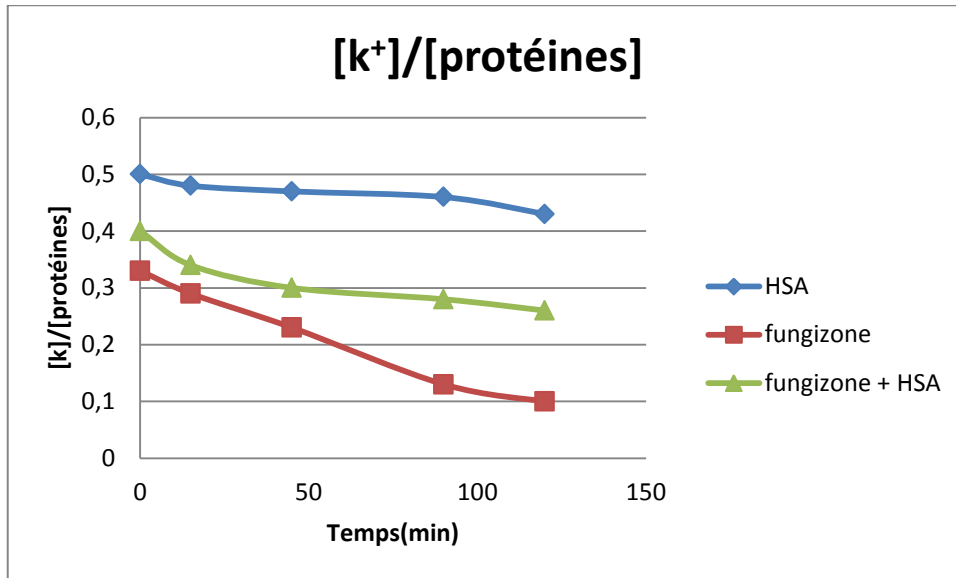


Figure 65 : Rapport $[k^+]/ [protéines]$ (test 11).

Effet dose-réponse

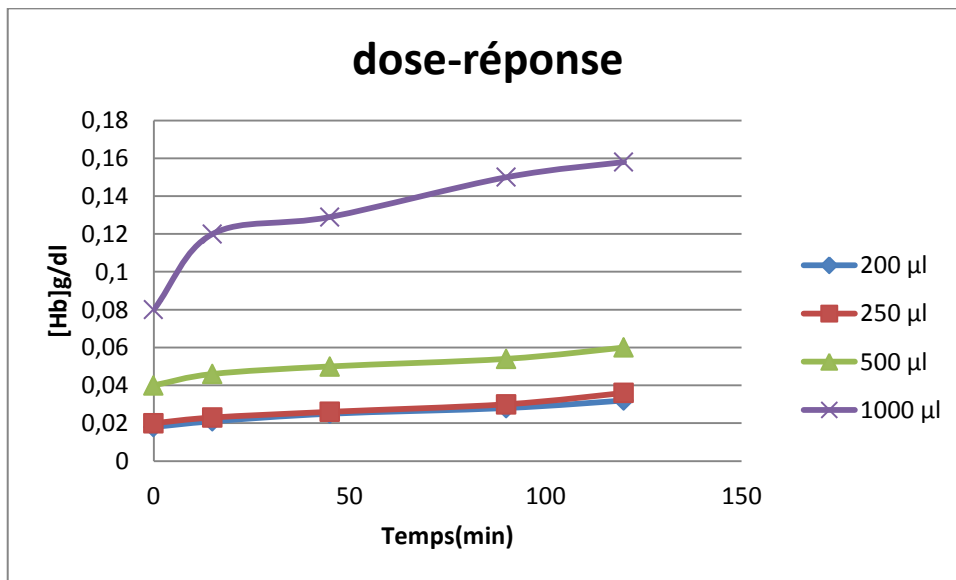


Figure 66 : $[Hb]$ en fonction de différentes doses de fungizone.

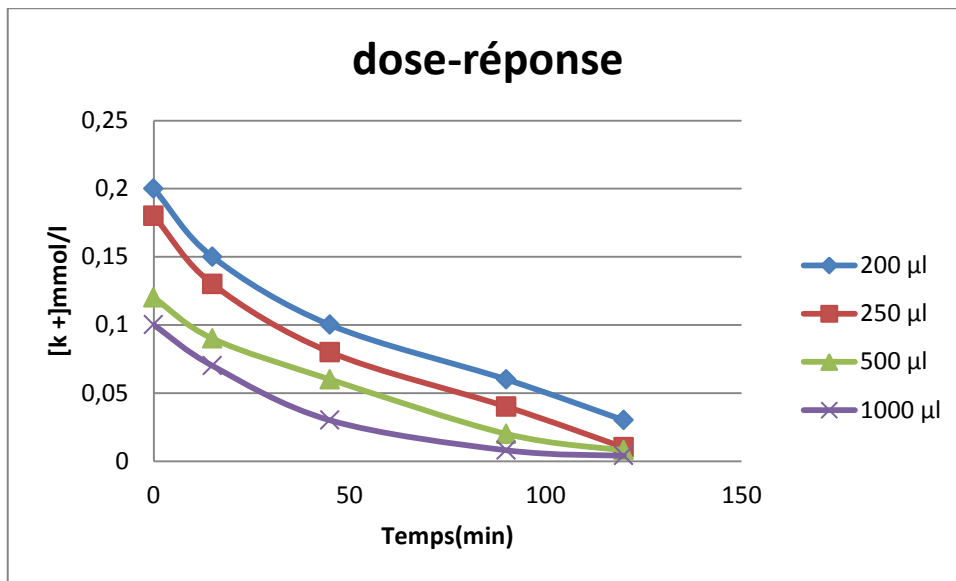


Figure 67: $[k^+]$ en fonction de différentes doses de fungizone.

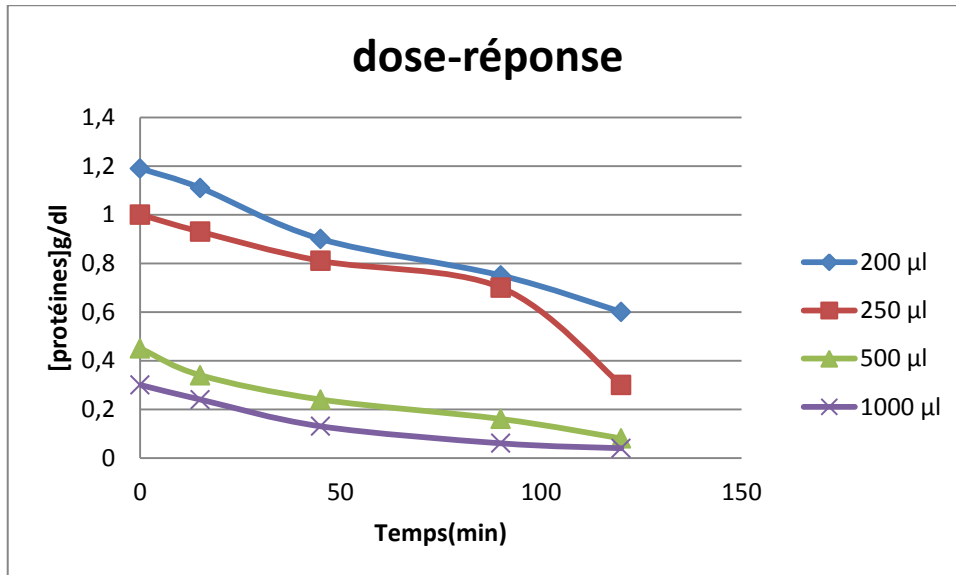


Figure 68 : [protéines] en fonction de différentes doses de fungizone.

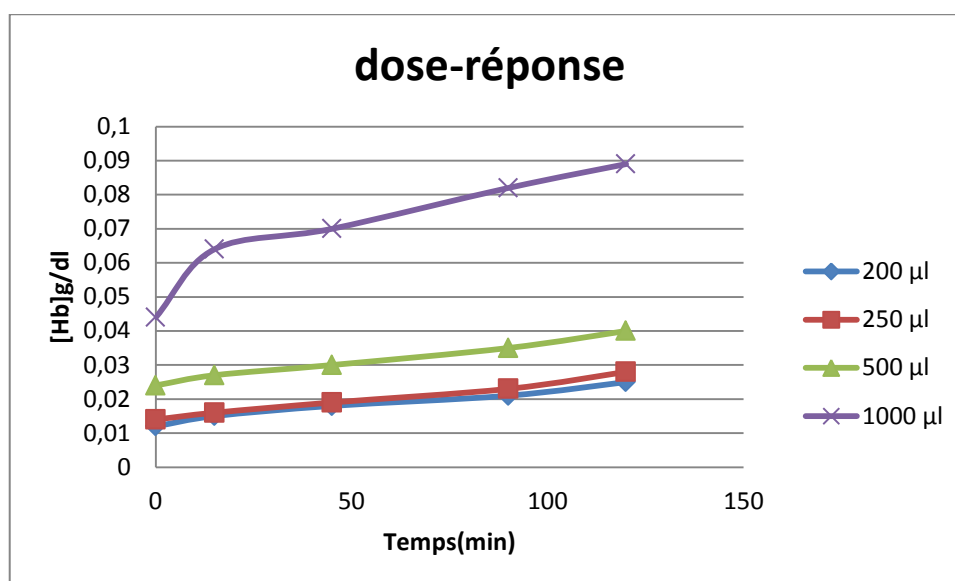


Figure 69: [Hb] en fonction de différente dose de fungizone en présence de l'HSA.

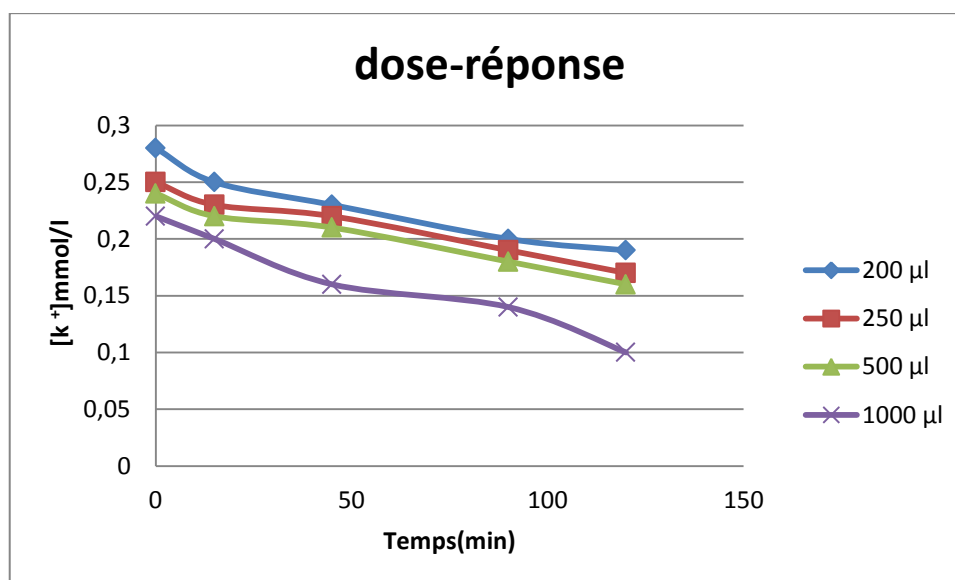


Figure 70: $[k^+]$ en fonction de différentes doses de fungizone en présence de l'HSA.

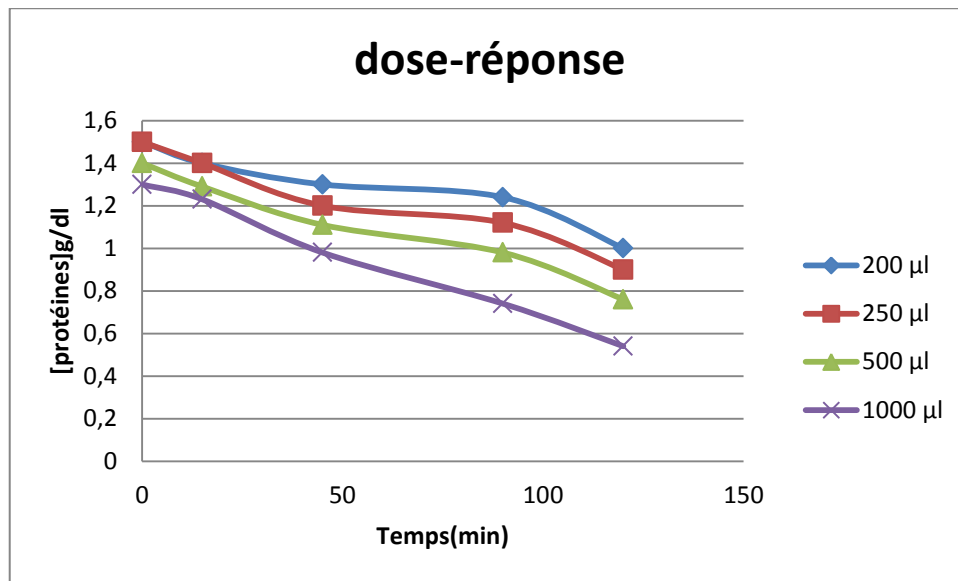


Figure 71 : [protéines] en fonction des doses de fungizone en présence de l'HSA.

2.2 Pré incubation avec les cellules

Test n°12 (500 µl)

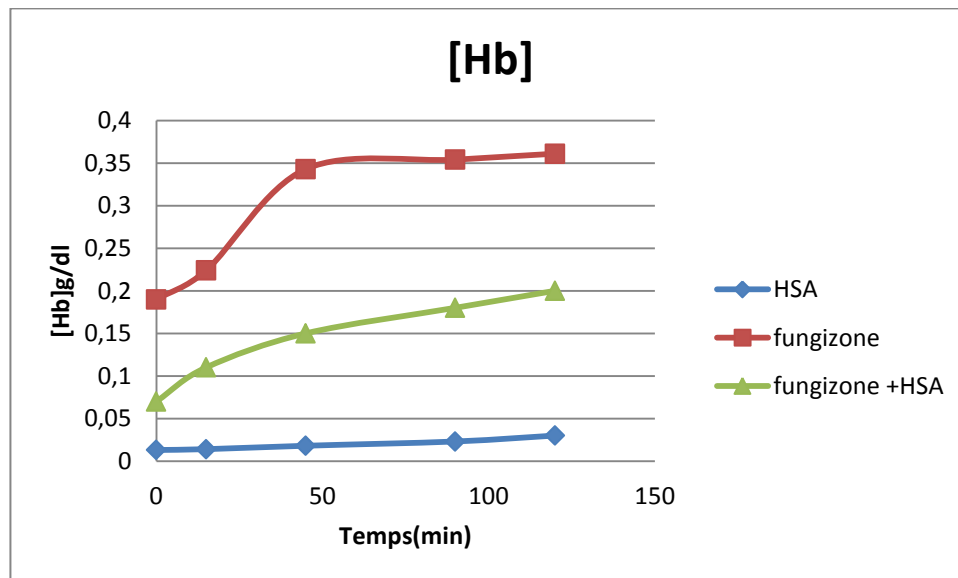


Figure 72 : Effet de la fungizone sur la [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 12).

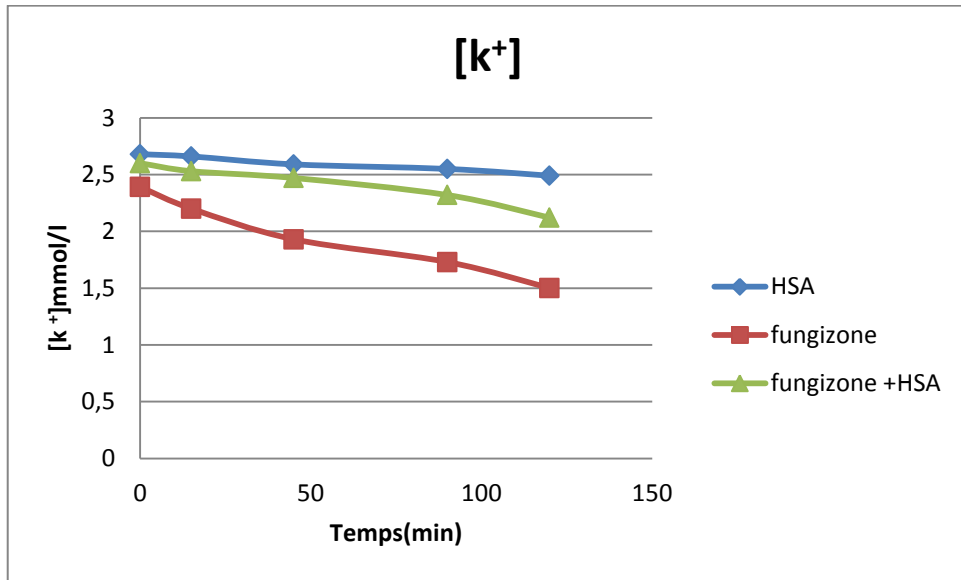


Figure 73 : L'effet de la fungizone sur la $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 12).

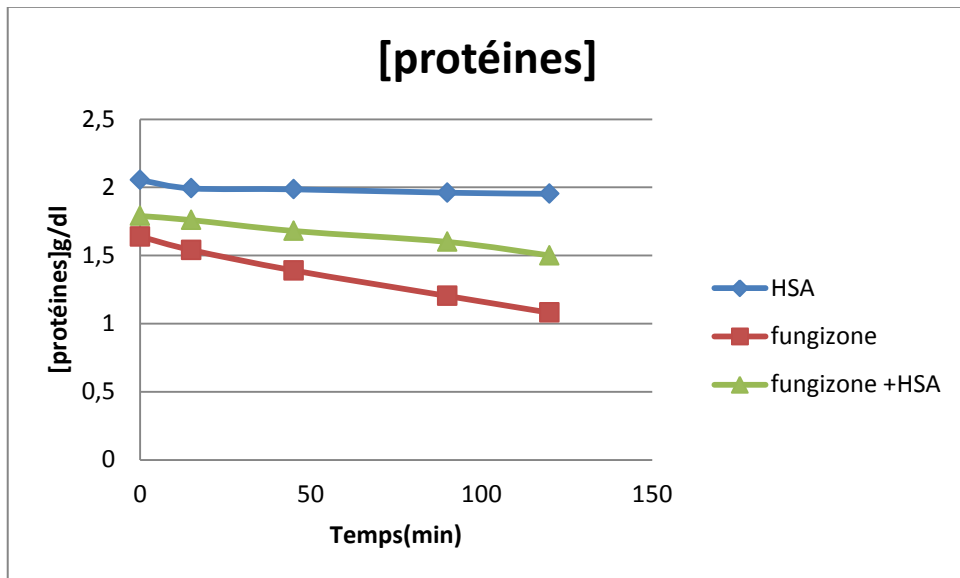


Figure 74 : Effet de la fungizone sur [protéines] en présence et absence de l'HSA (test 12).

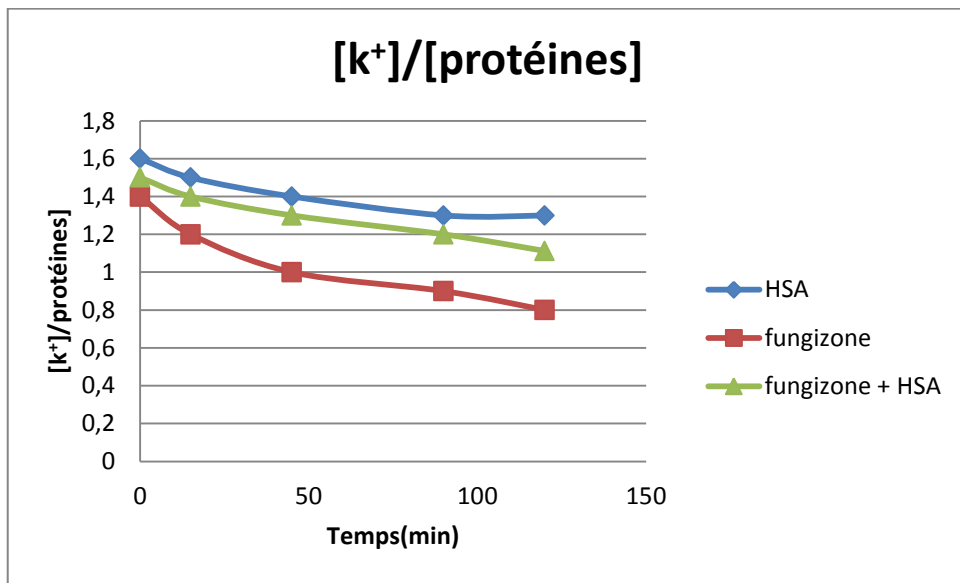


Figure 75: Rapport $[k^+]/[protéines]$ (test 12).

Test n°13(500 μ l)

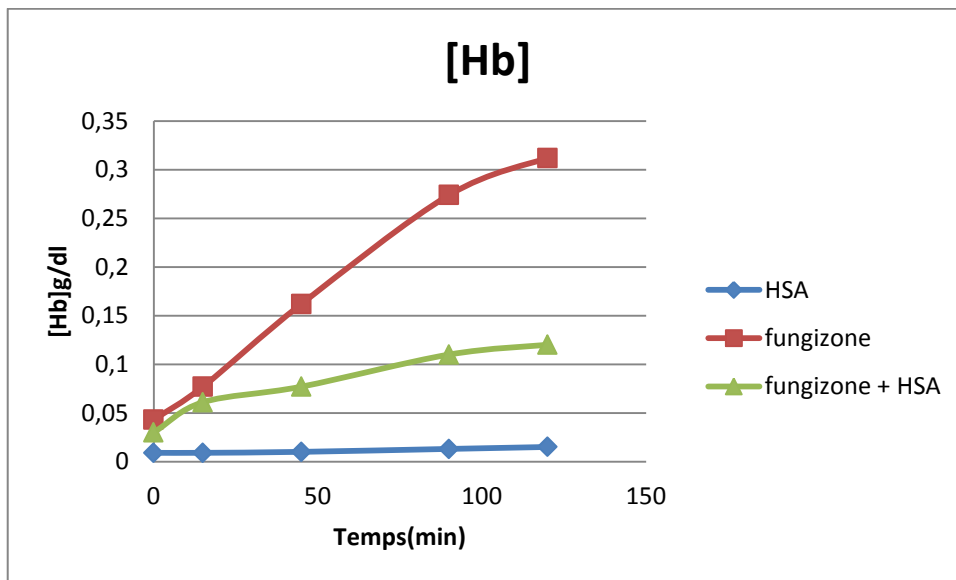


Figure 76 : Effet de la fungizone sur $[Hb]$ en présence et en absence de l'HSA (test 13).

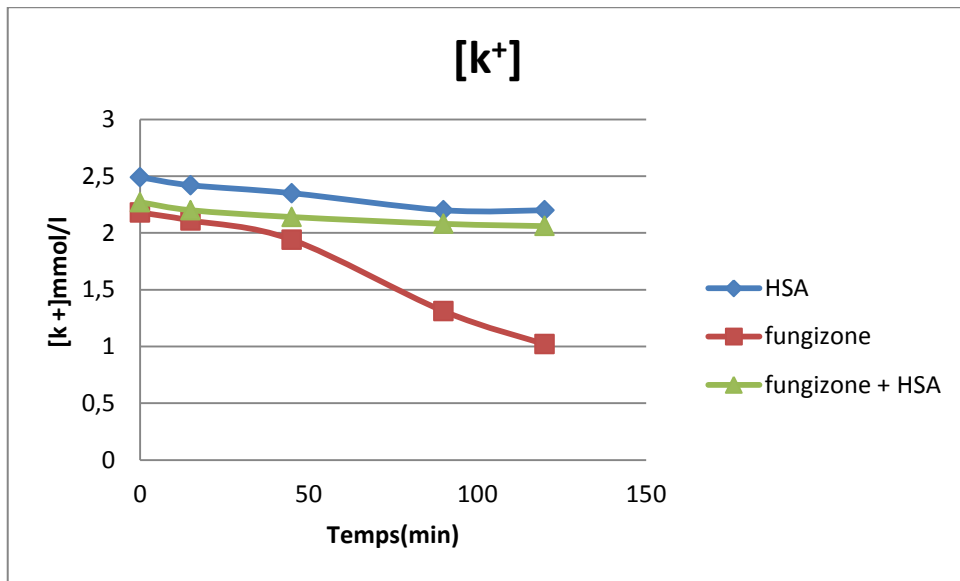


Figure 77 : Effet la fungizone sur [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 13)

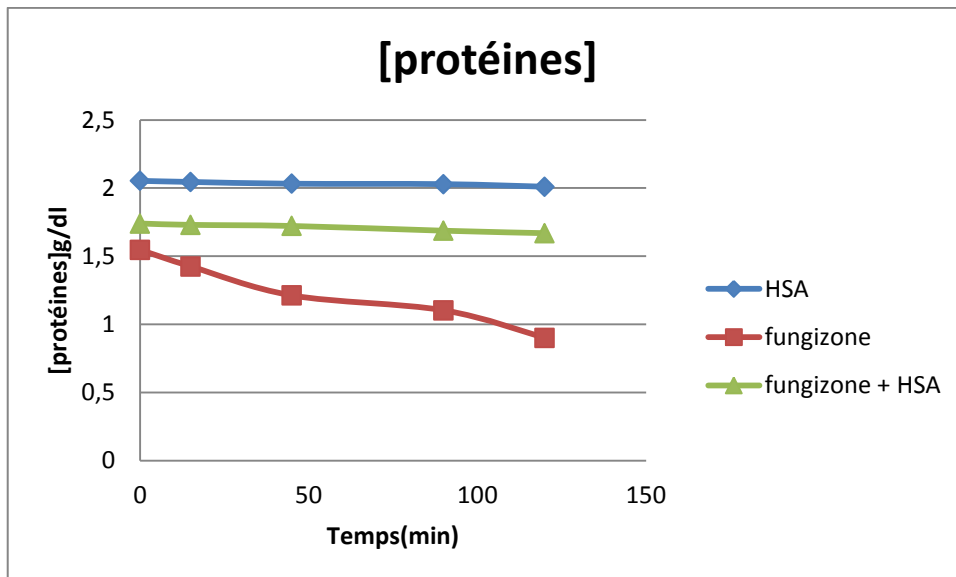


Figure 78 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 13)

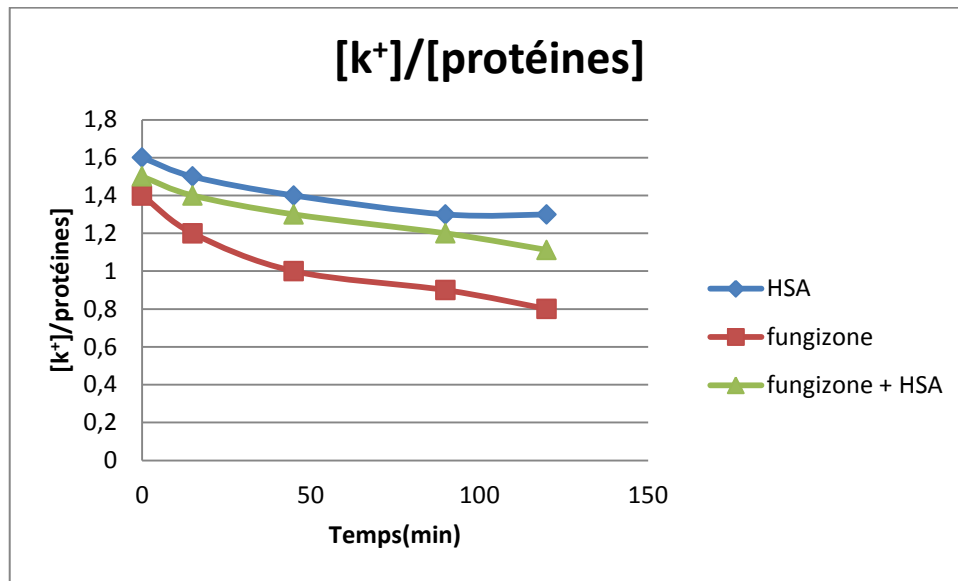


Figure 79: Rapport [k⁺]/ [protéines] (test 13).

Test n°14(500 µl)

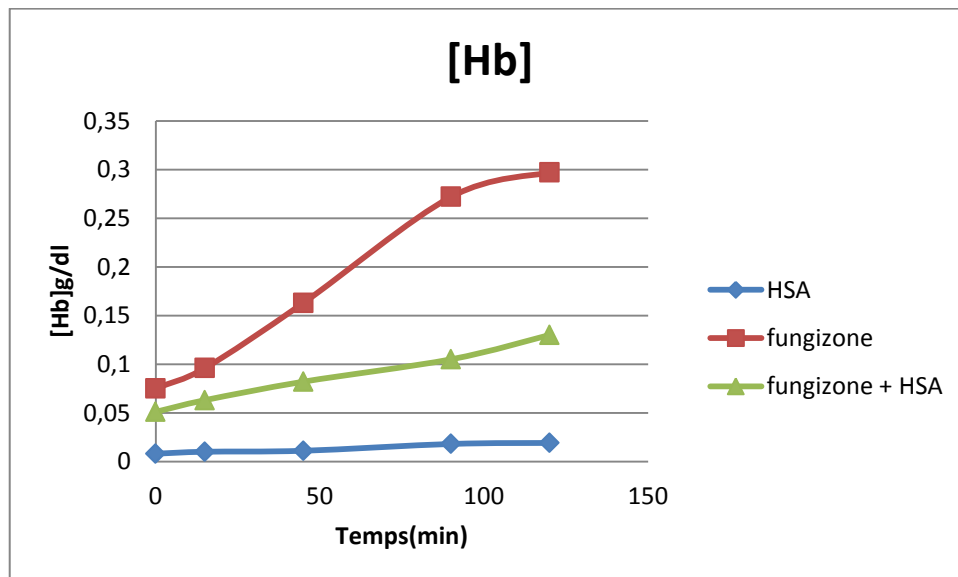


Figure 80 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 14).

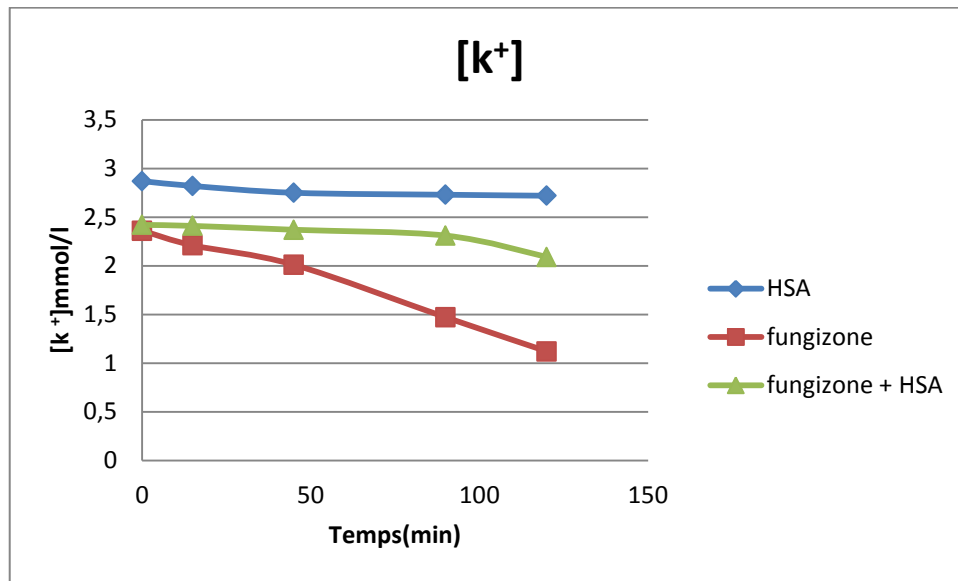


Figure 81 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 14)

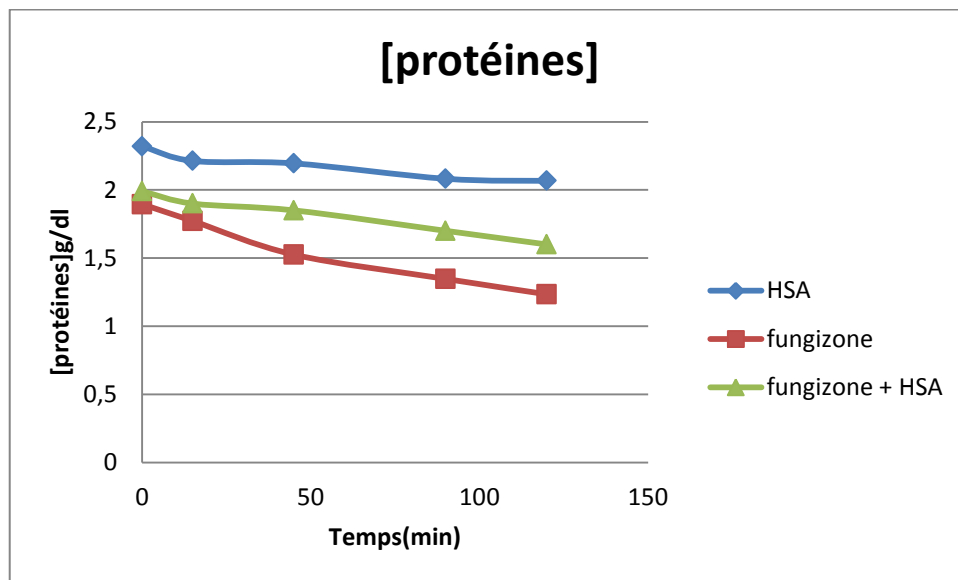


Figure 82 : Effet la fungizone sur $[protéines]$ en présence et en absence de l'HSA (test 14)

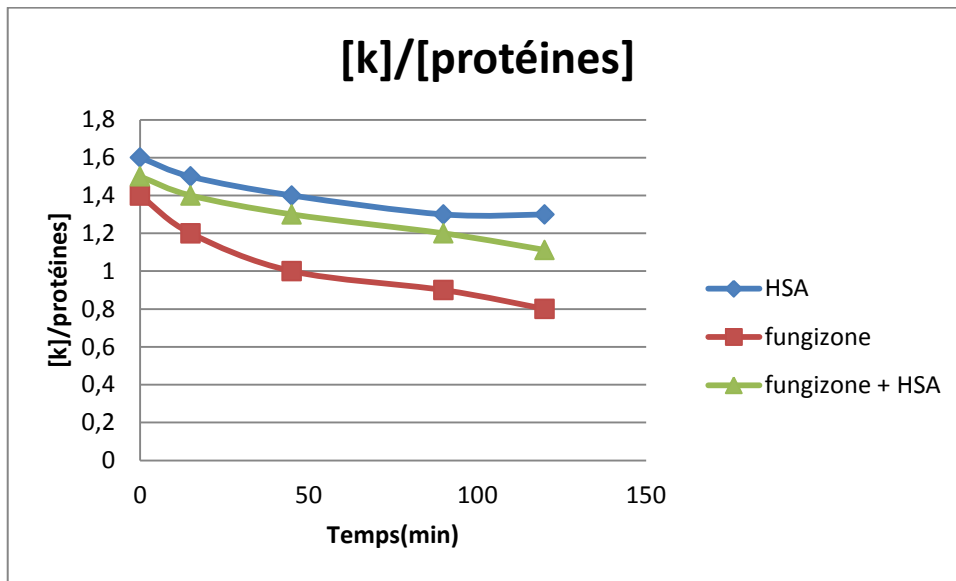


Figure 83: Rapport $[k^+]/[protéines]$ (test 14).

Test n°15 (500 μ l)

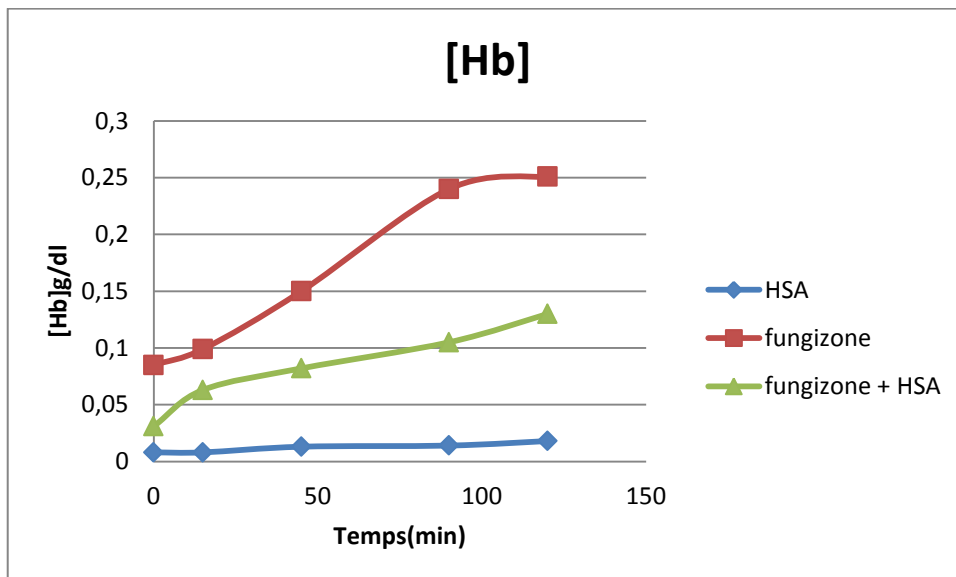


Figure 84 : Effet la fungizone sur $[Hb]$ en présence et en absence de l'HSA (test 15).

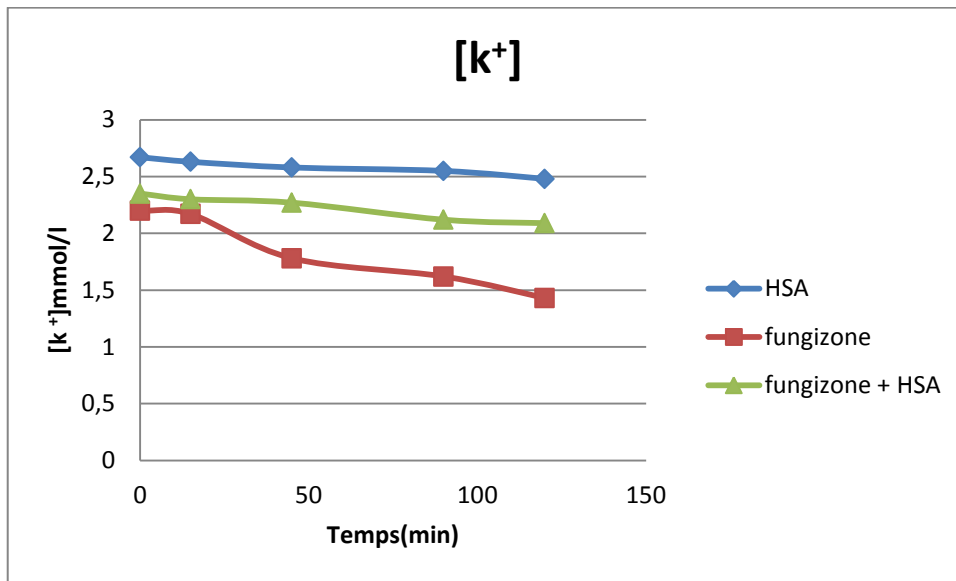


Figure 85 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 15)

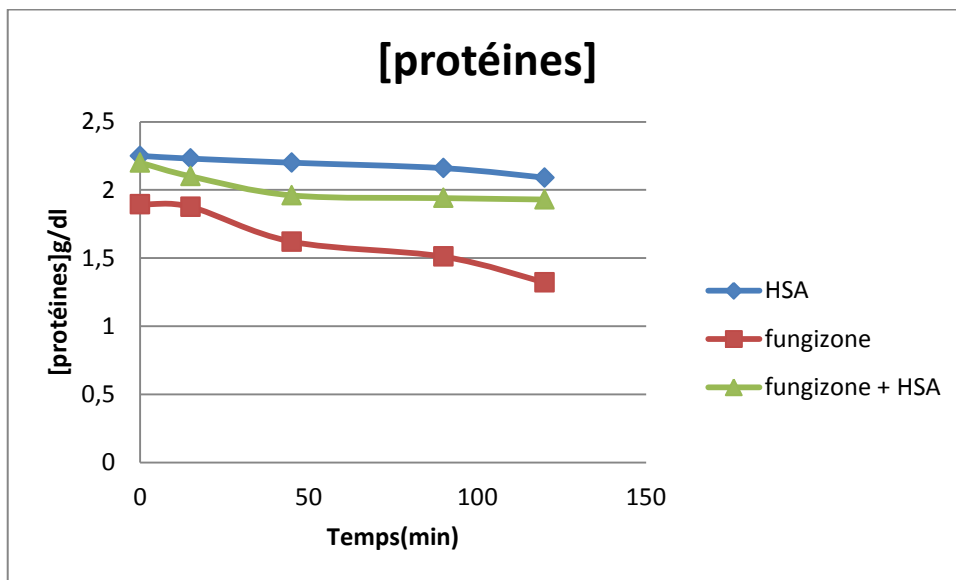


Figure 86 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 15).

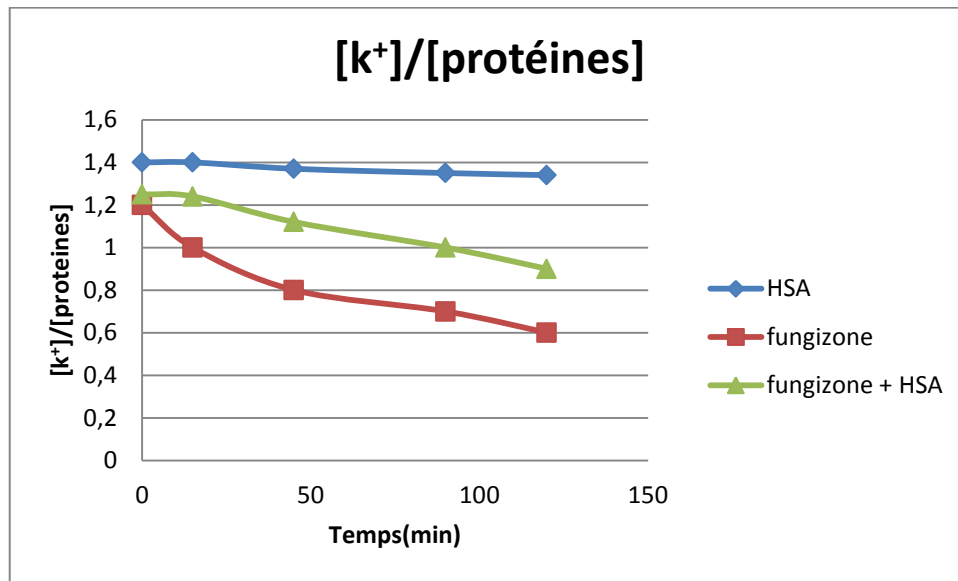


Figure 87: Rapport [k⁺]/[protéines] (test 15).

Test n°16(500 µl)

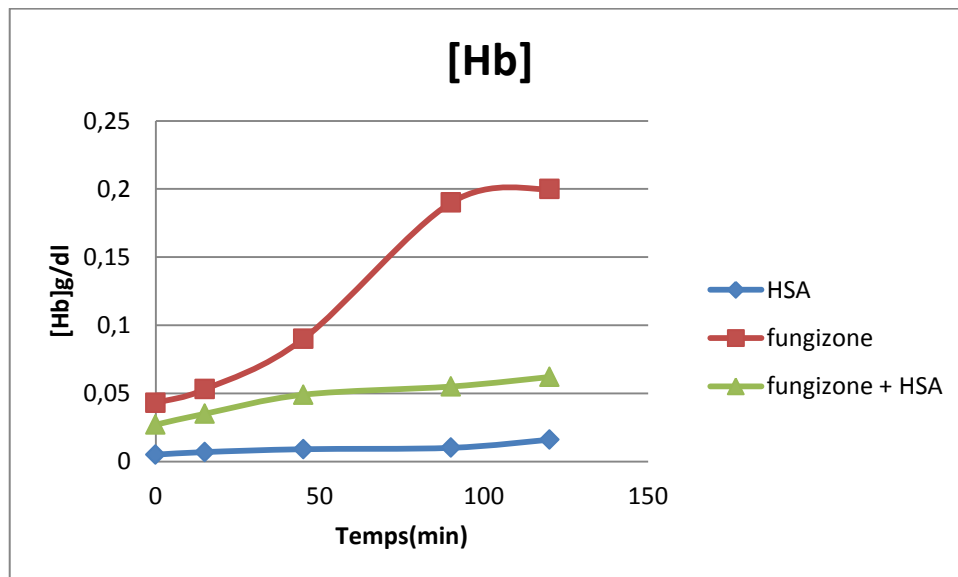


Figure 88: Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 16)

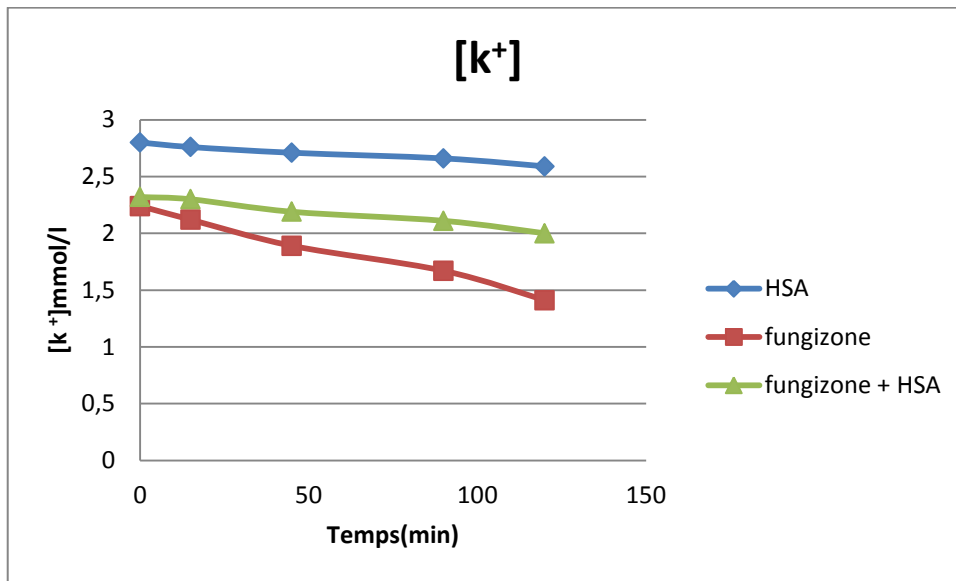


Figure 89 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 16).

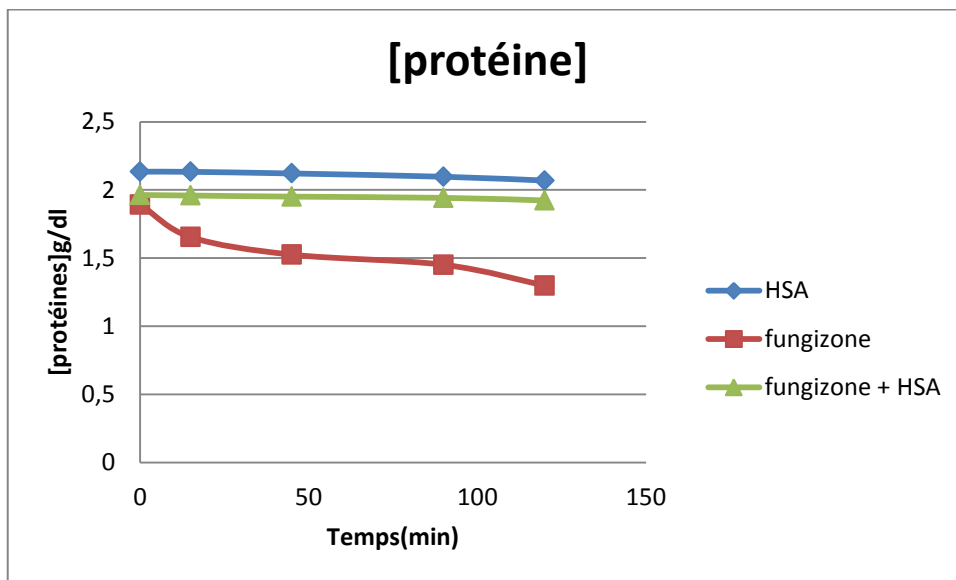


Figure 90 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 16).

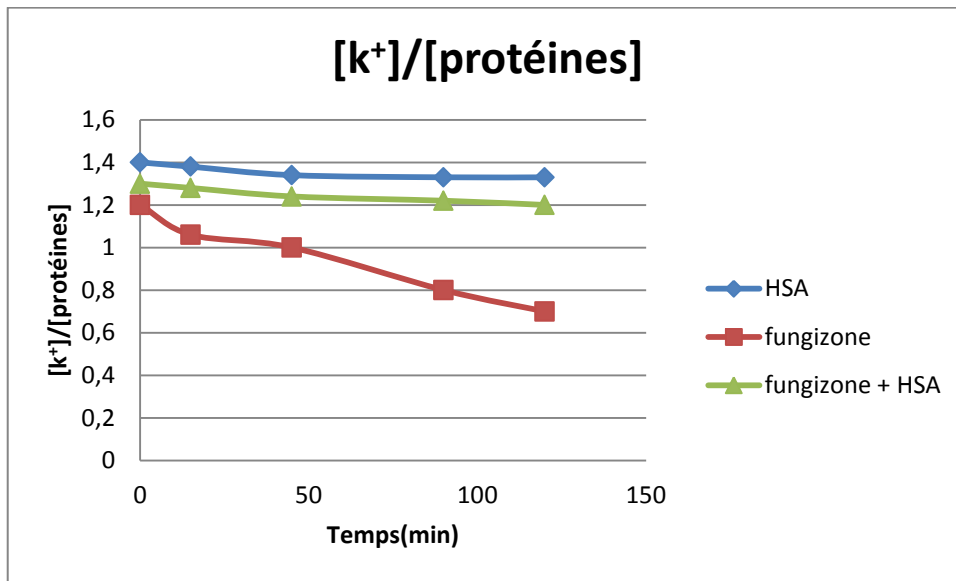


Figure 91: Rapport [k⁺]/ [protéines] (test 16).

Test n°17 (1000 µl)

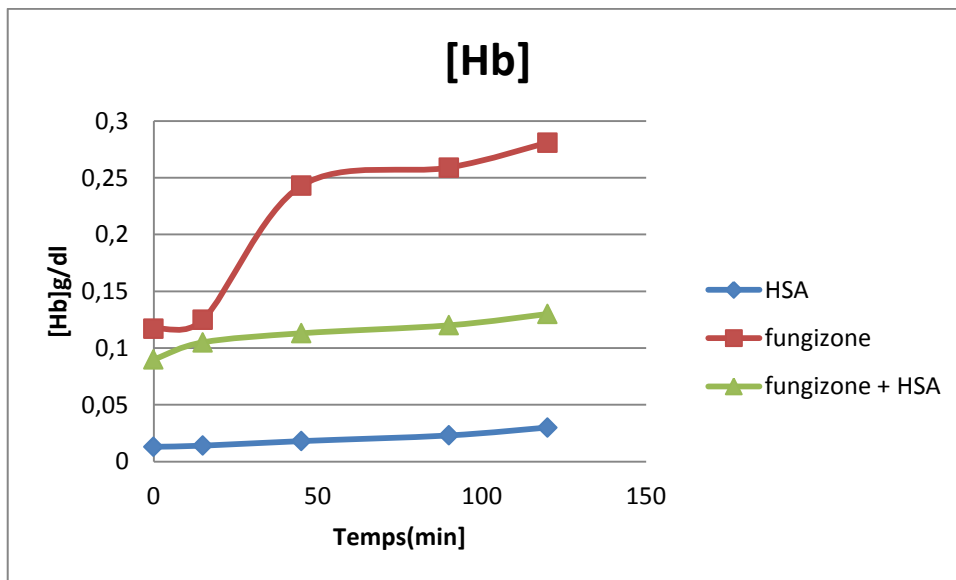


Figure 92: Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 17)

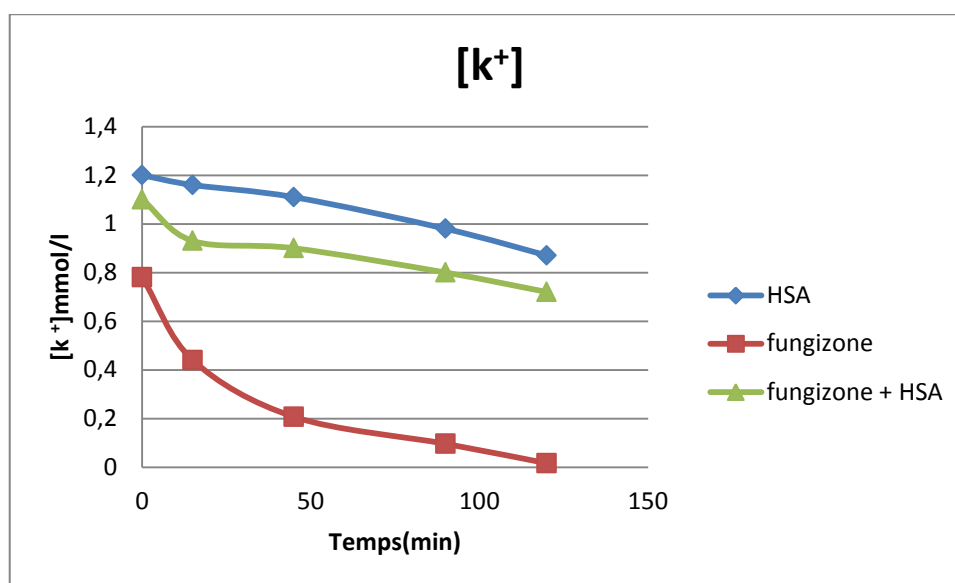


Figure 93 : Effet la fungizone sur [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 17)

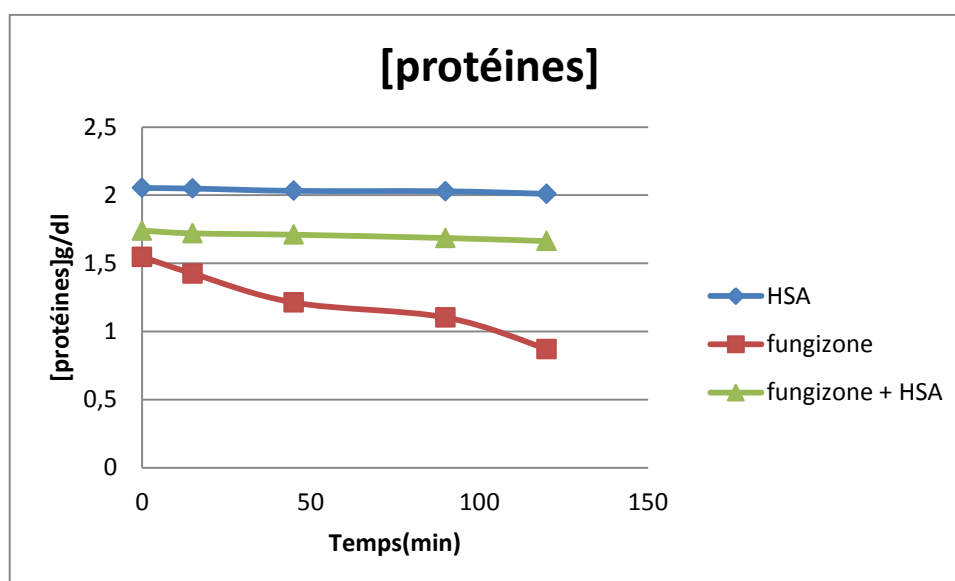


Figure 94: Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 17)

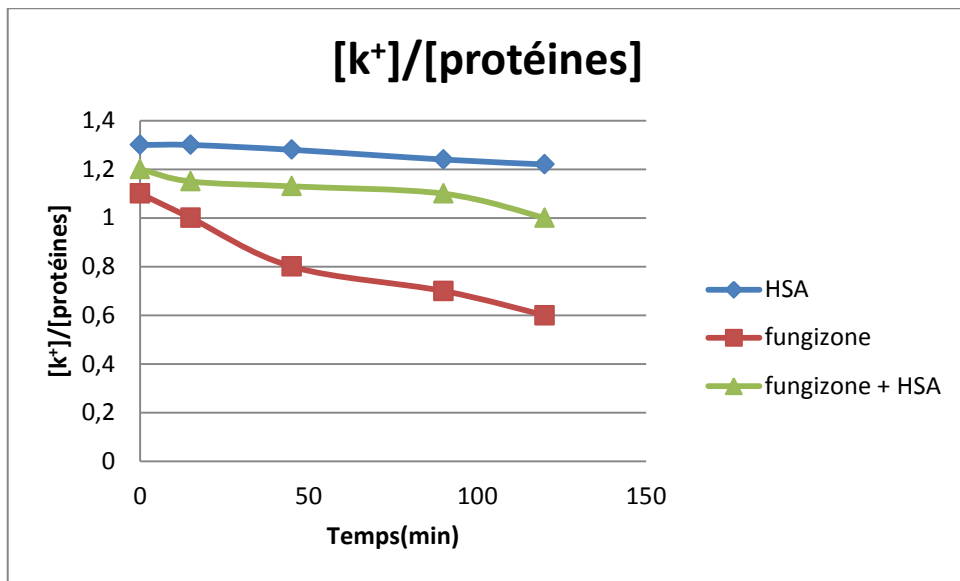


Figure 95: Rapport $[k^+]/[protéines]$ (test 17)

Test n°18 (1000 μ l)

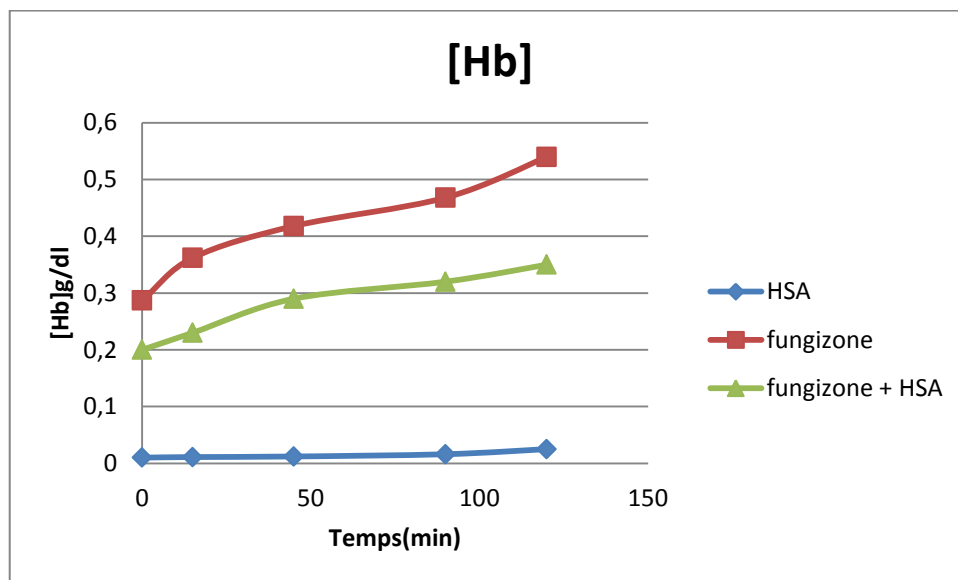


Figure 96 : Effet la fungizone sur $[Hb]$ en présence et en absence de l'HSA (test18)

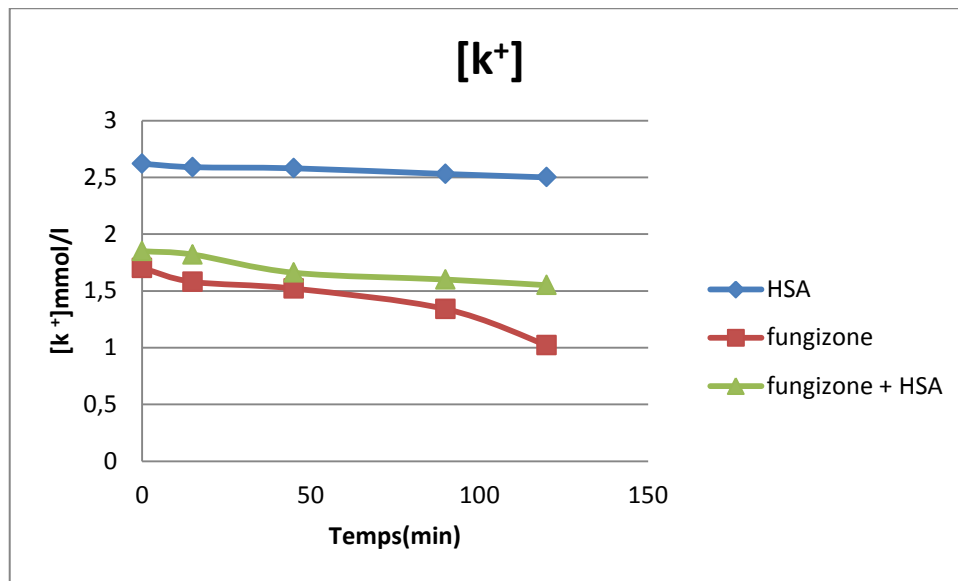


Figure 97 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 18)

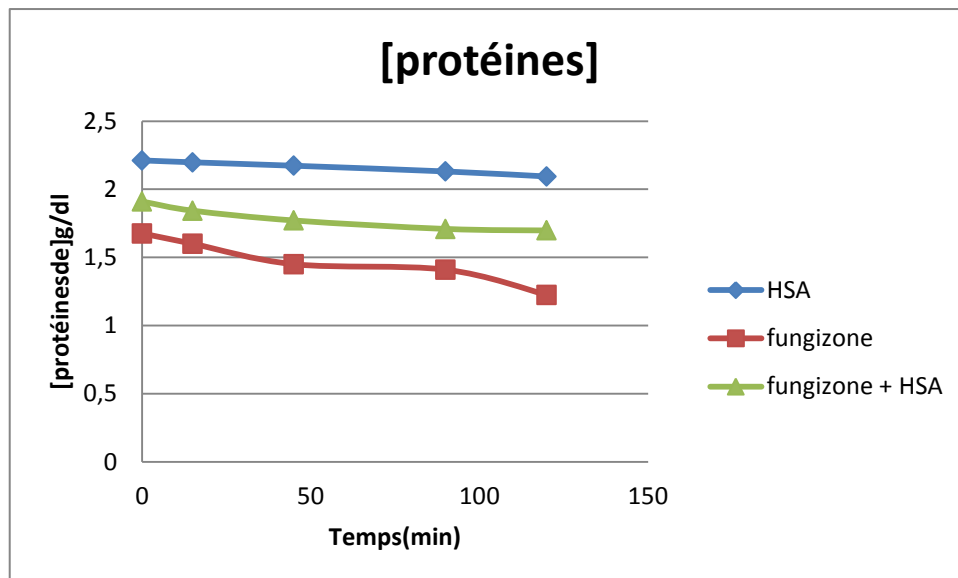


Figure 98 : Effet la fungizone sur $[protéines]$ en présence et en absence de l'HSA (test 18)

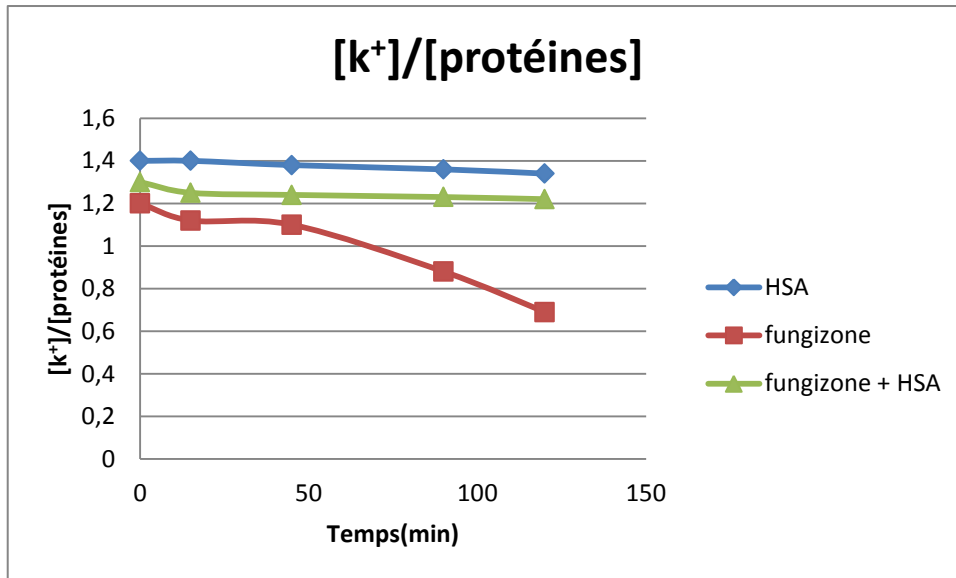


Figure 99: Rapport [k⁺]/ [protéines] (test 18).

Test n°19 (1000 µl)

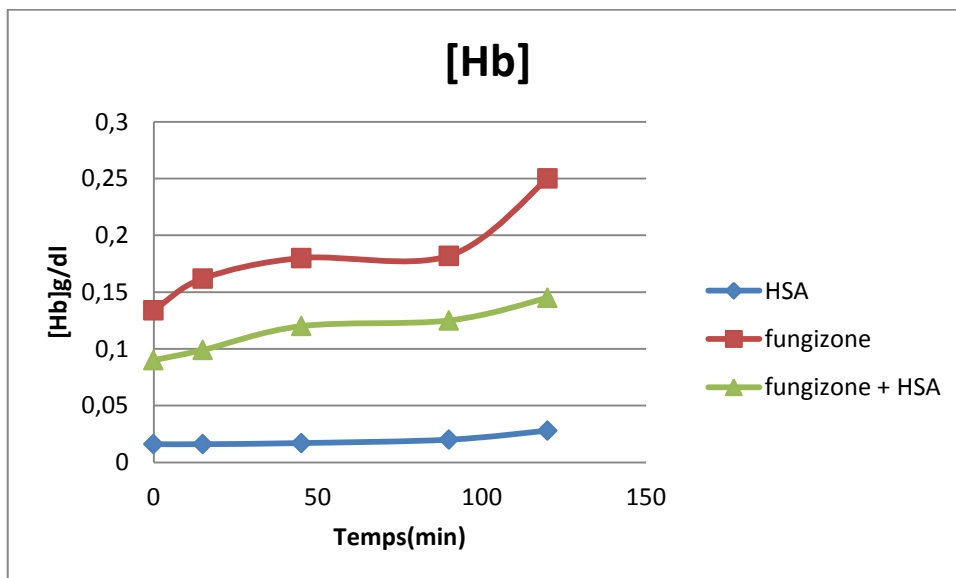


Figure 100 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 19)

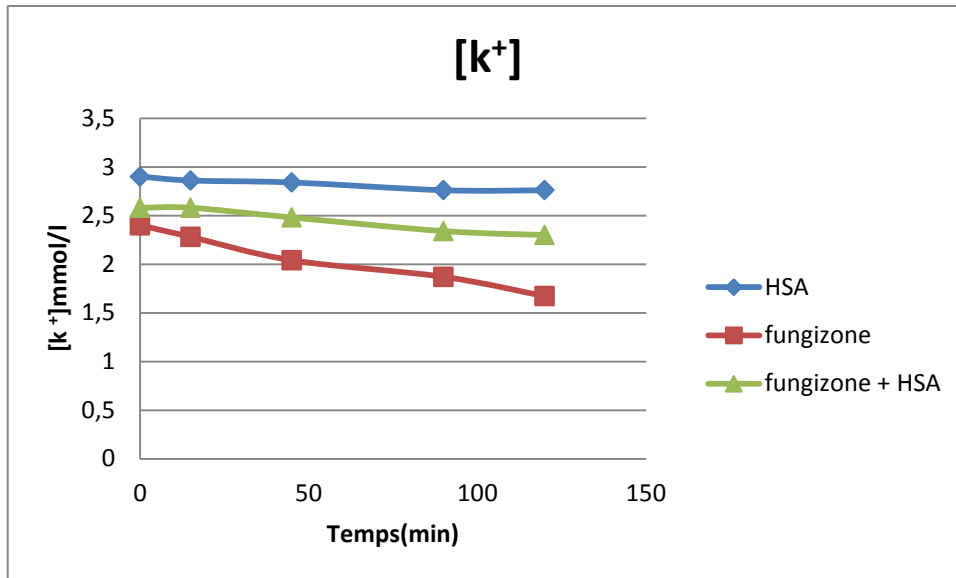


Figure 101 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 19)

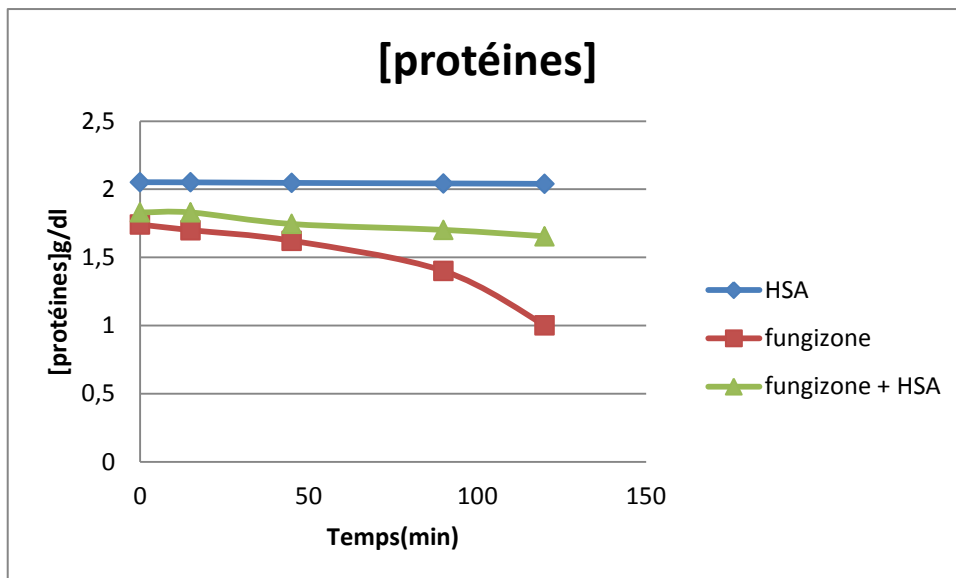


Figure 102 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 19)

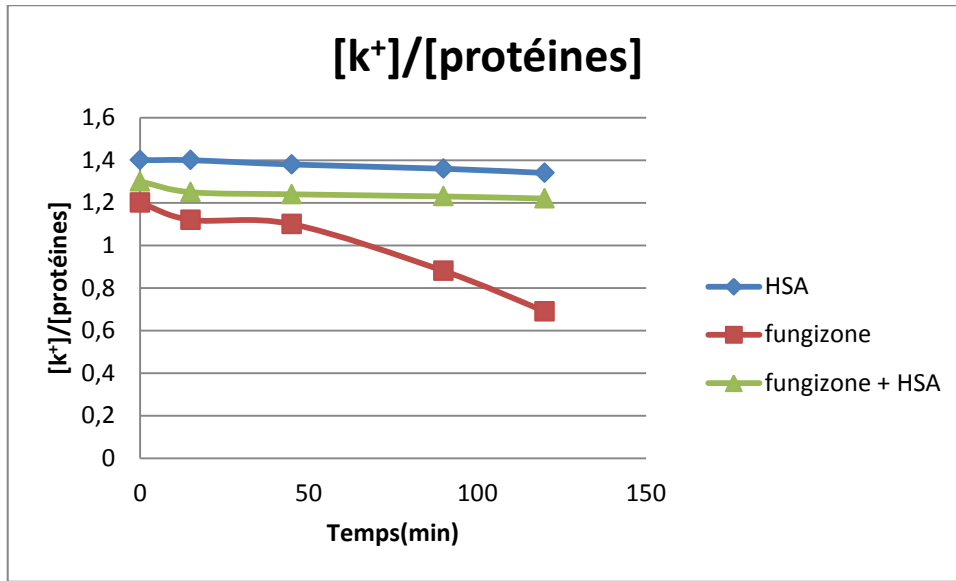


Figure 103: Rapport [k⁺]/ [protéines] (test 19)

Test n°20 (1000 µl)

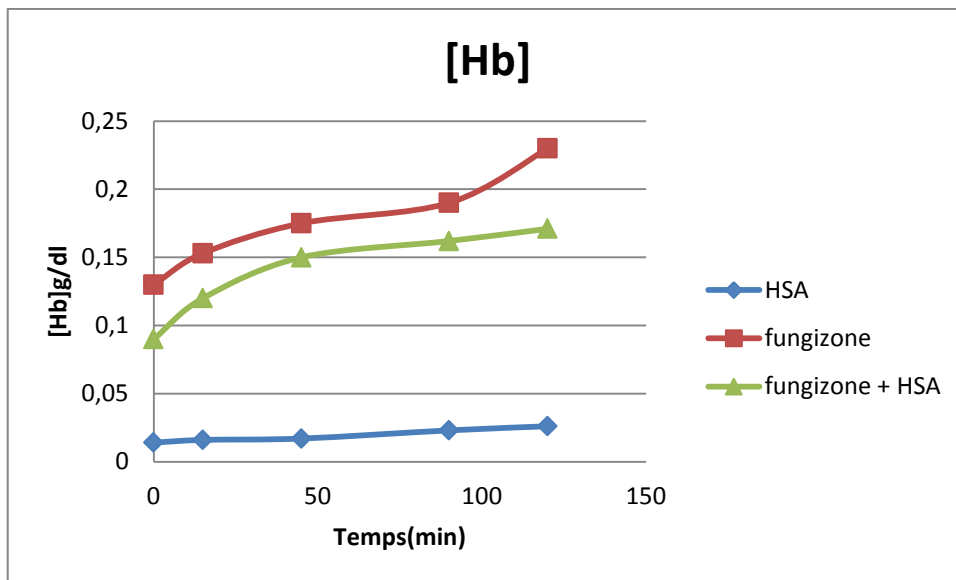


Figure 104 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 20)

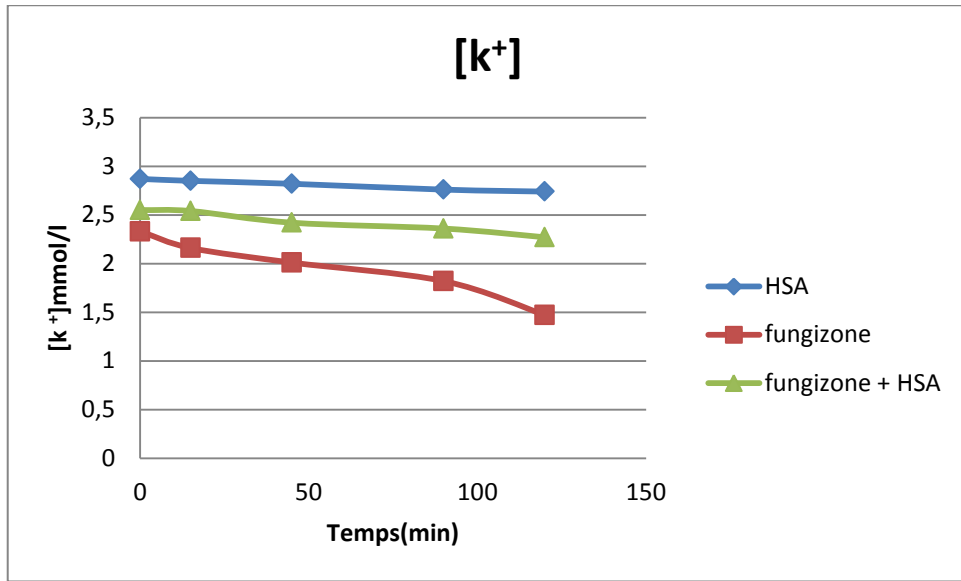


Figure 105 : Effet la fungizone sur [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 20)

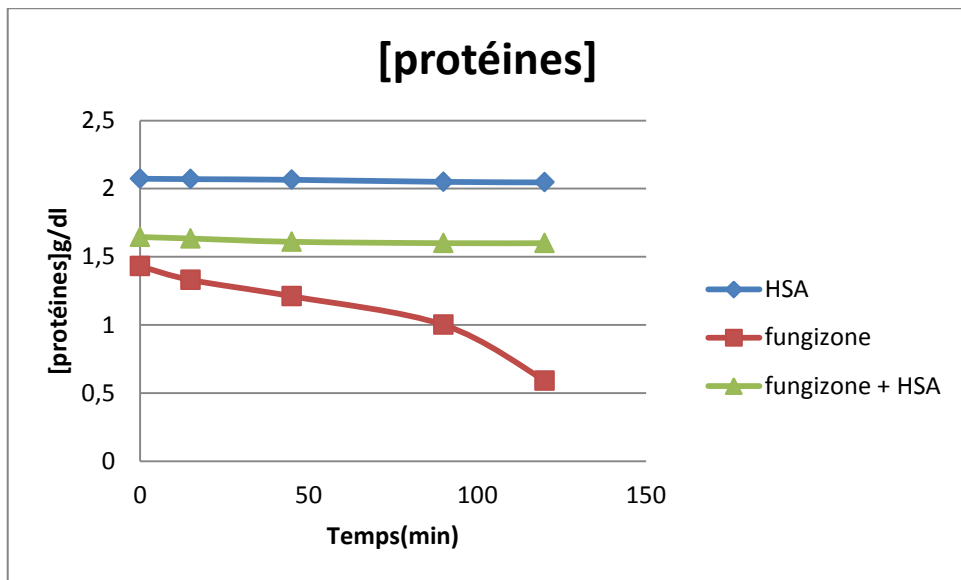


Figure 106 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 20)

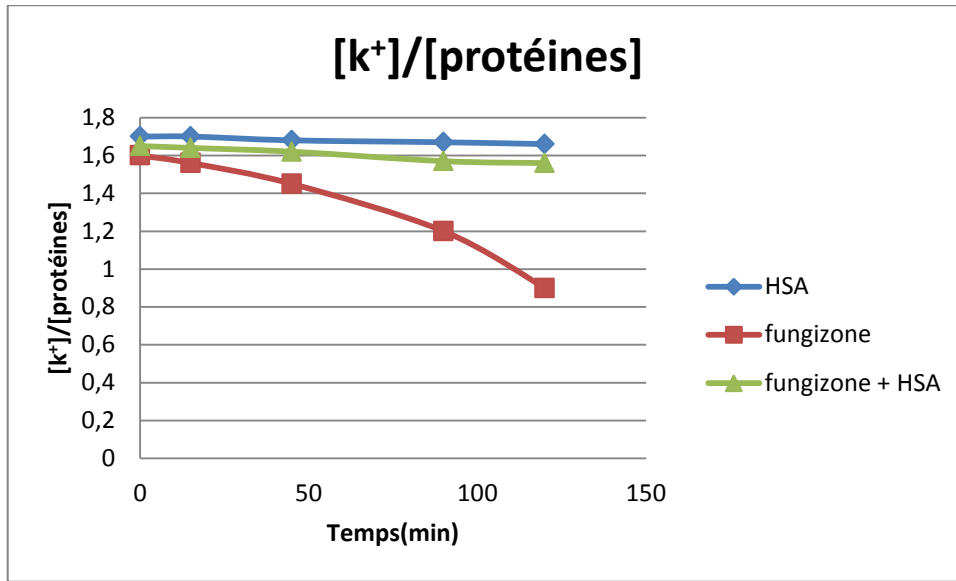


Figure 107: Rapport $[k^+]/[protéines]$ (test 20).

Test n°21 (1000 μ l)

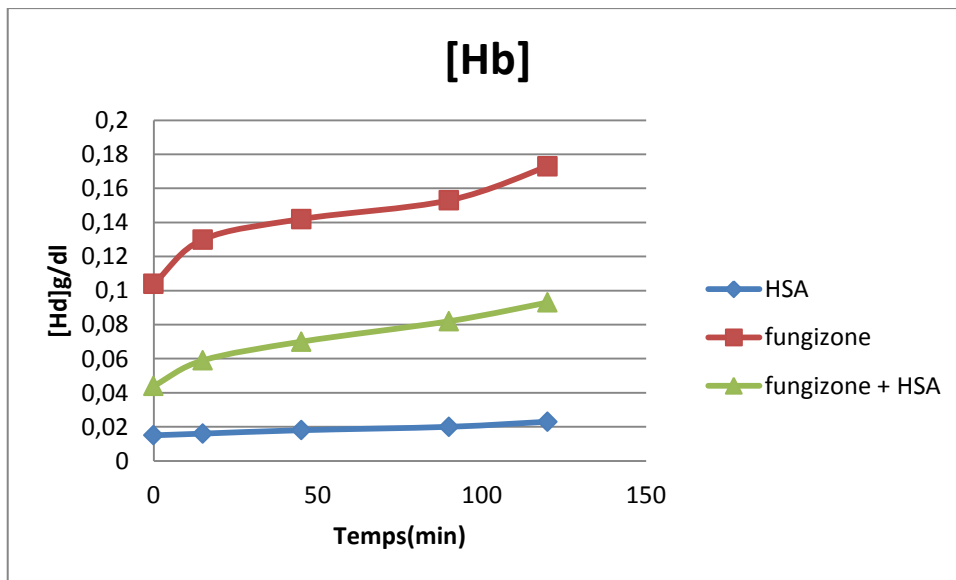


Figure 108 :Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 21)

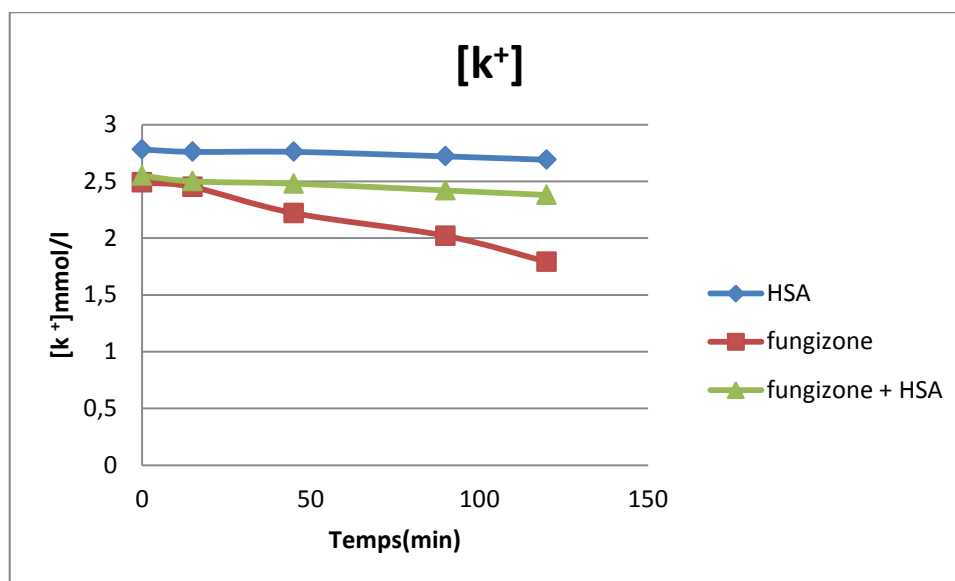


Figure 109 : Effet la fungizone sur [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 21)

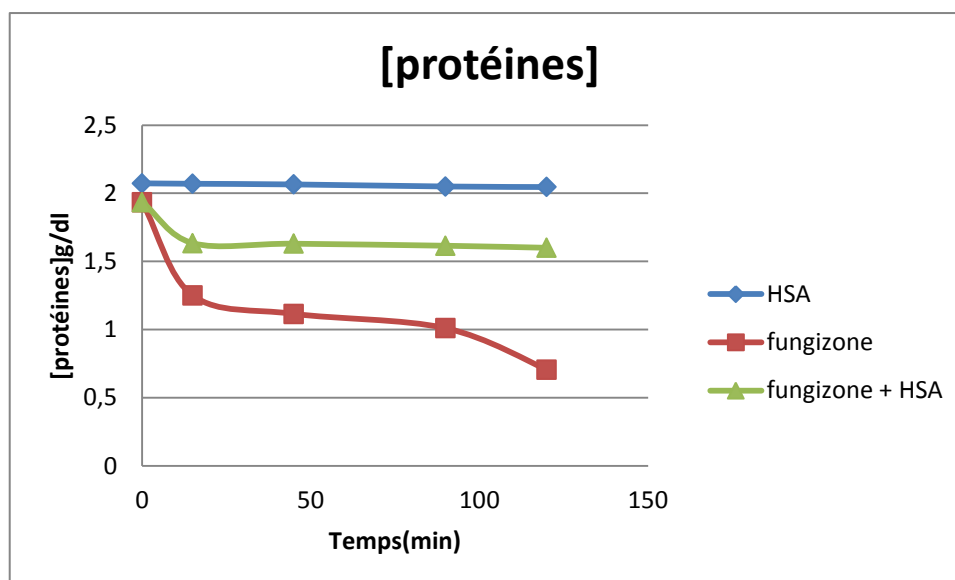


Figure 110 : Effet de la fungizone sur [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 21)

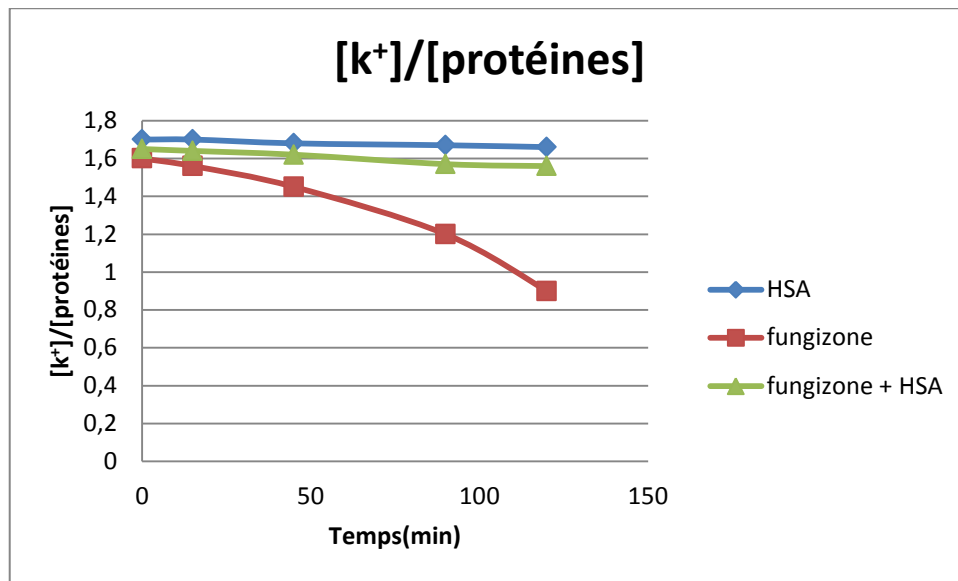


Figure 111: Rapport [k⁺]/ [protéines] (test 21).

1.1 Pré incubation de fungizone avec l'albumine

Test n°22 (500 µl)

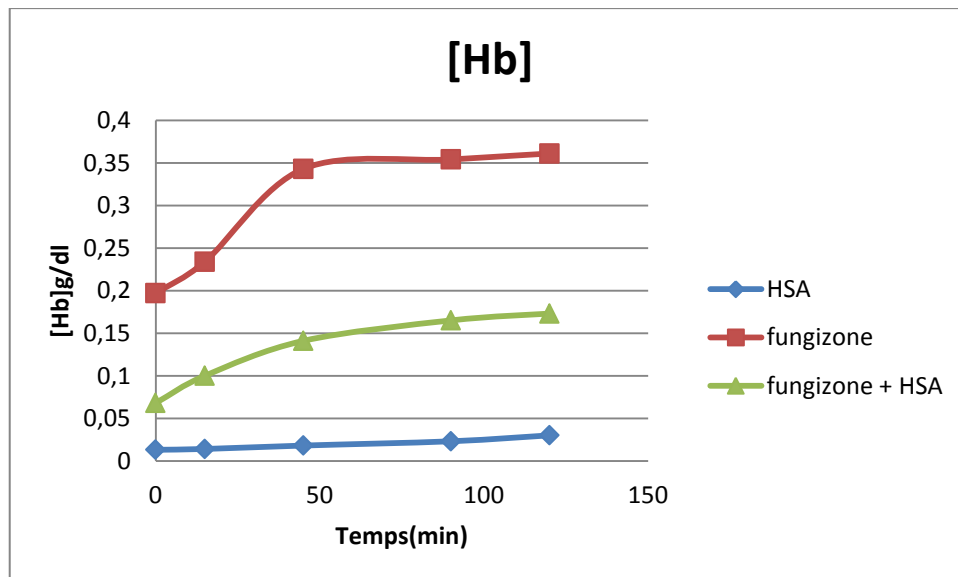


Figure 112 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 22)

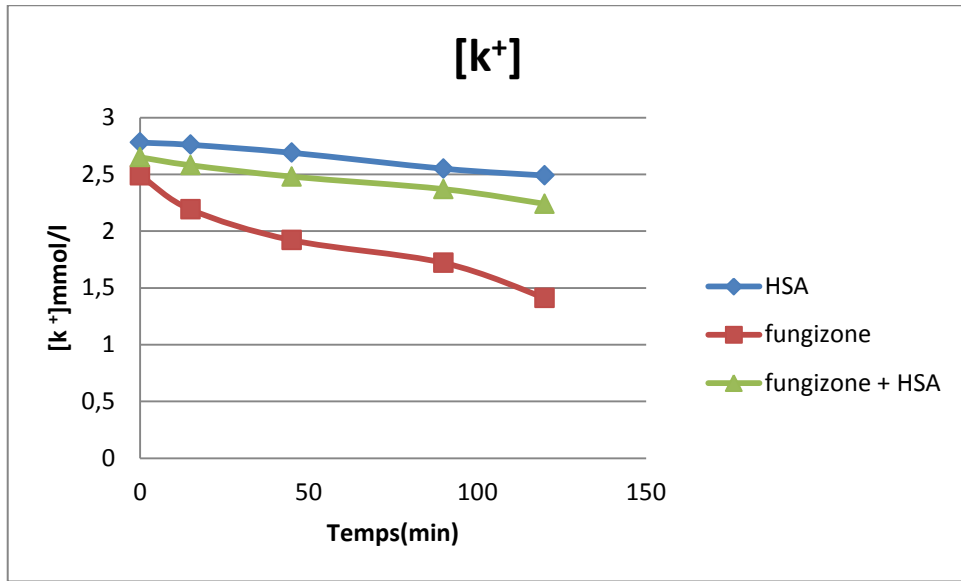


Figure 113 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 22)

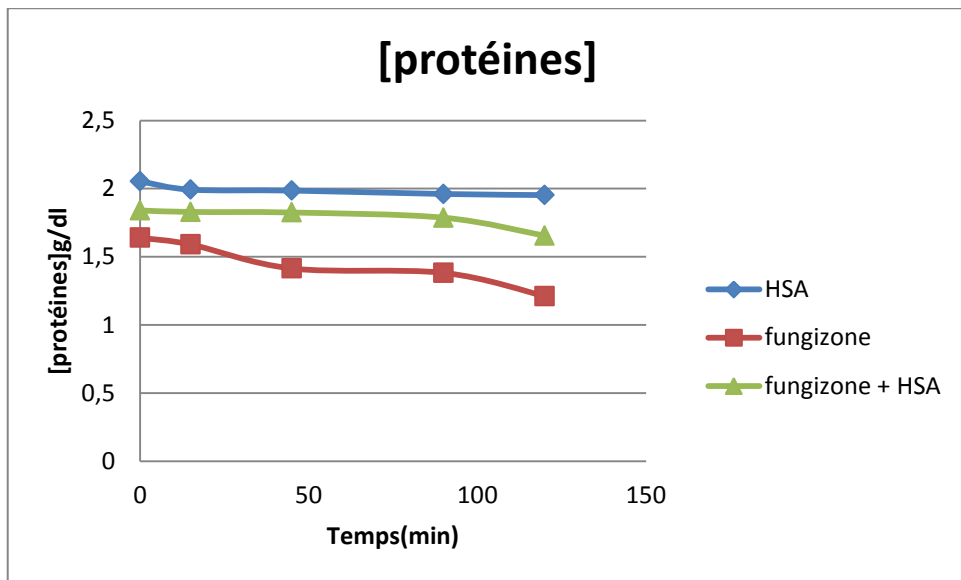


Figure 114 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 22)

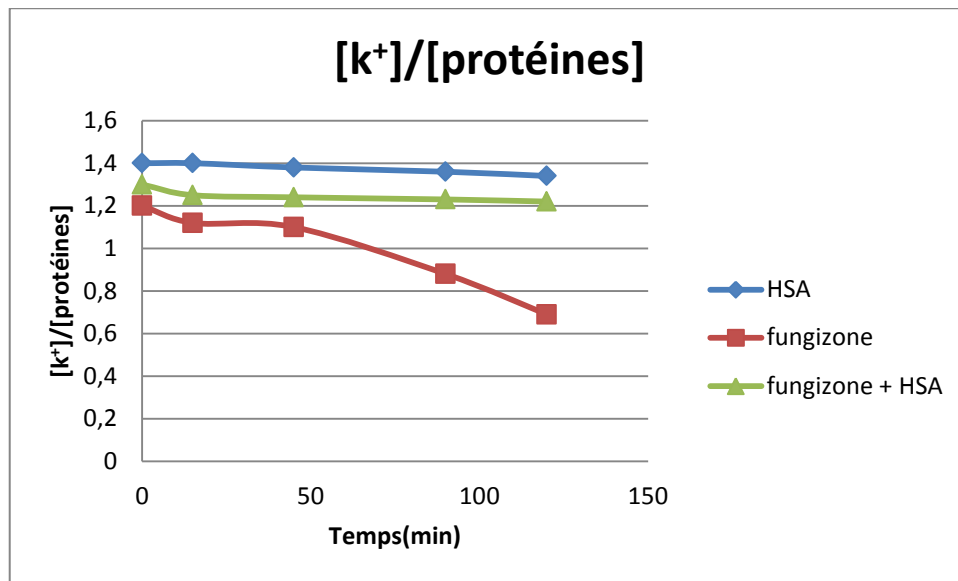


Figure 115 :Rapport $[k^+]/ [protéines]$ (test 22)

Test n°23 (500 μ l)

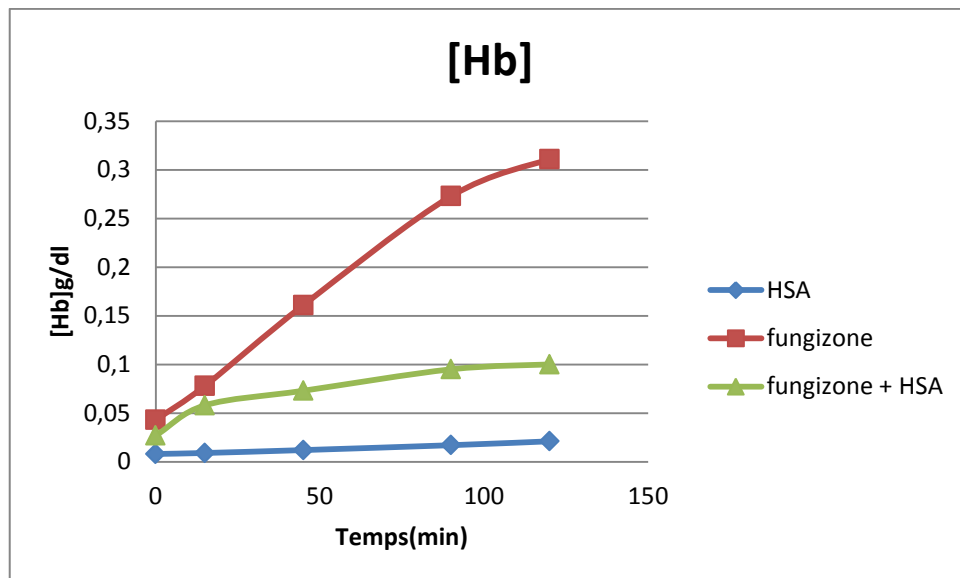


Figure 116 : Effet la fungizone sur $[Hb]$ en présence et en absence de l'HSA (test 23)

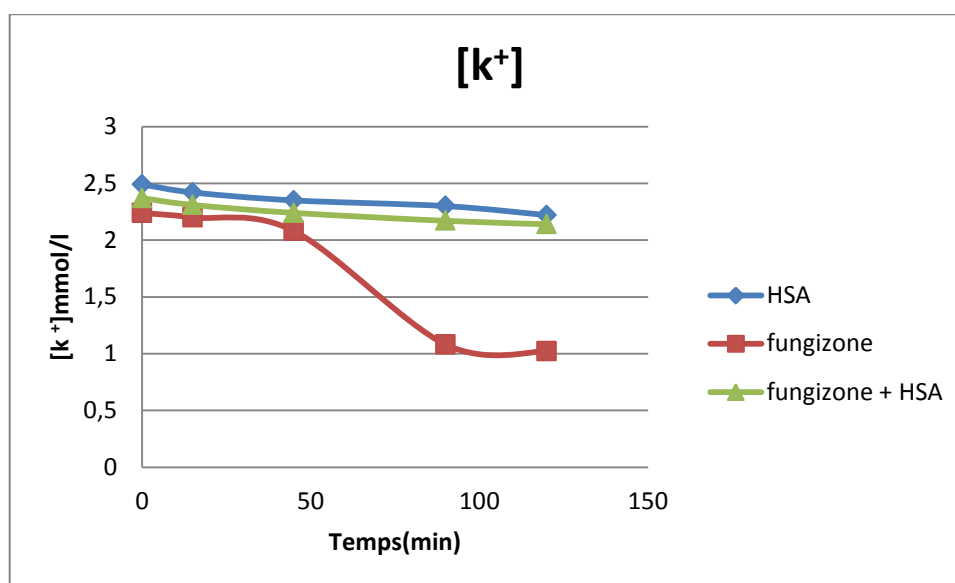


Figure 117 : Effet la fungizone sur [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 23)

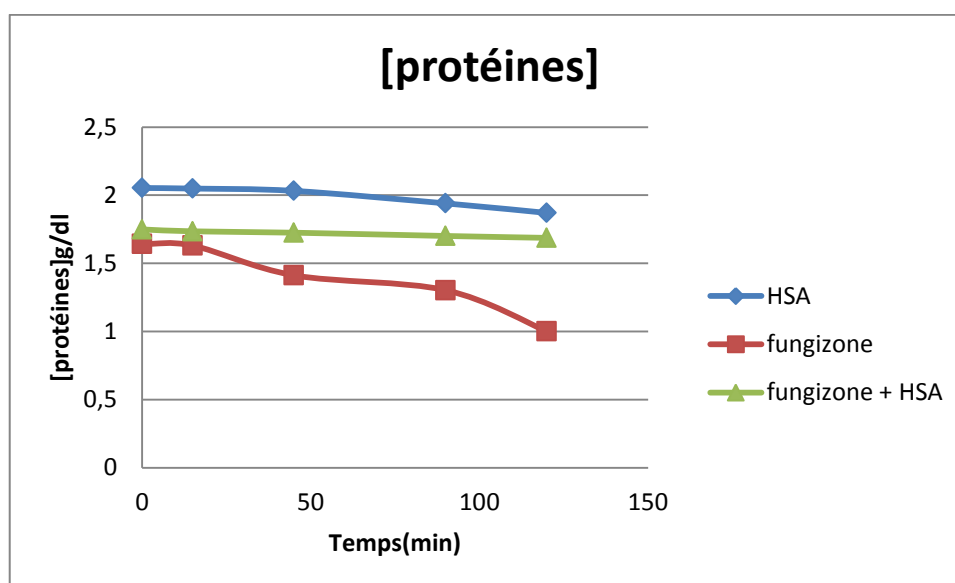


Figure 118 :Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 23).

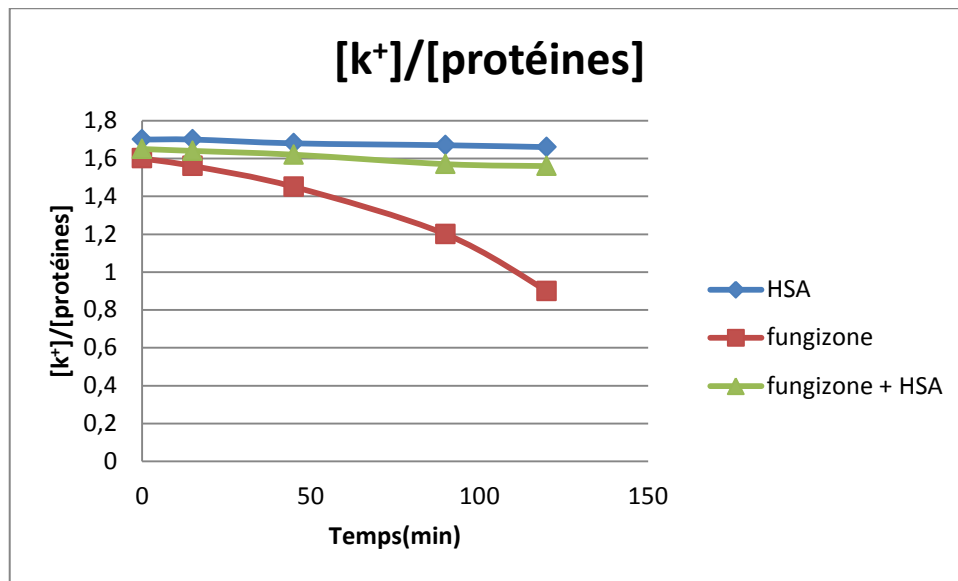


Figure 119 :Rapport $[k^+]/ [protéines]$ (test 23)

Test n°24 (500 μ l)

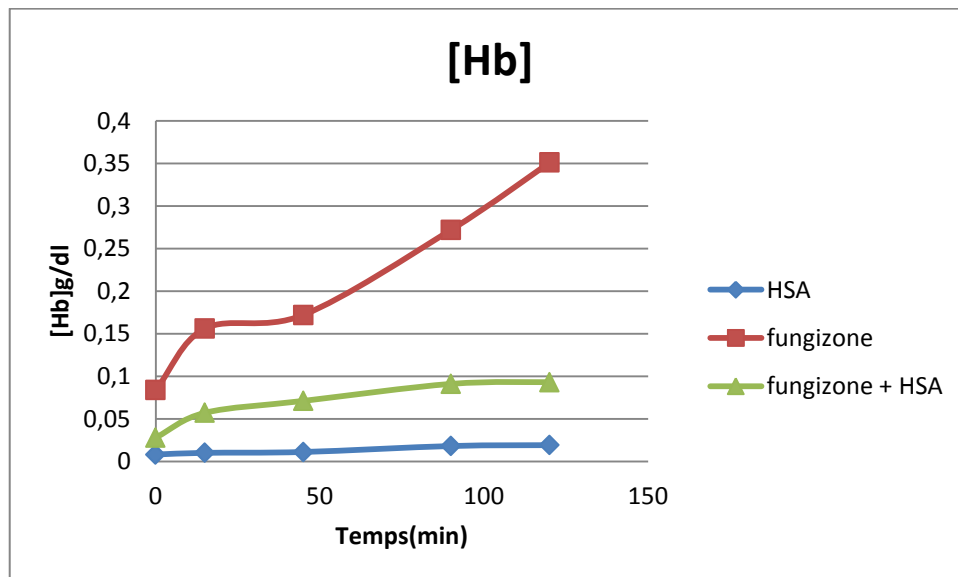


Figure 120 : Effet la fungizone sur $[Hb]$ en présence et en absence de l'HSA (test 24)

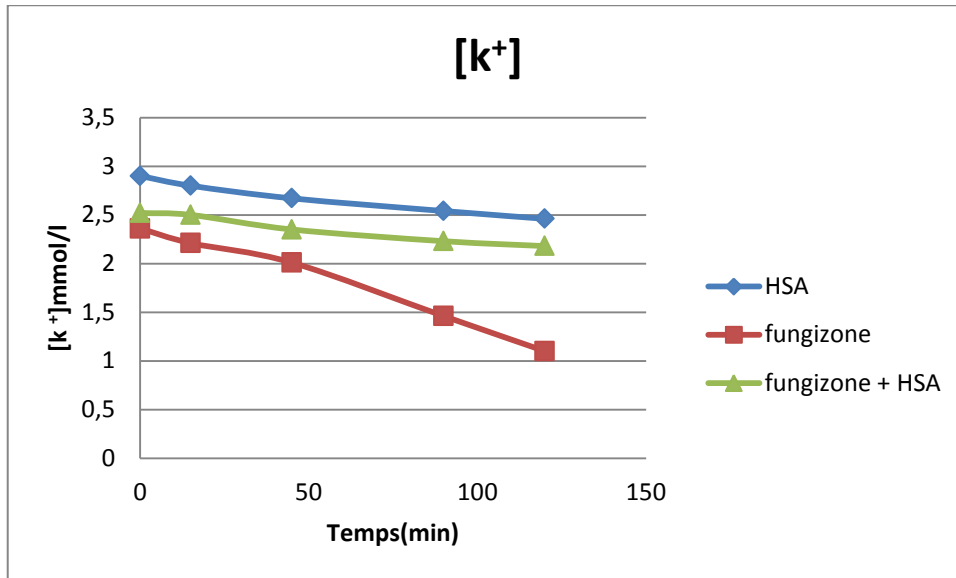


Figure 121 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 24)

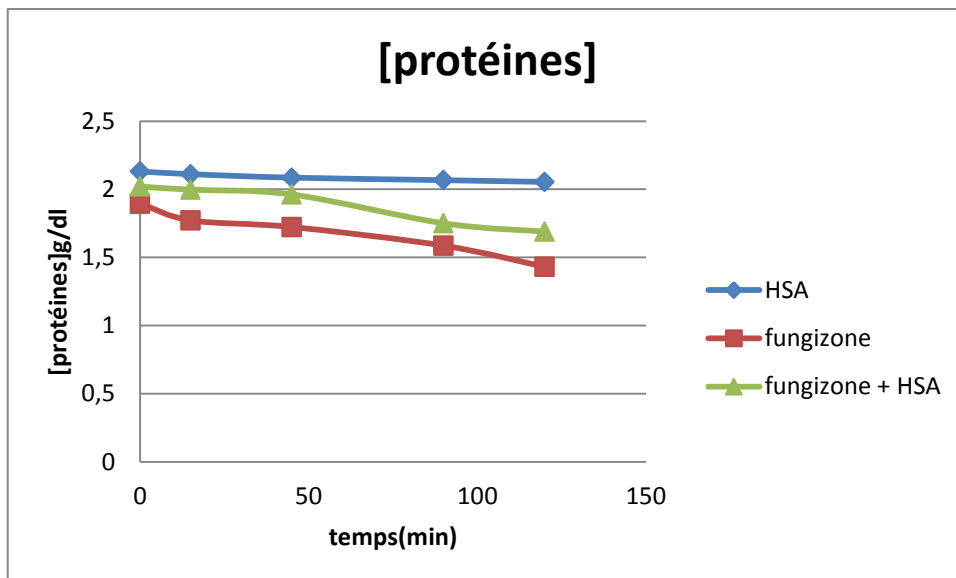


Figure 122 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 24)

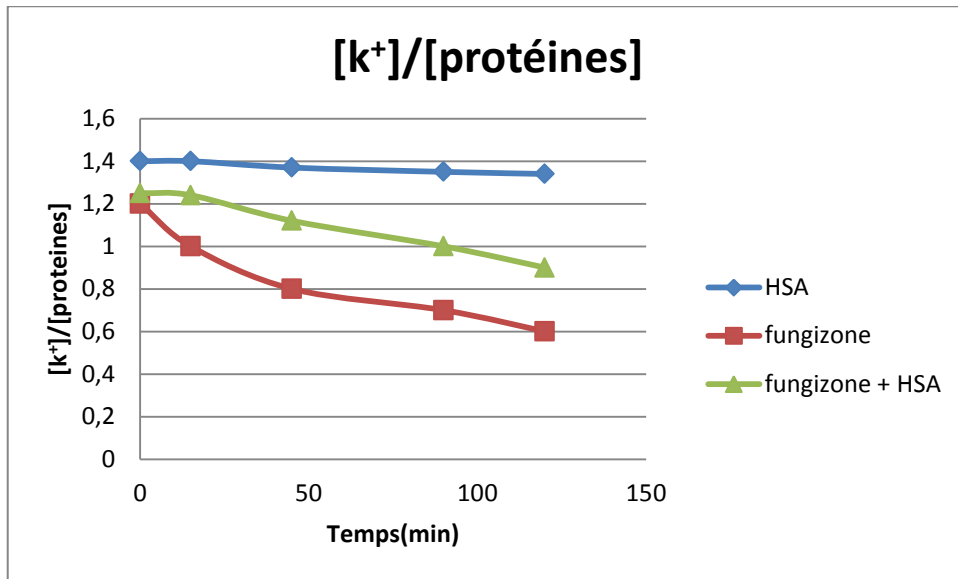


Figure 123 : Rapport [k⁺]/ [protéines] (test 24)

Test n°25 (500 µl)

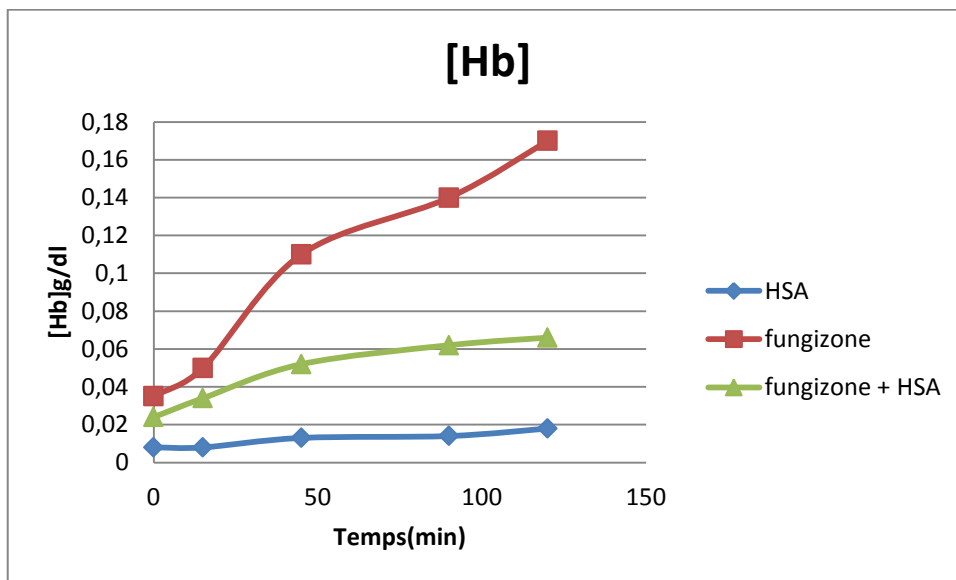


Figure 124 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 25).

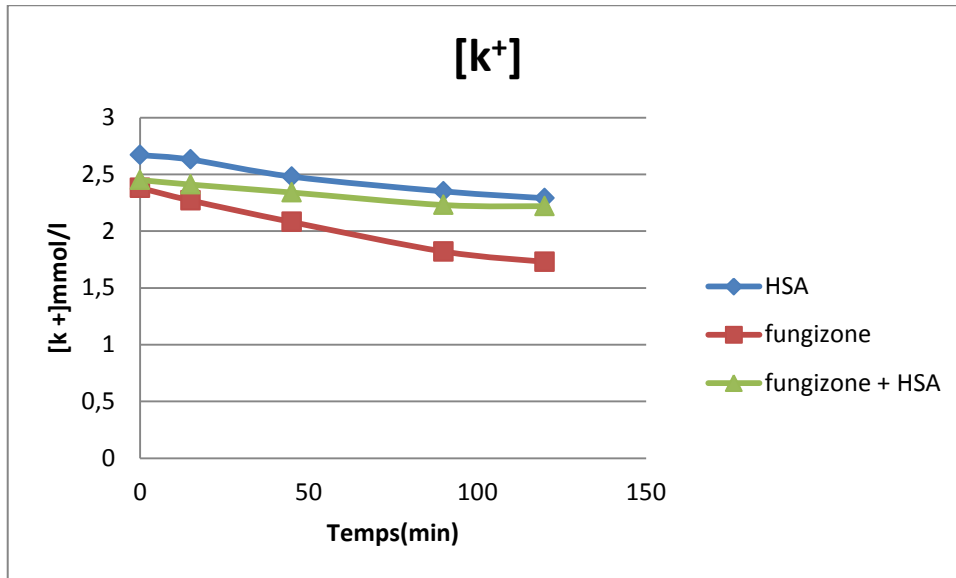


Figure 125 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 25)

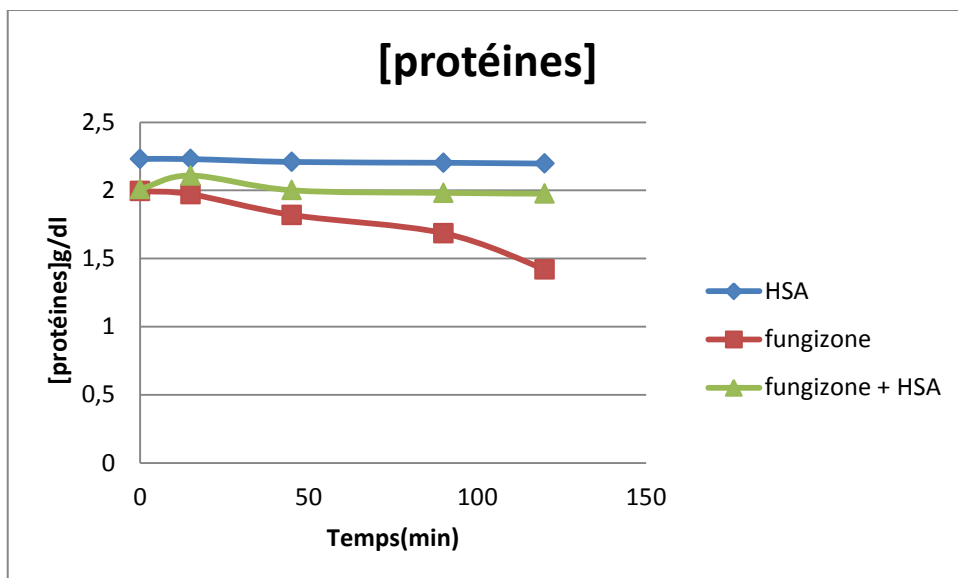


Figure 126 : Effet la fungizone sur $[protéines]$ en présence et en absence de l'HSA (test 25)

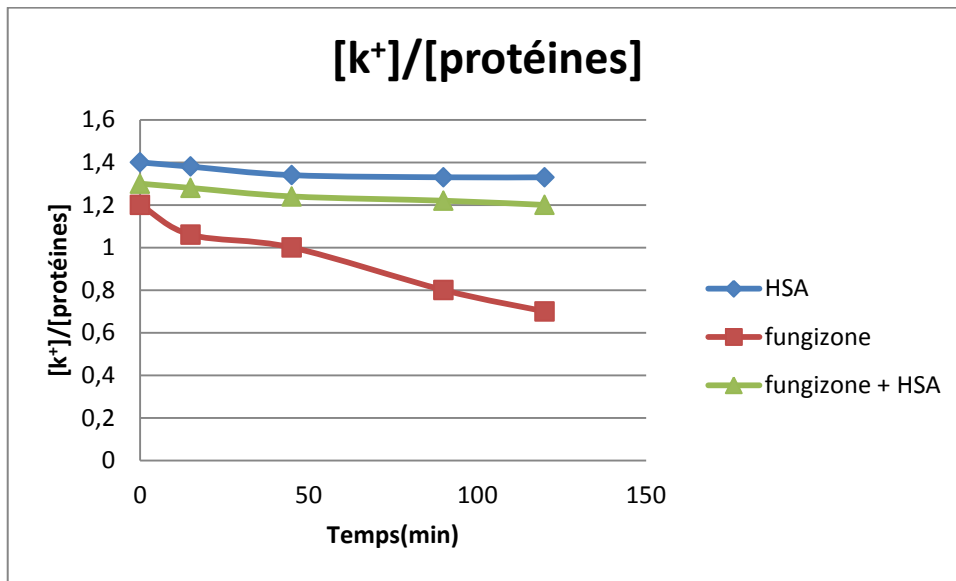


Figure 127: Rapport $[k^+]/[protéines]$ (test 25)

Test n°26 (500 μ l)

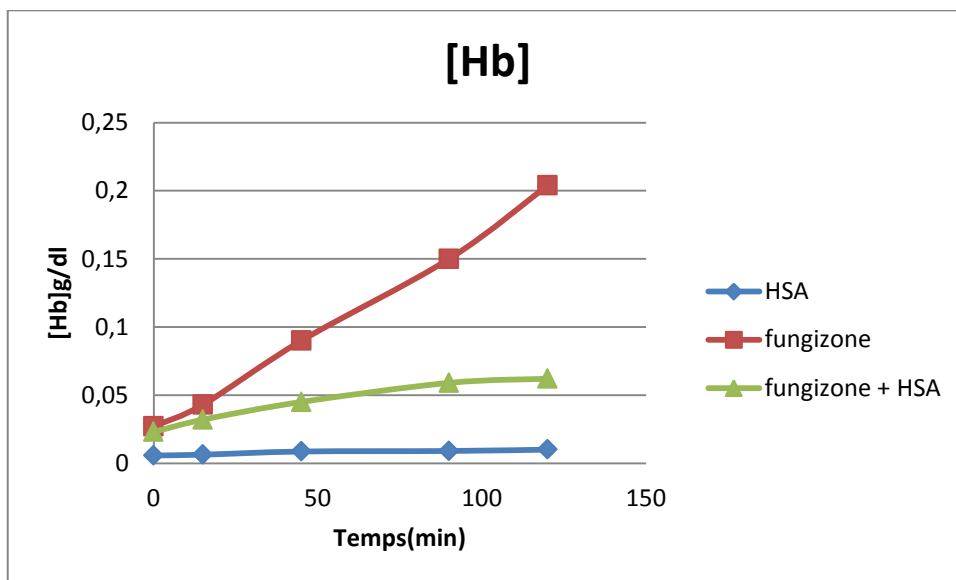


Figure 128 : Effet la fungizone sur $[Hb]$ en présence et en absence de l'HSA (test 26)

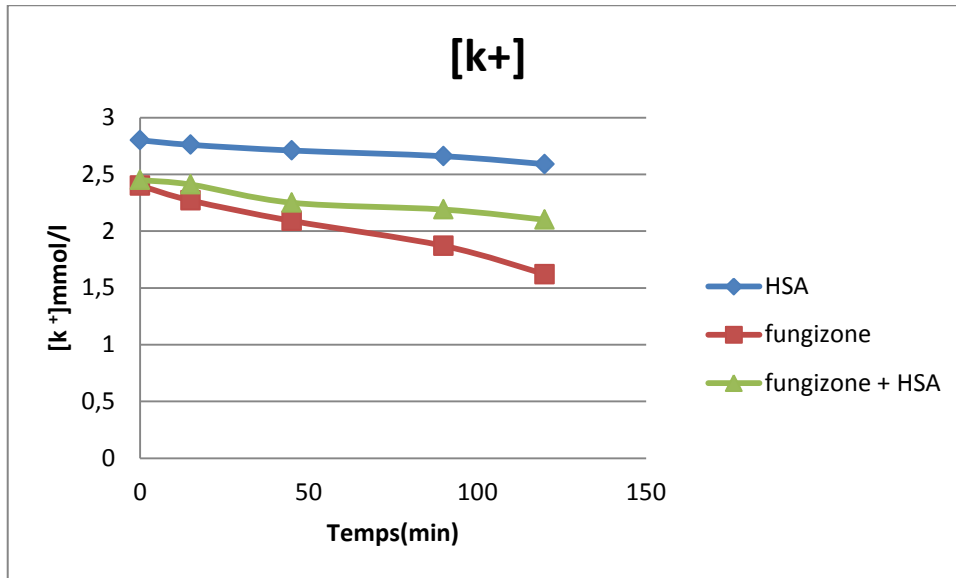


Figure 129 : Effet la fungizone sur [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 26)

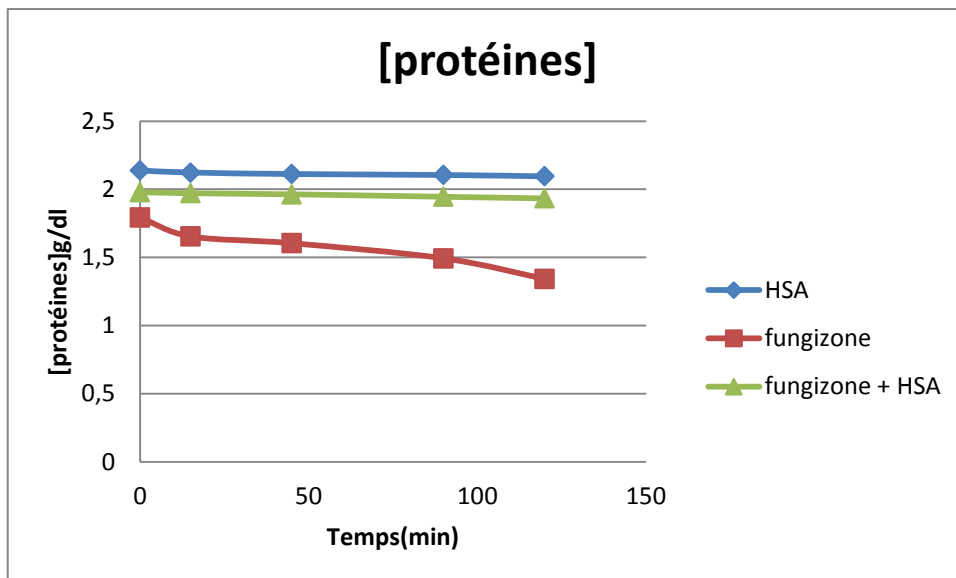


Figure 130 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 26)

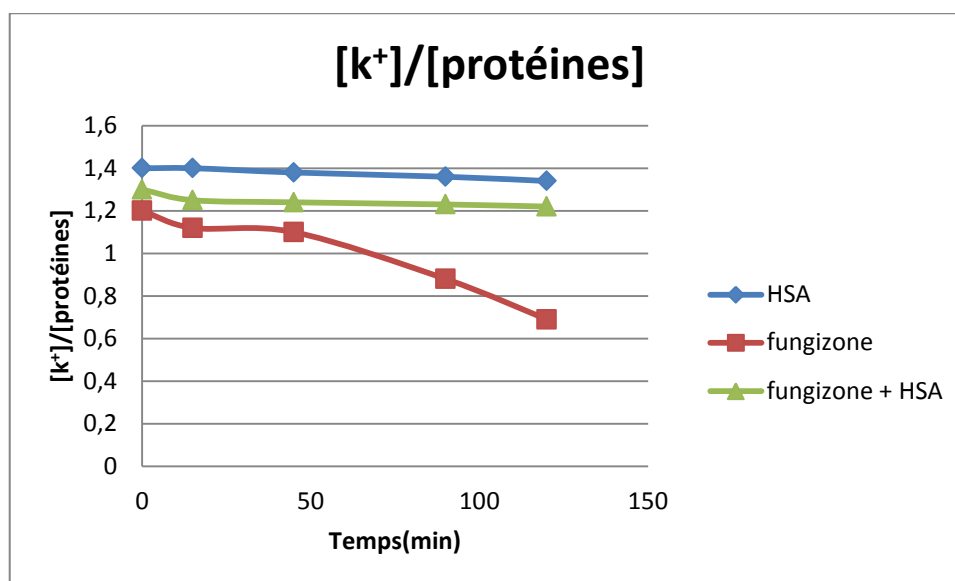


Figure 131 : Rapport $[k^+]/[protéines]$ (test 26)

Test n°27 (1000 μ l)

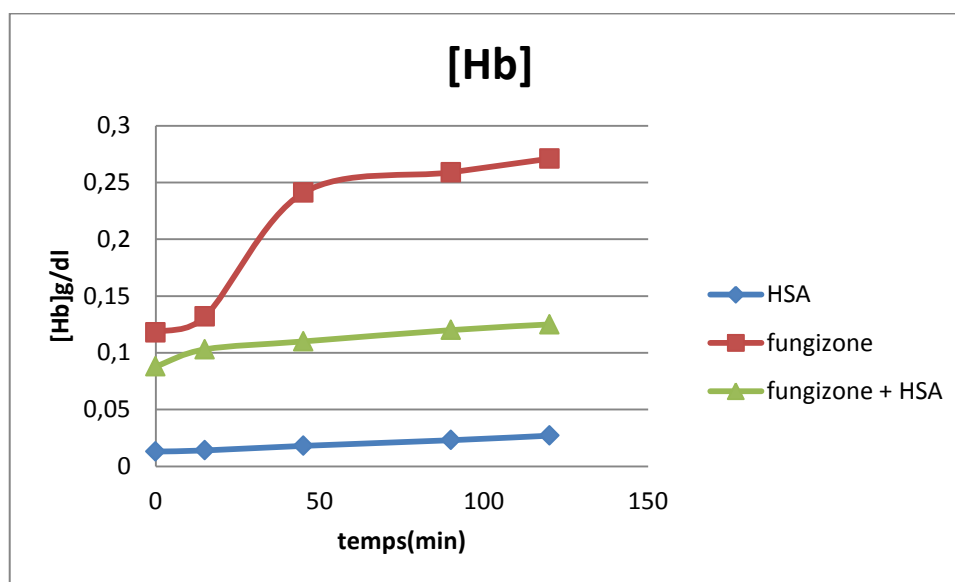


Figure 132 : Effet la fungizone sur $[Hb]$ en présence et en absence de l'HSA (test 27)

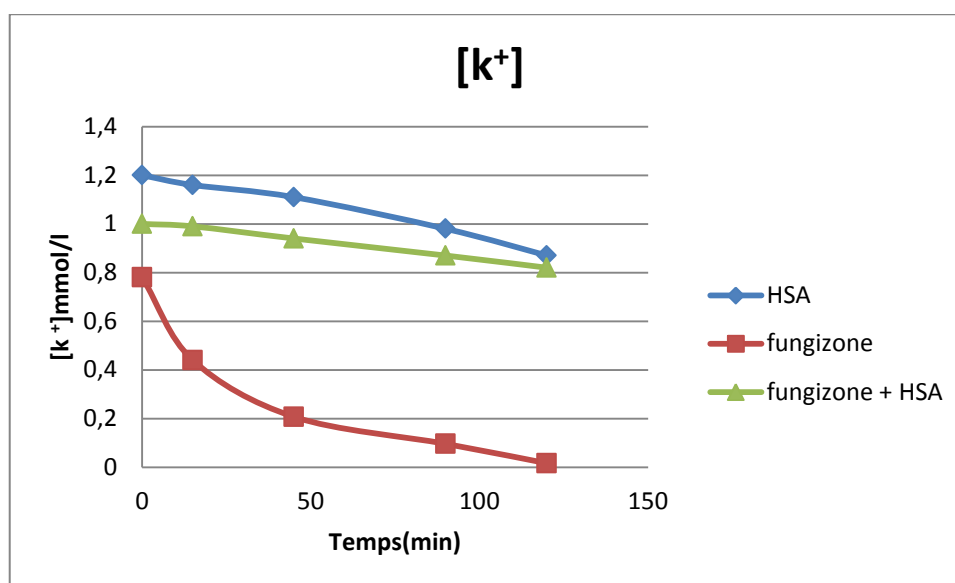


Figure 133: Effet la fungizone sur [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 27)

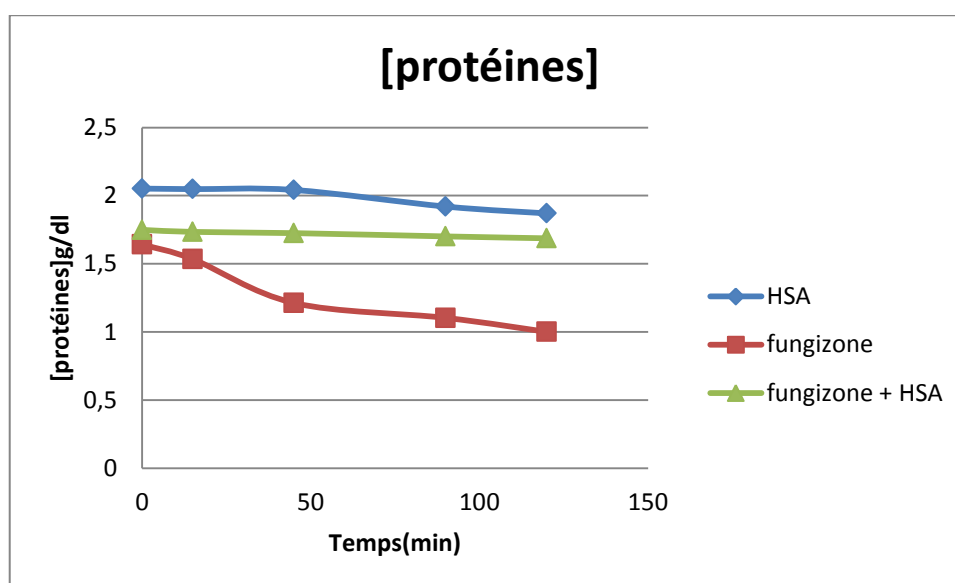


Figure 134 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 27)

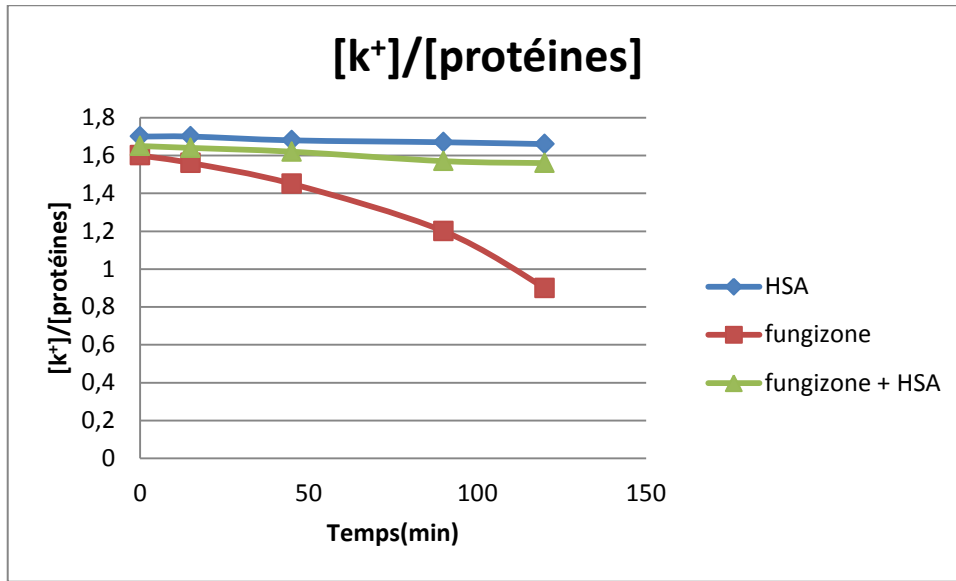


Figure 135 :Rapport $[k^+]/[protéines]$ (test 27)

Test n°28(1000 μ l)

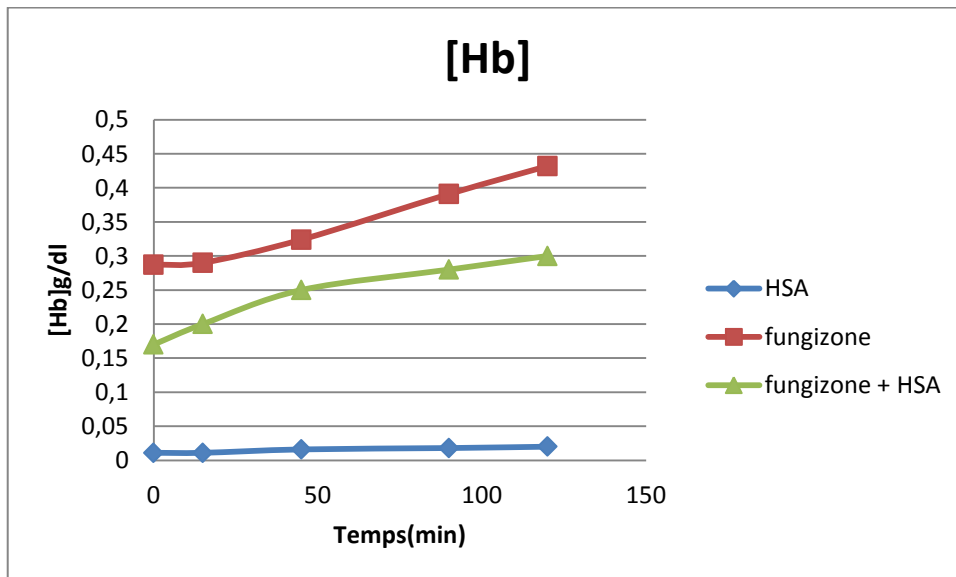


Figure 136 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 28)

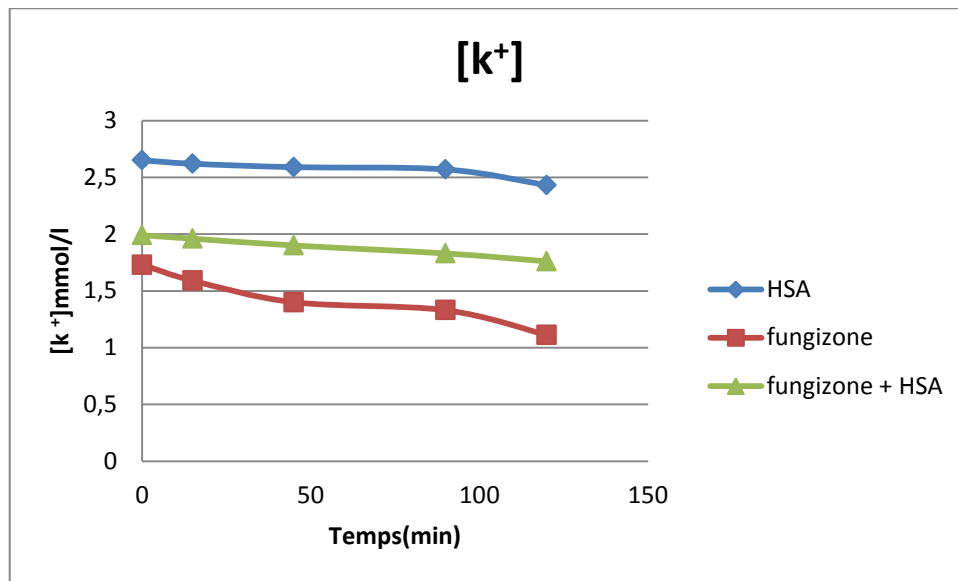


Figure 137 : Effet la fungizone sur [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 28)

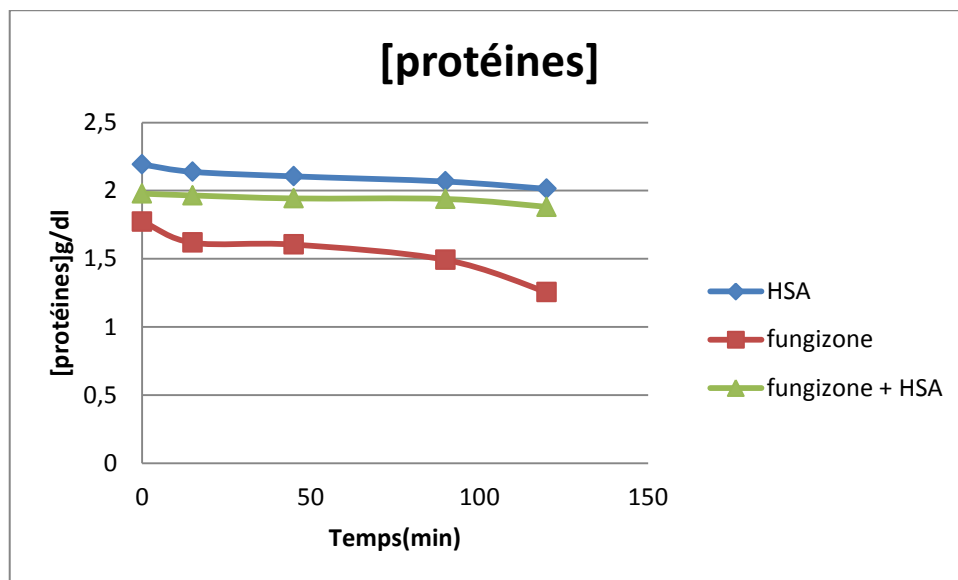


Figure 138 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 28)

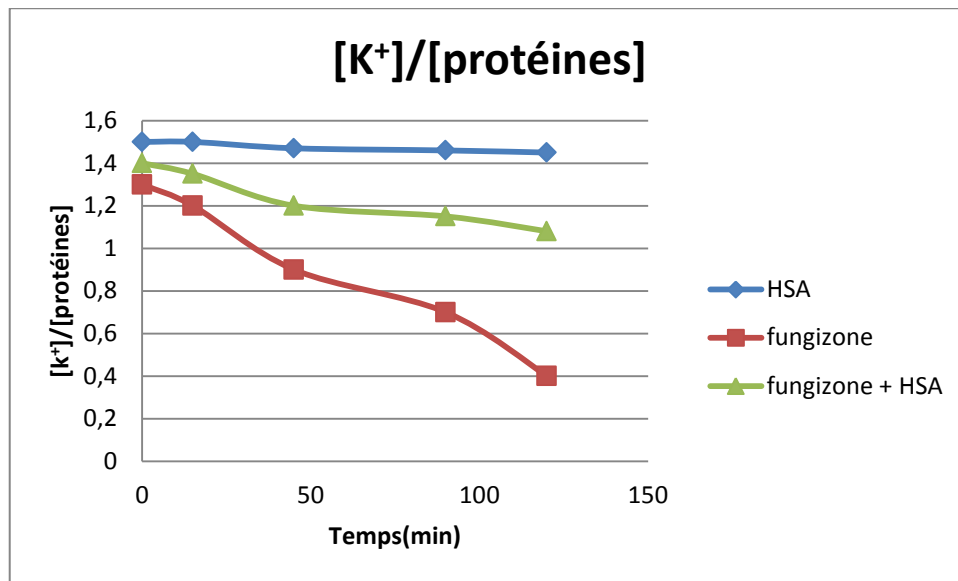


Figure 139 : Rapport $[k^+]/[protéines]$ (test 28)

Test n° 29 (1000 μ l)

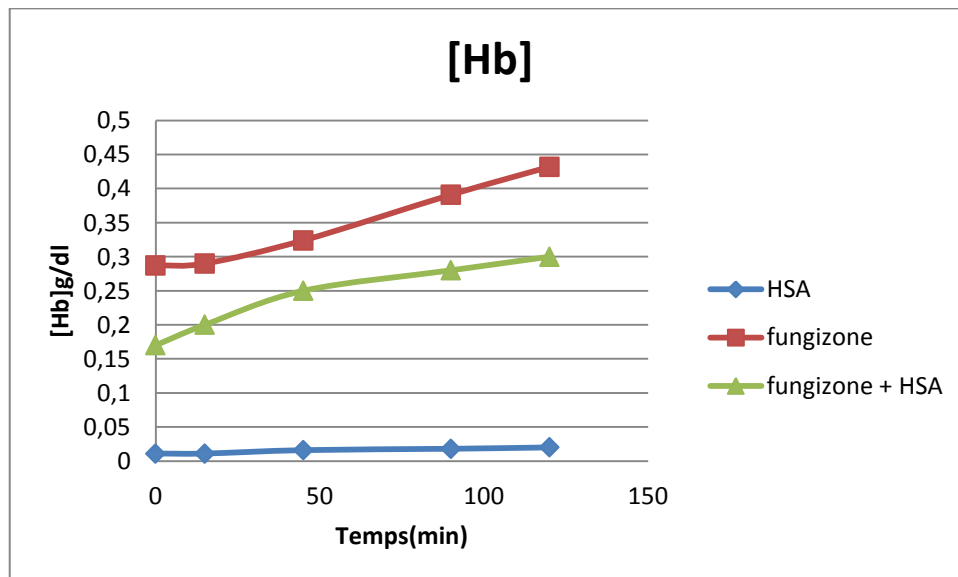


Figure 140 : Effet de la fungizone sur $[Hb]$ en présence et en absence de l'HSA (test 29)

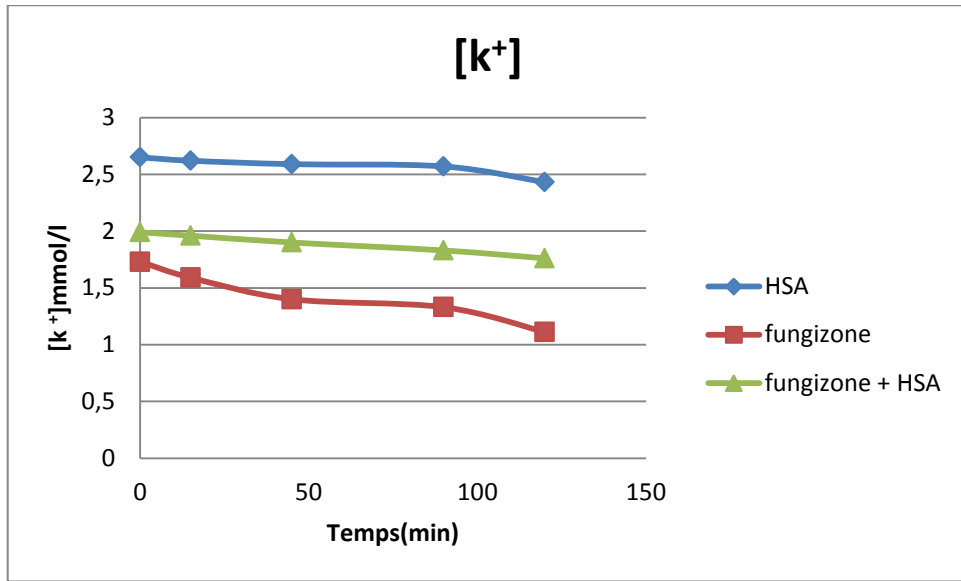


Figure 141 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 29)

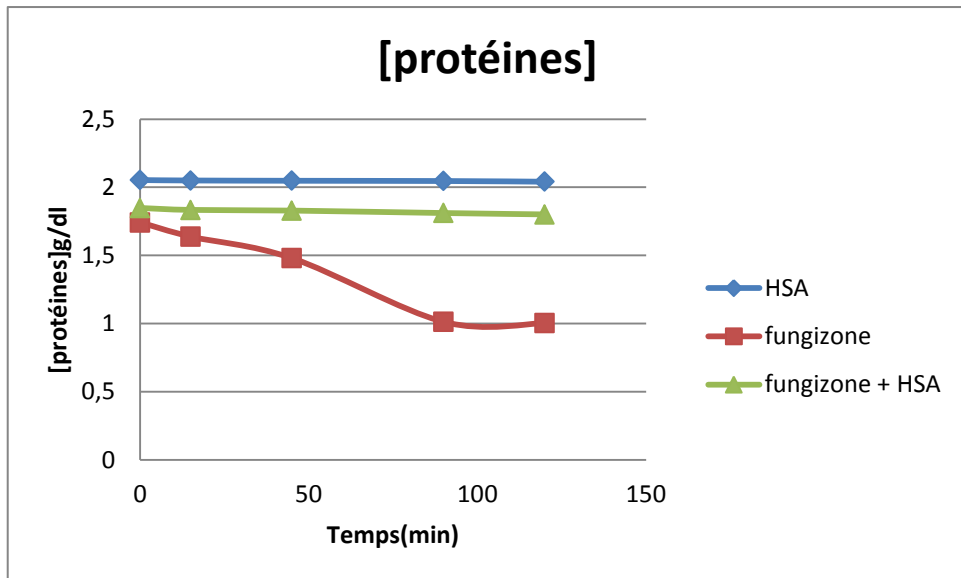


Figure 142 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 29)

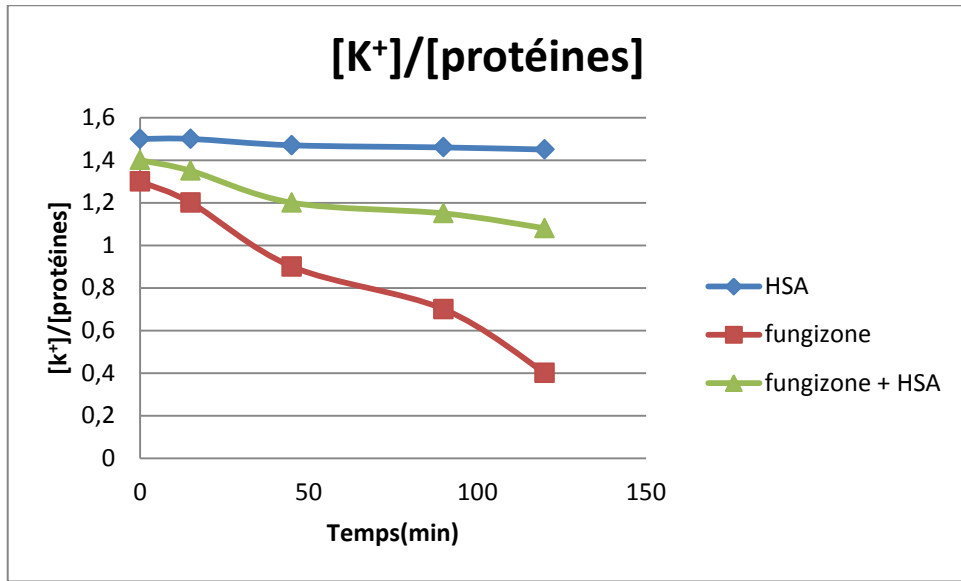


Figure 143 : Rapport [k⁺] / [protéines] (test 29)

Test n°30 (1000 µl)

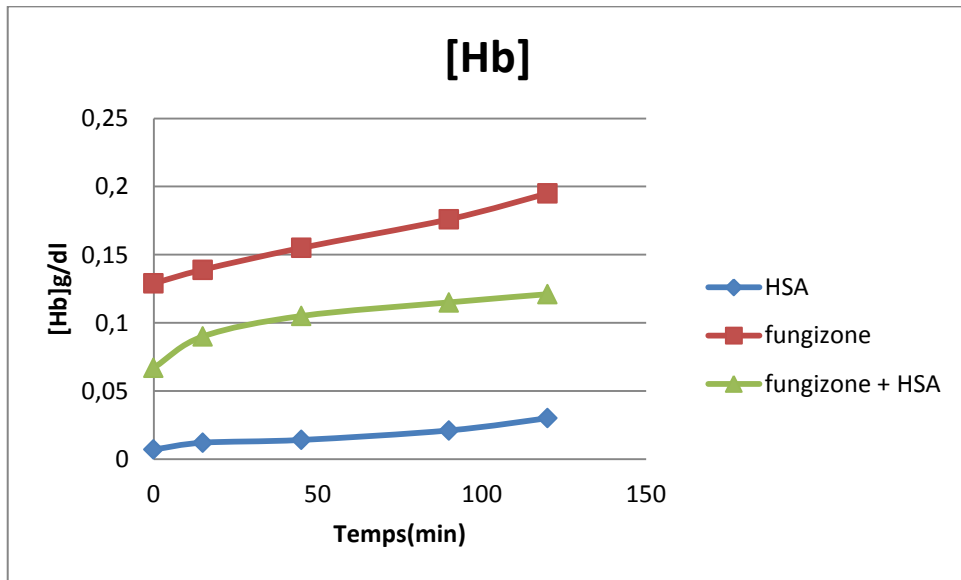


Figure 144 : Effet la fungizone sur [Hb] en présence et en absence de l'HSA (test 30)

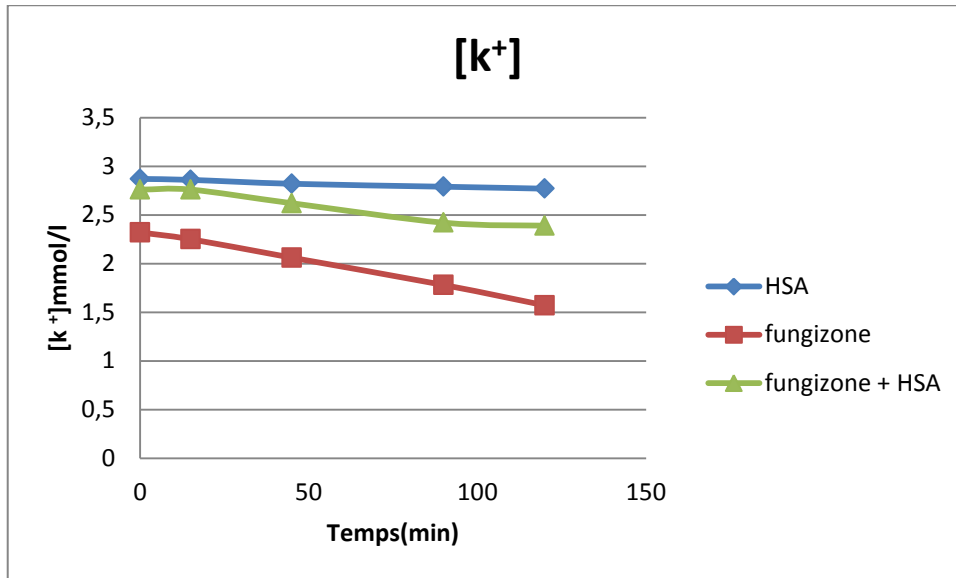


Figure 145 : Effet la fungizone sur $[k^+]$ en présence et en absence de l'HSA (test 30)

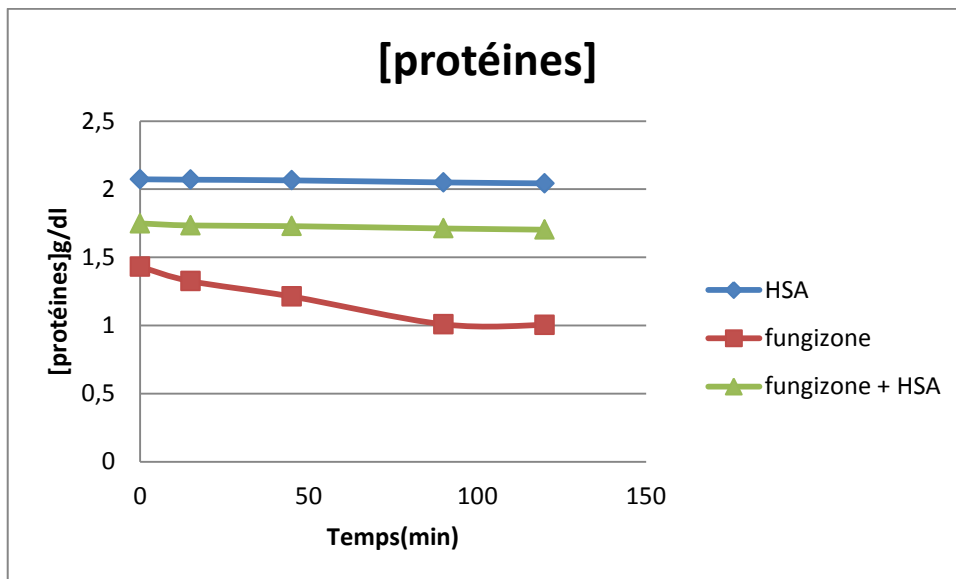


Figure 146 : Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 30)

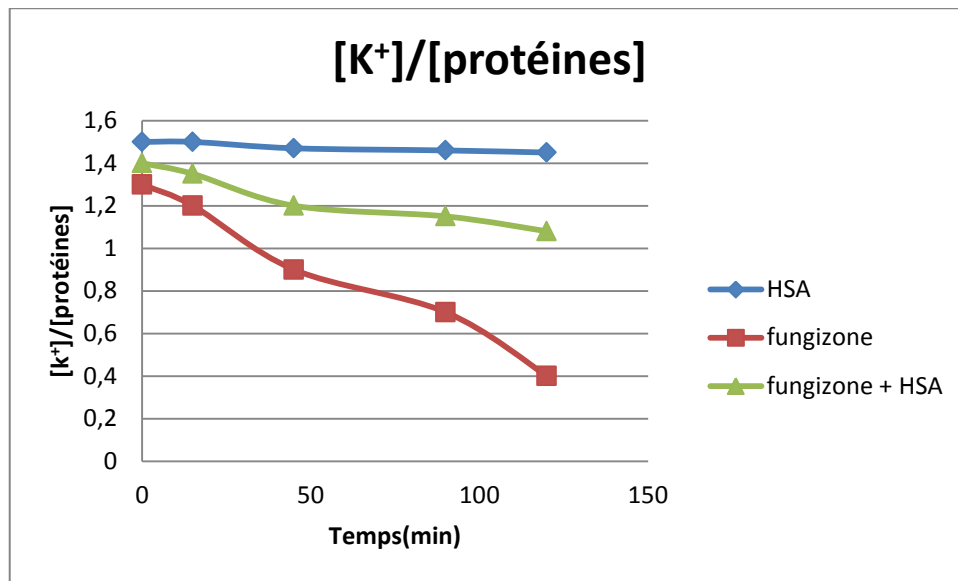


Figure 147 : Rapport $[K^+]/[protéines]$ (test 30)

Test n° 31 (1000 μ l)

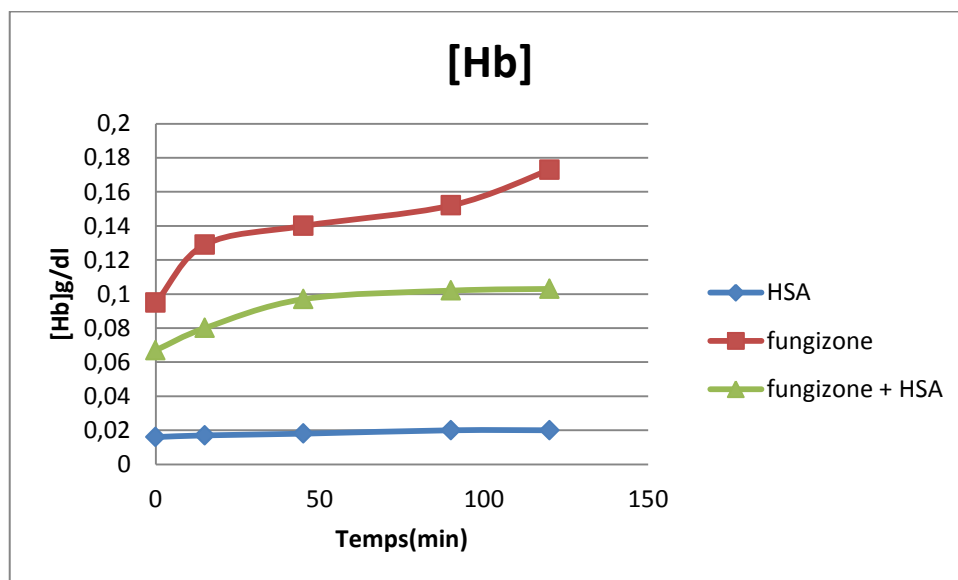


Figure 148: Effet la fungizone sur $[Hb]$ en présence et en absence de l'HSA (test 31)

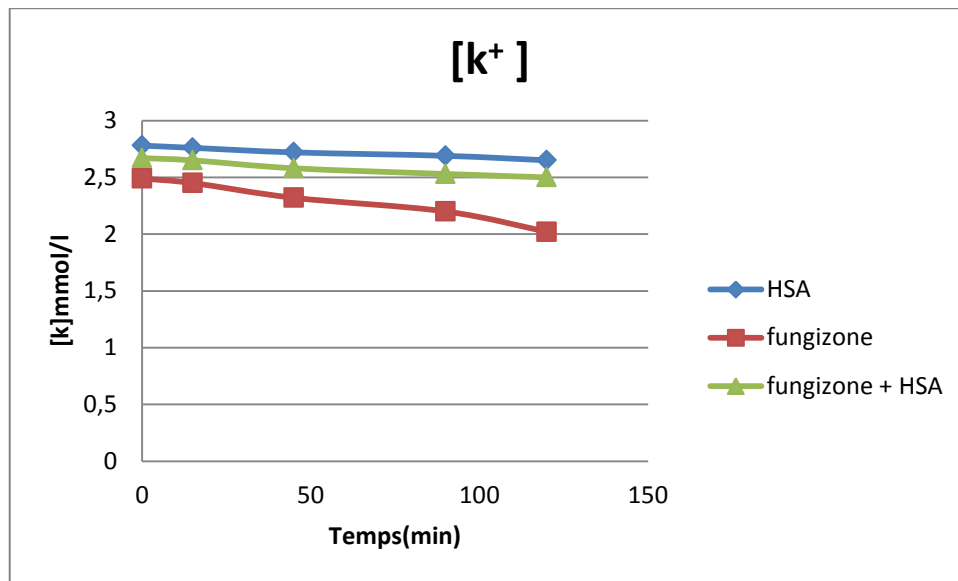


Figure 149 : Effet la fungizone sur [k⁺] en présence et en absence de l'HSA (test 31)

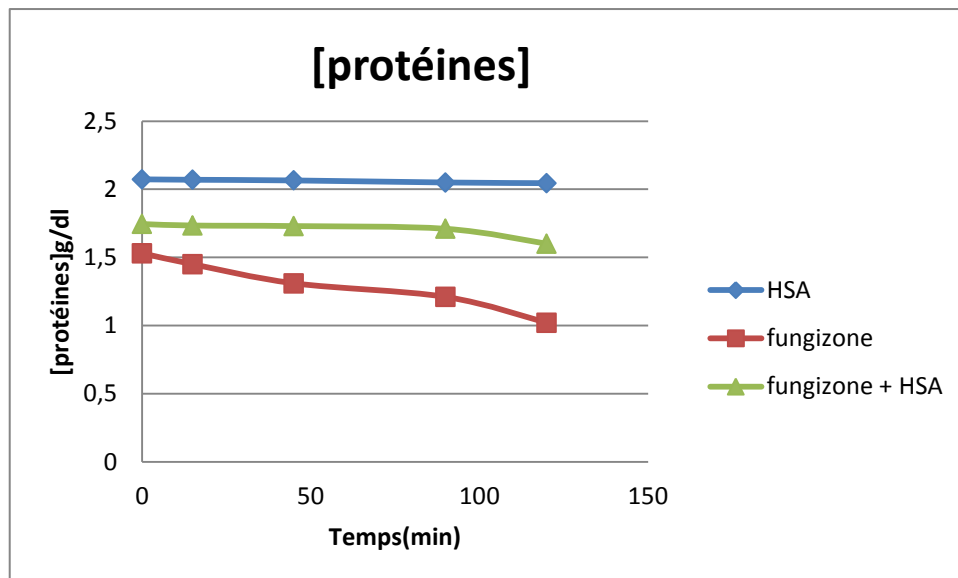


Figure 150: Effet la fungizone sur [protéines] en présence et en absence de l'HSA (test 31)

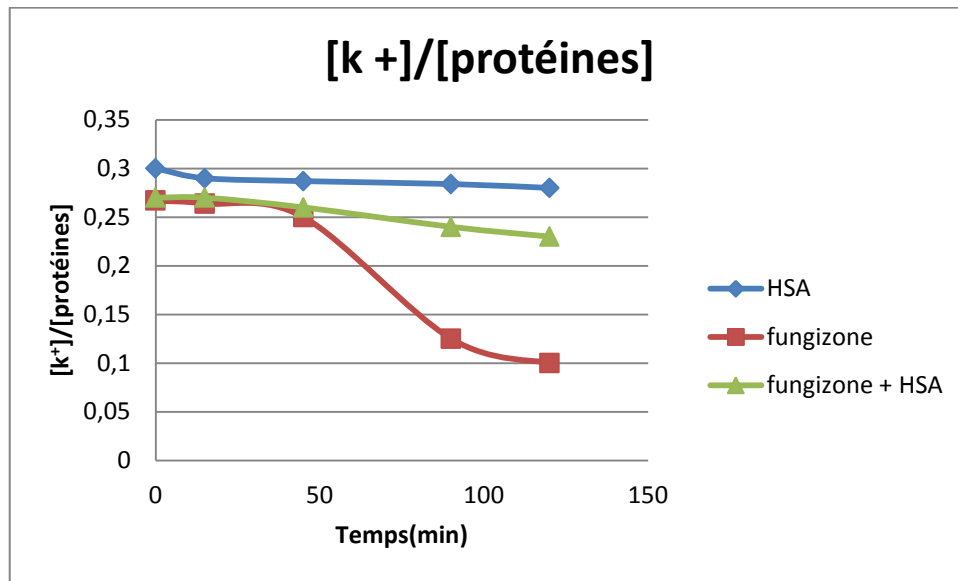


Figure 151 : Rapport [k⁺]/ [protéines] (test 31)

1.2 Comparaison entre la préincubation de l'AmphB(fungizone) avec l'albumine et celle de l'Amph B avec les cellules

Test n° 32

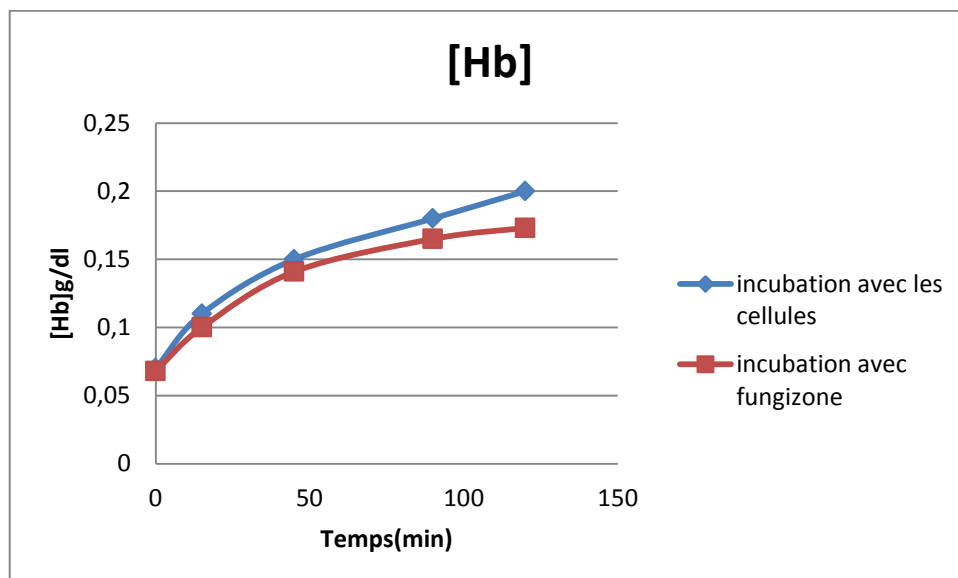


Figure 152 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 32).

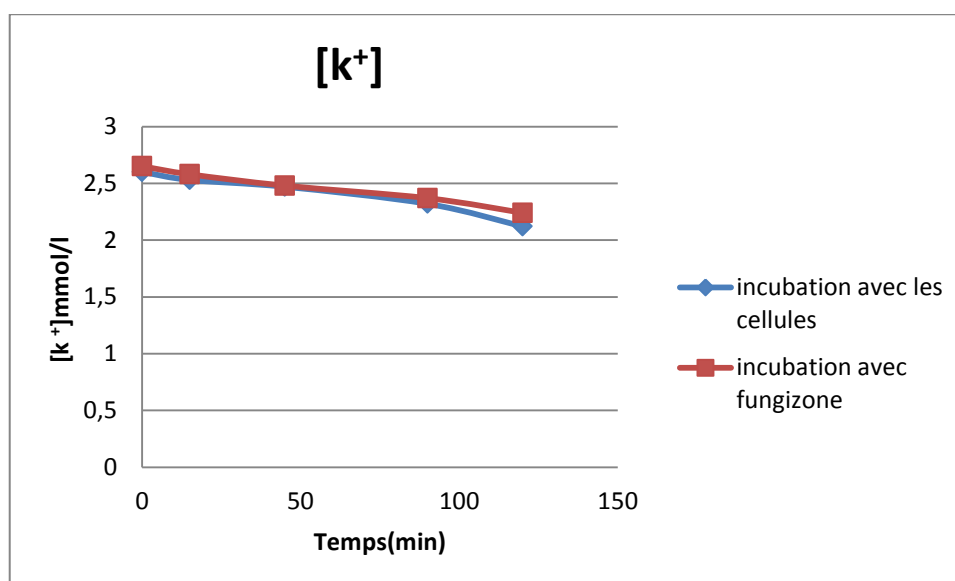


Figure 153 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 32)

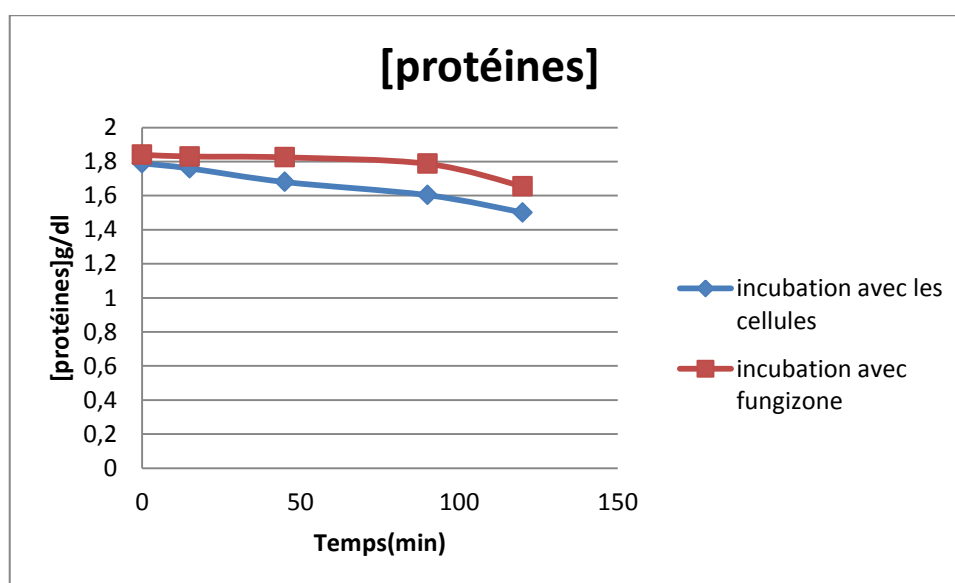


Figure 154 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 32).

Test n°33

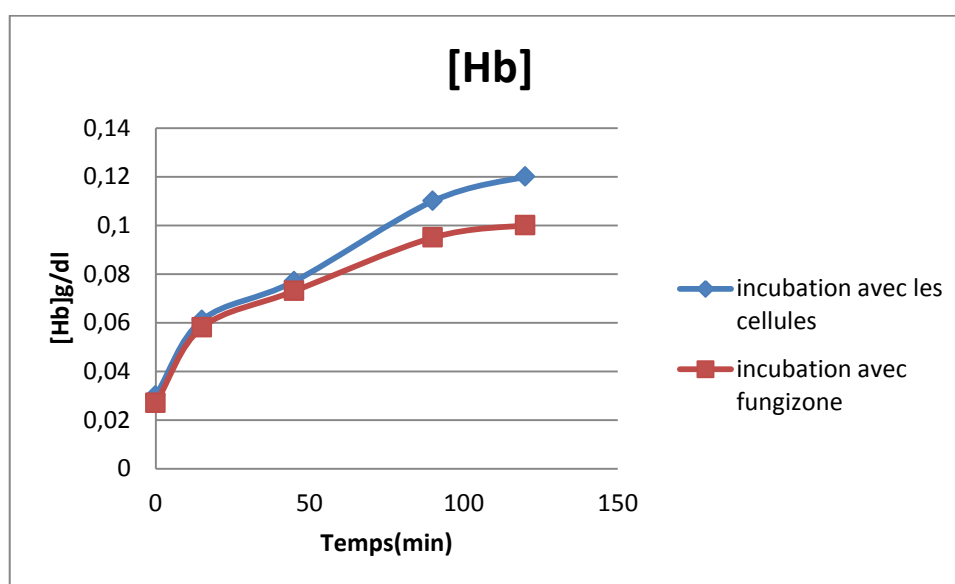


Figure 155 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 33)

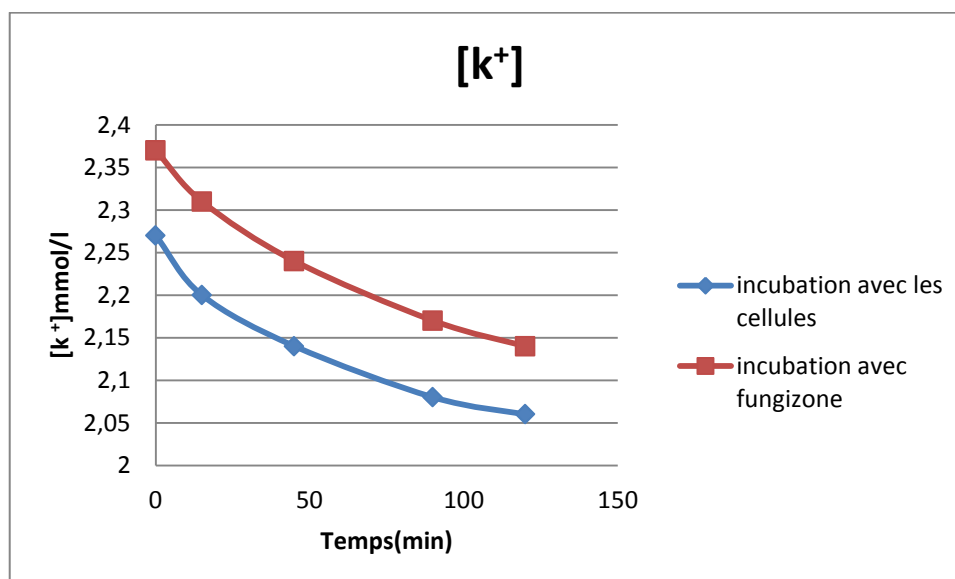


Figure 156: Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 33).

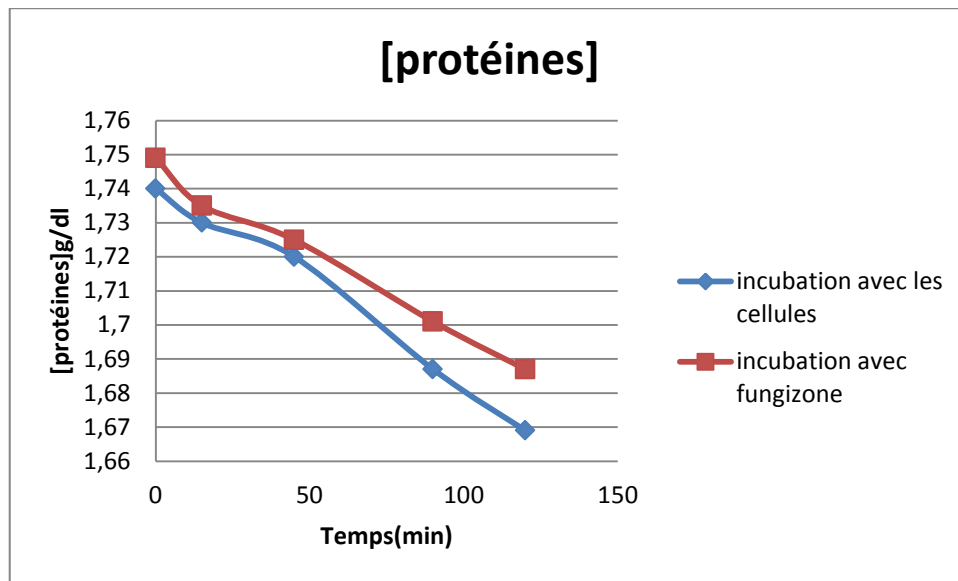


Figure 157 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 33)

Test n°34

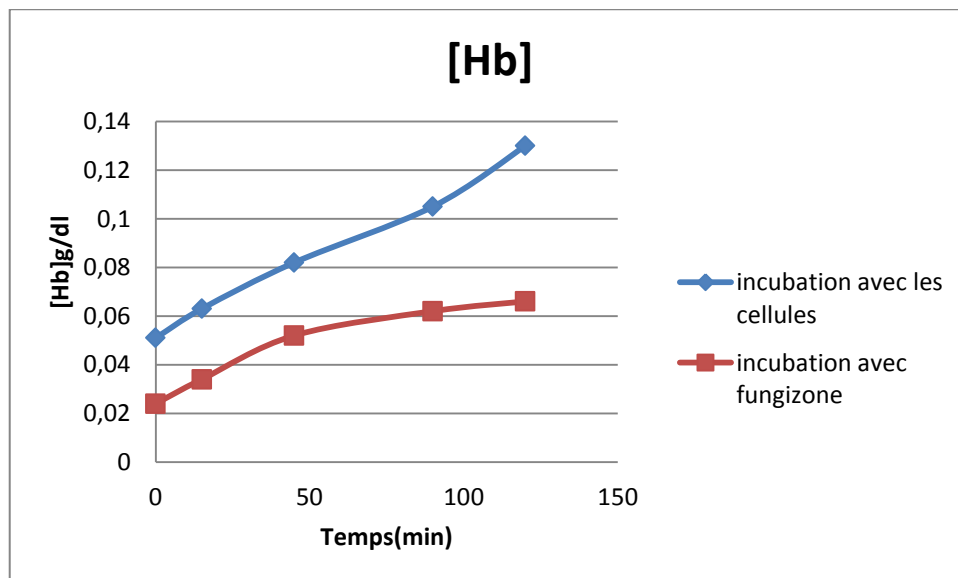


Figure 158 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 34)

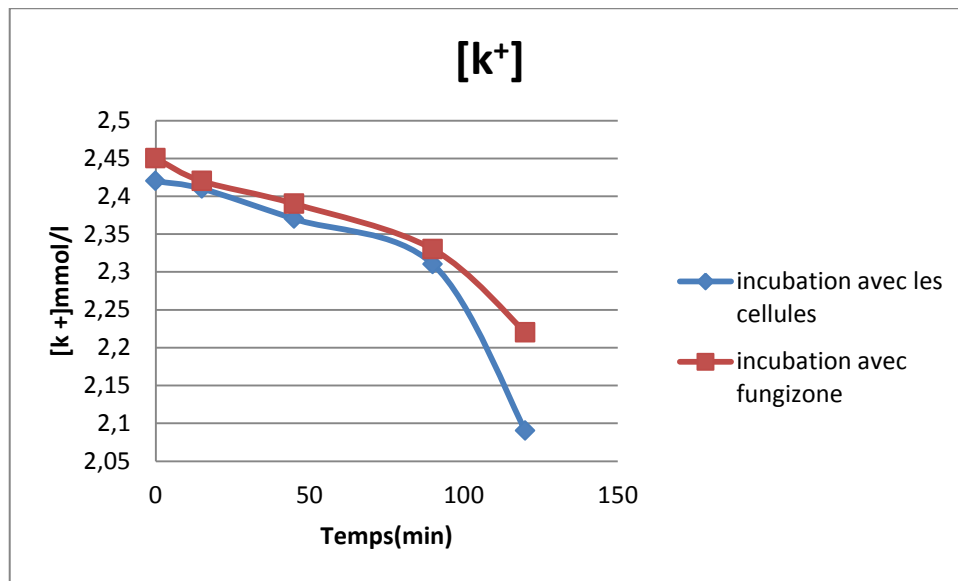


Figure 159 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 34)

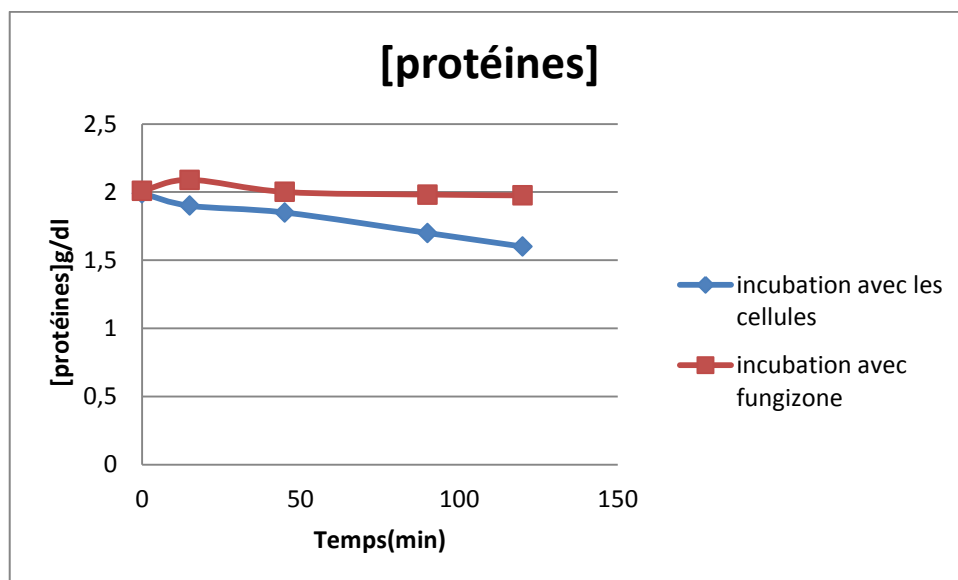


Figure 160 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 34)

Test n°35

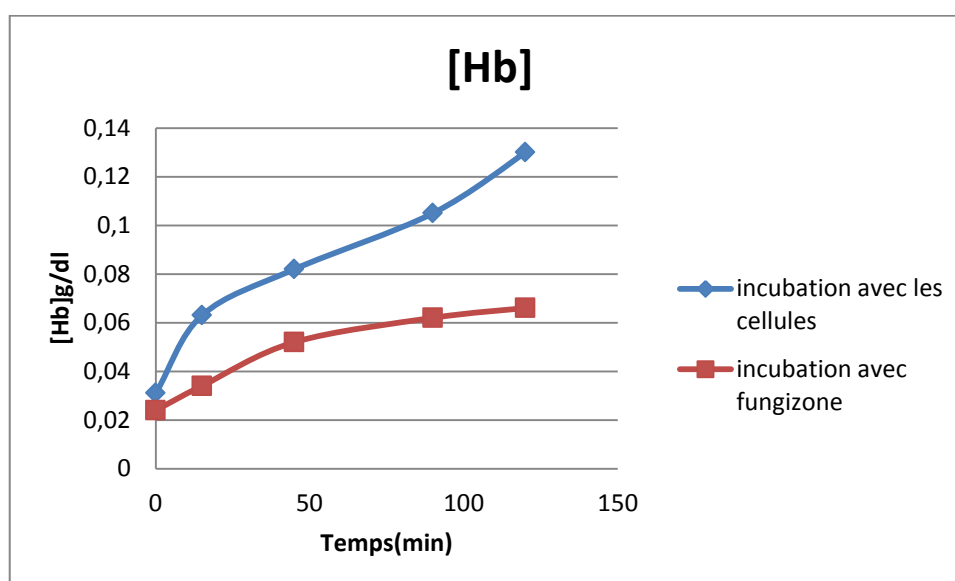


Figure 161 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 35)

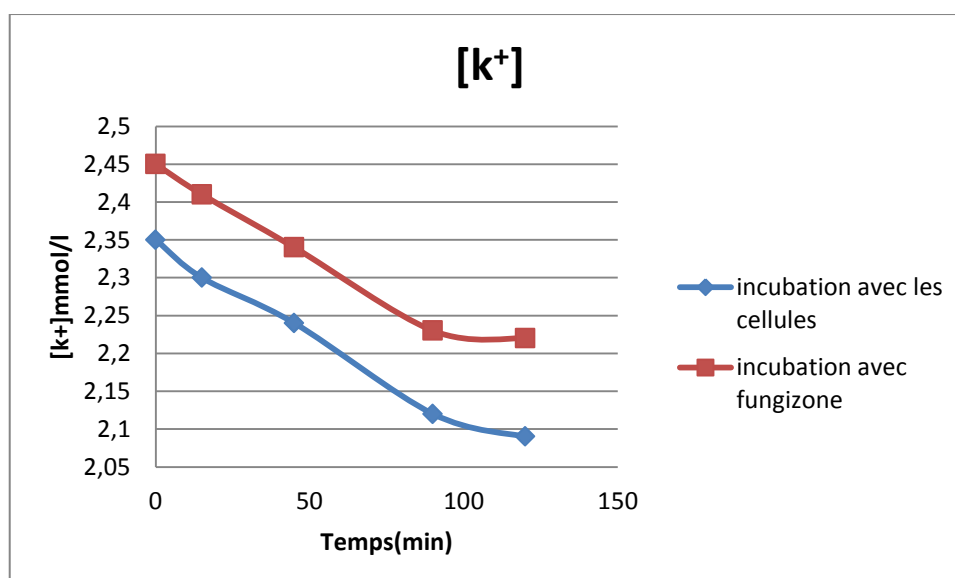


Figure 162 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 35)

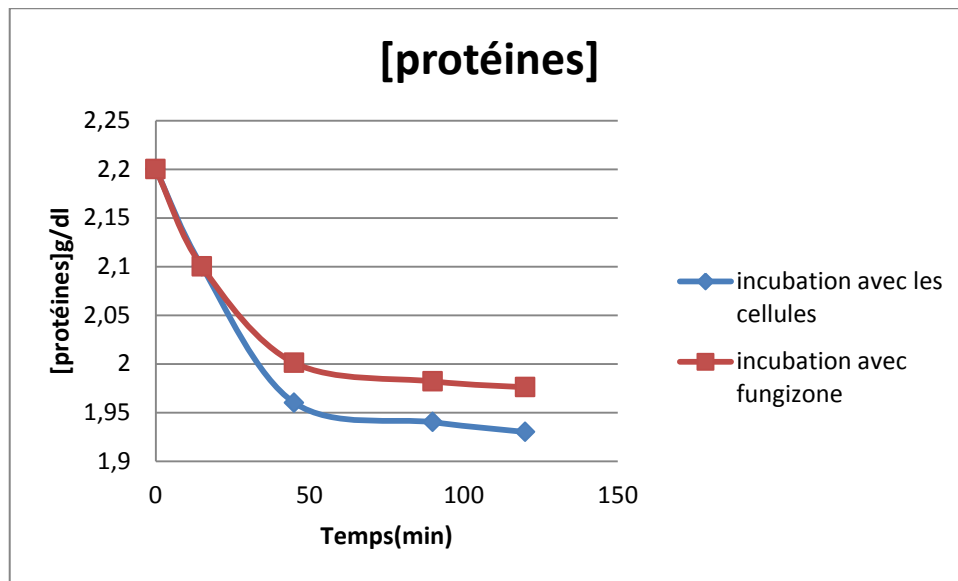


Figure 163 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 35)

Test n°36

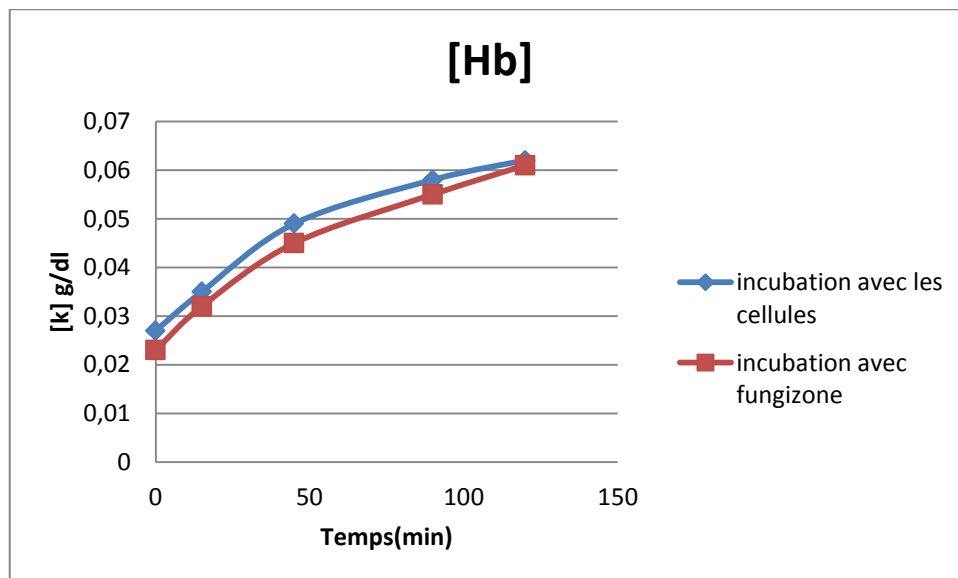


Figure 164 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 36)

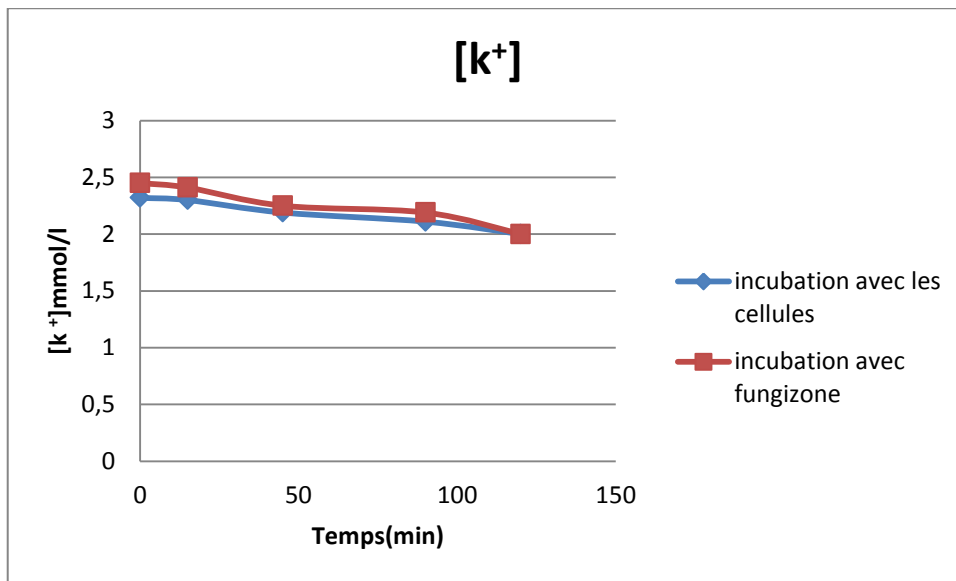


Figure 165 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 36)

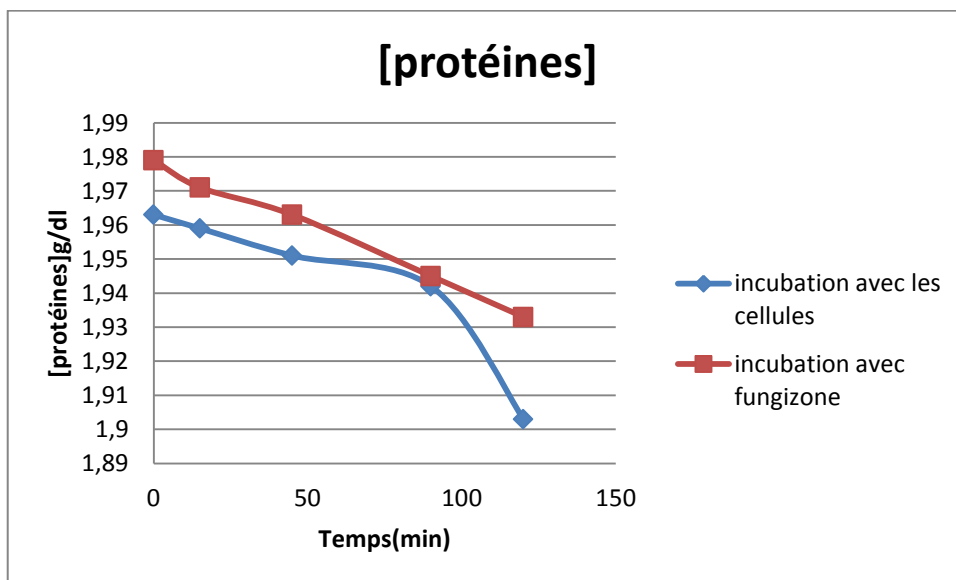


Figure 166 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 36)

Test n°37

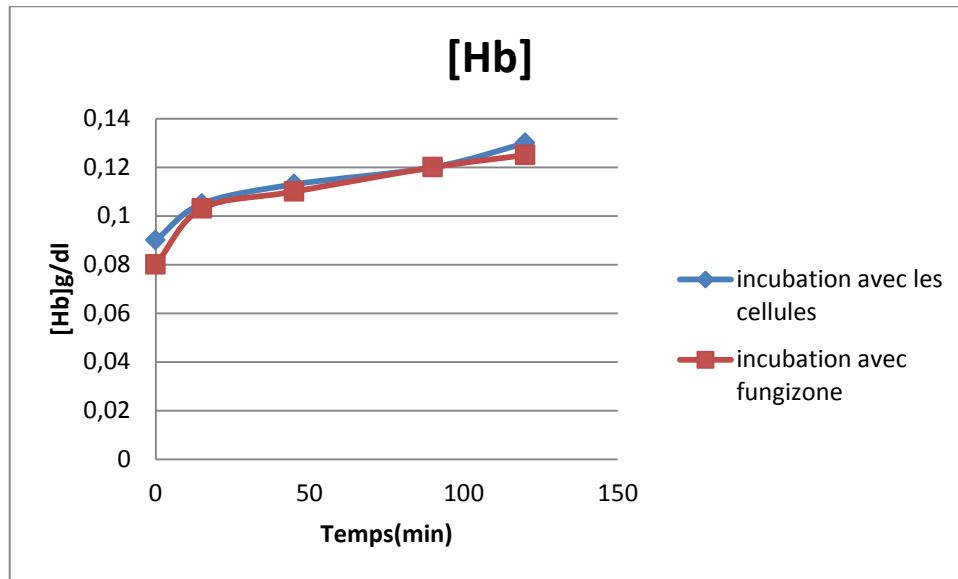


Figure 167 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 36)

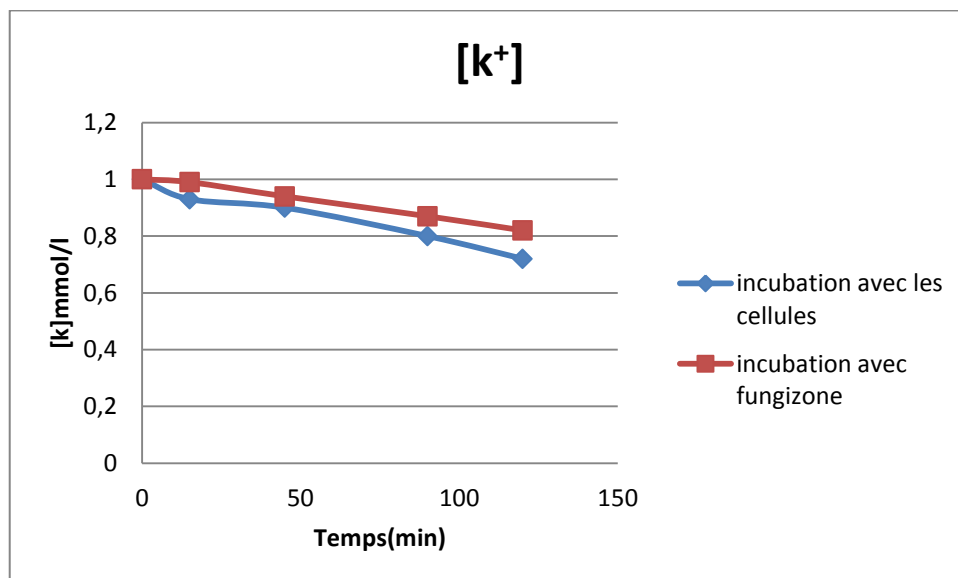


Figure 168 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 36)

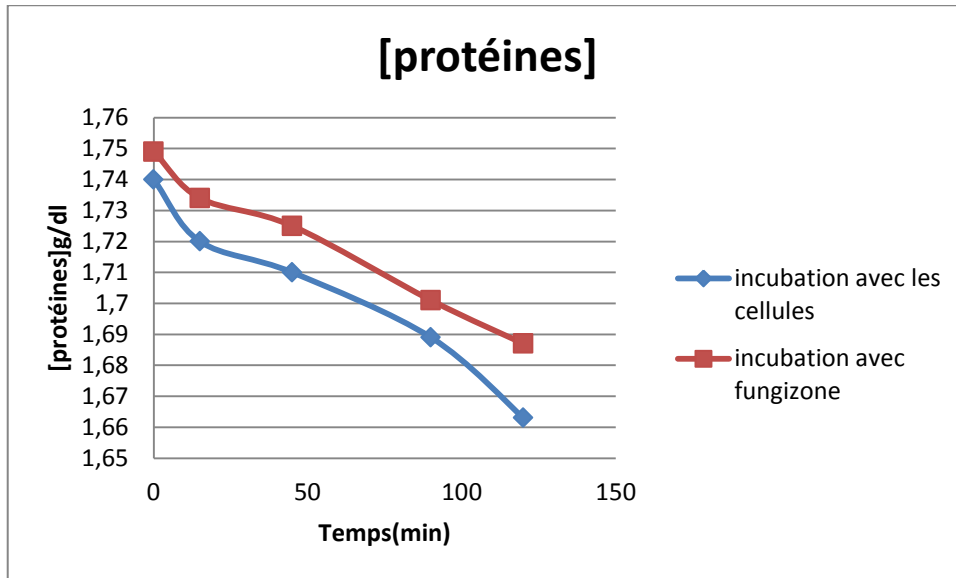


Figure 169 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 36)

Test n°38

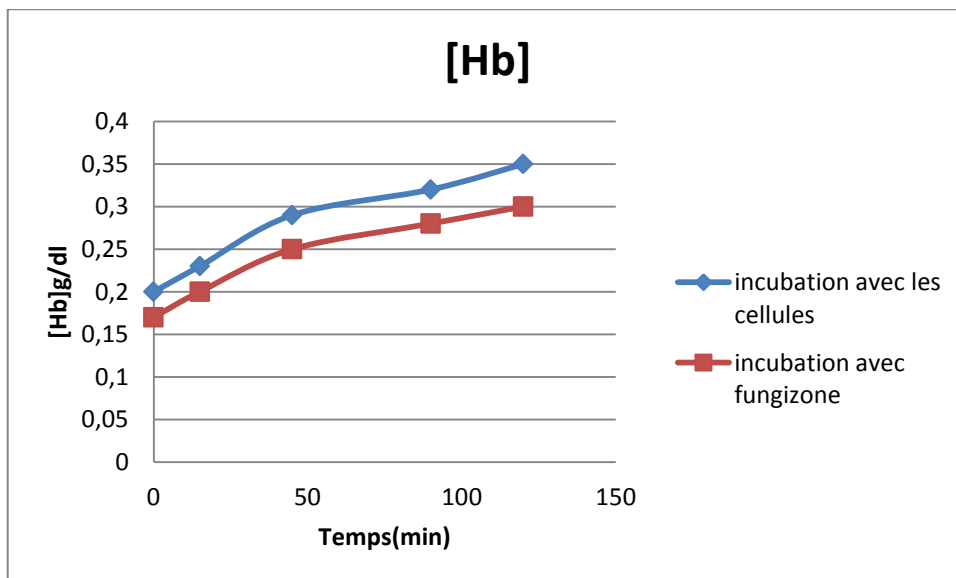


Figure 170 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 38)

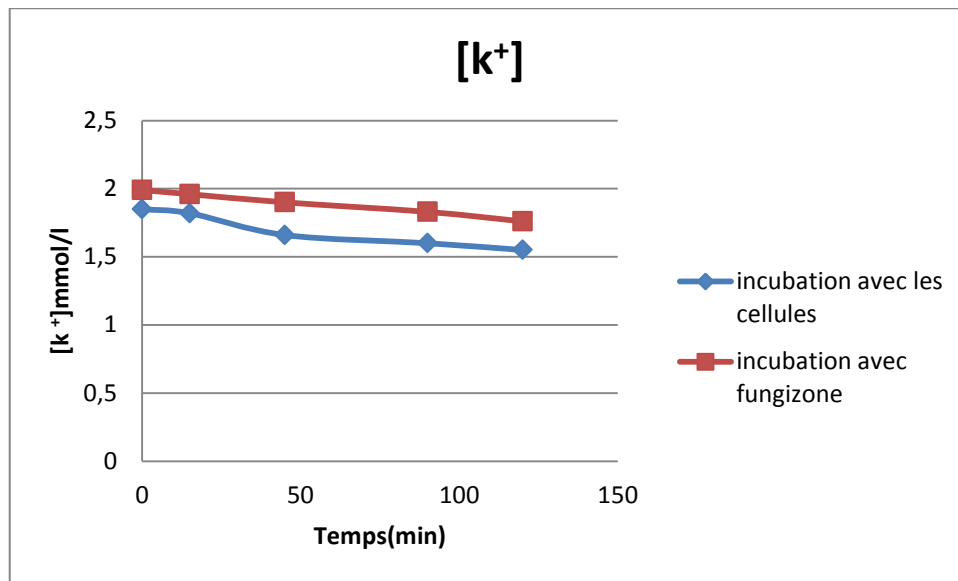


Figure 171 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 38)

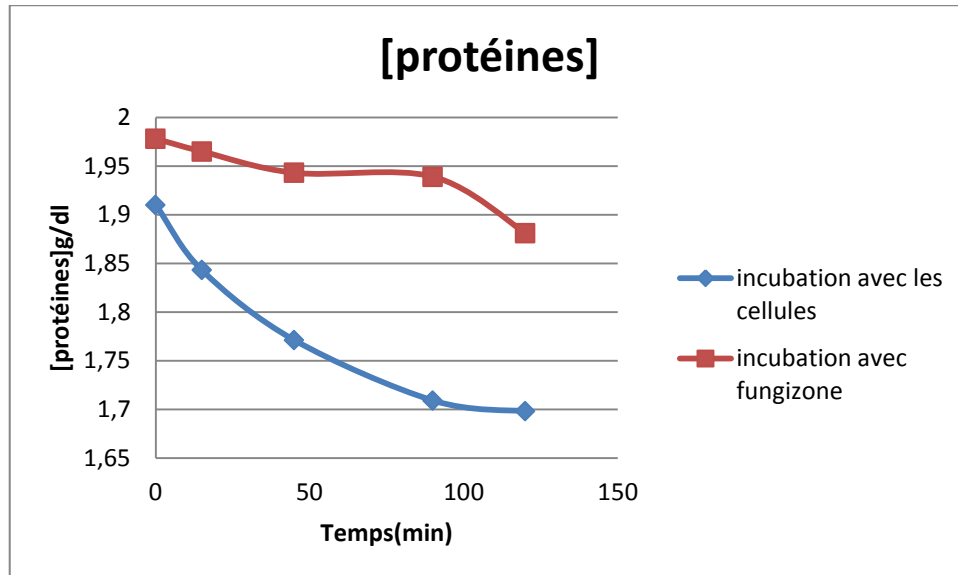


Figure 172: Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 38).

Test n°39

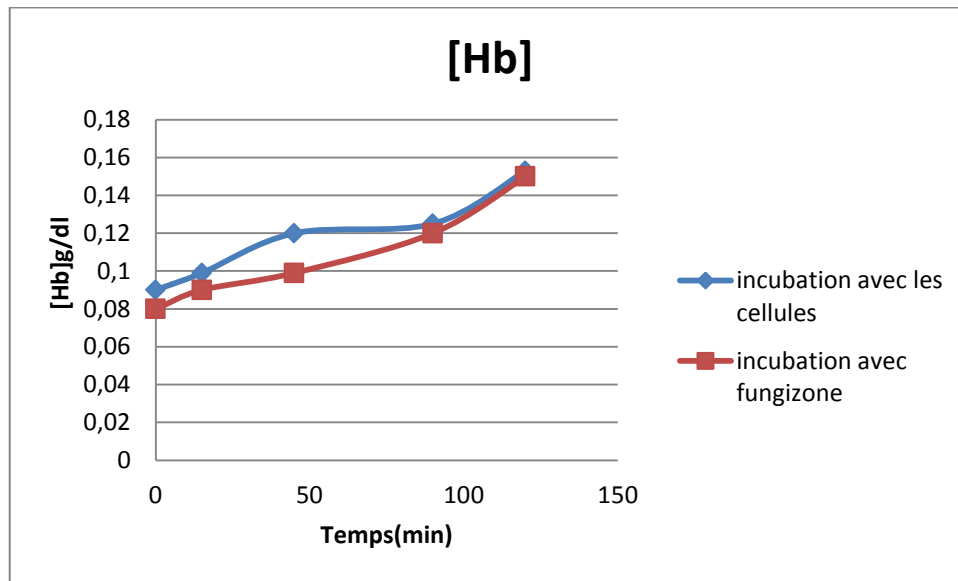


Figure 173 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 39)

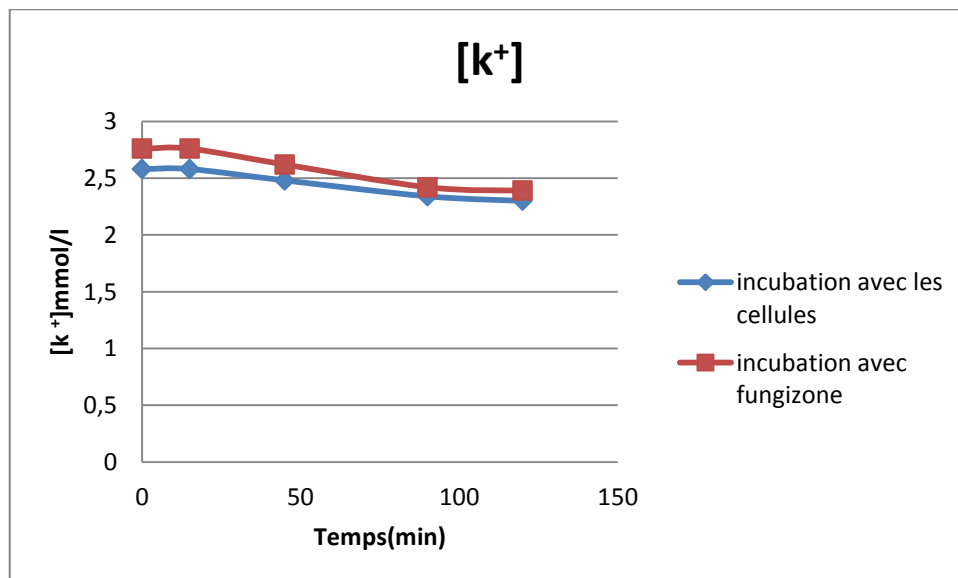


Figure 174 : Concentration du potassium intracellulaire en présence de l'HSA (test 39)

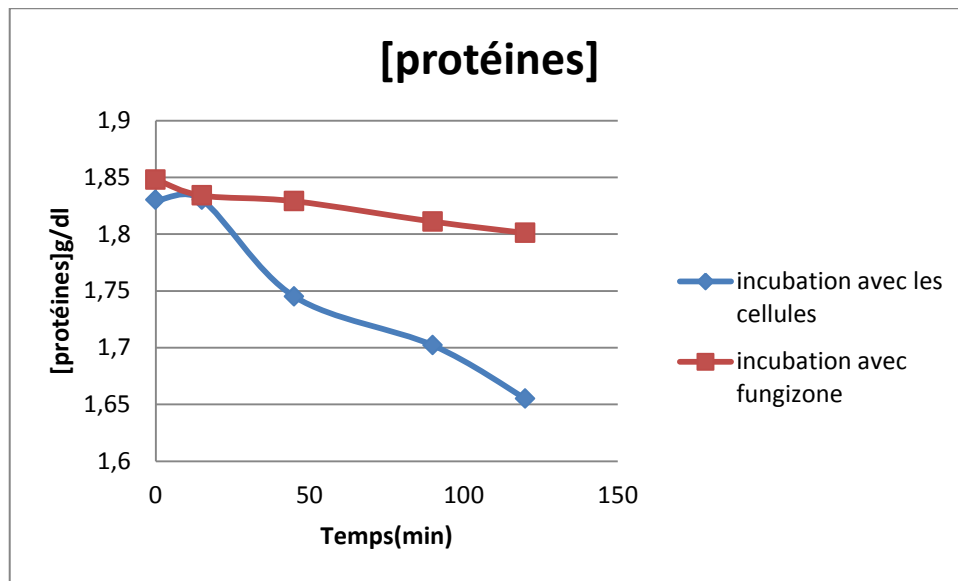


Figure 175 : Concentration des protéines en présence de l'HSA (test 39)

Test n°40

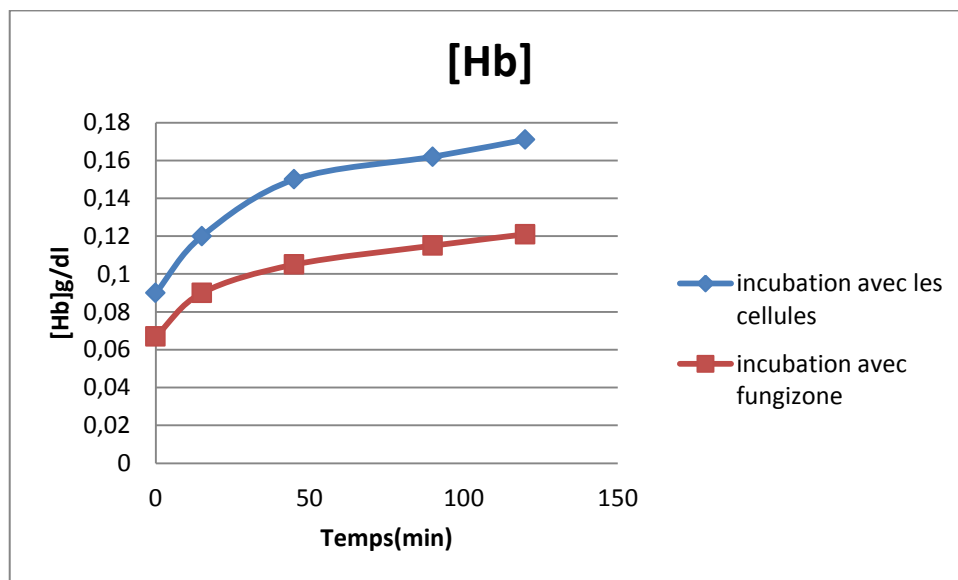


Figure 176 : Concentration de l'hémoglobine en présence de l'HSA (test 40).

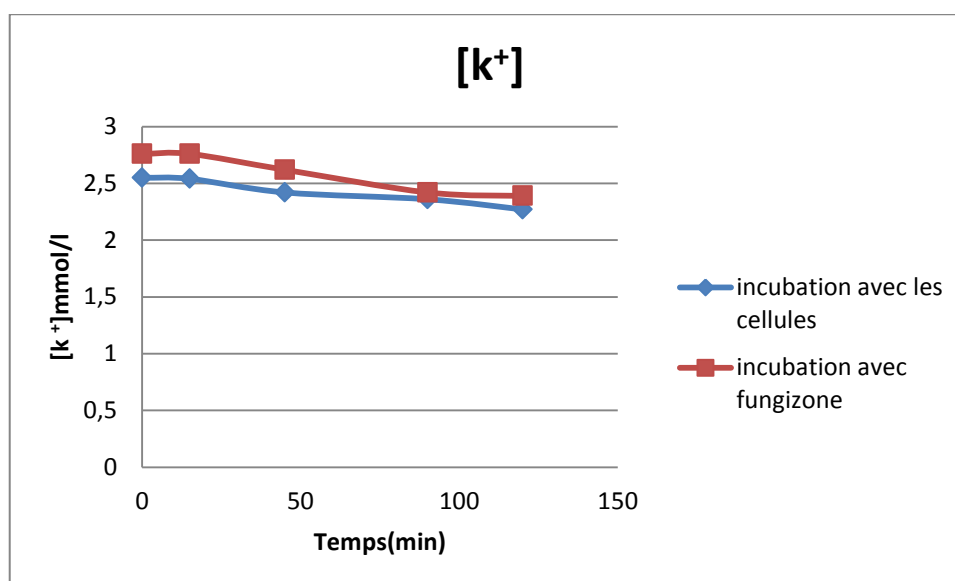


Figure 177 : Concentration du potassium intracellulaire en présence d'HSA (test 40)

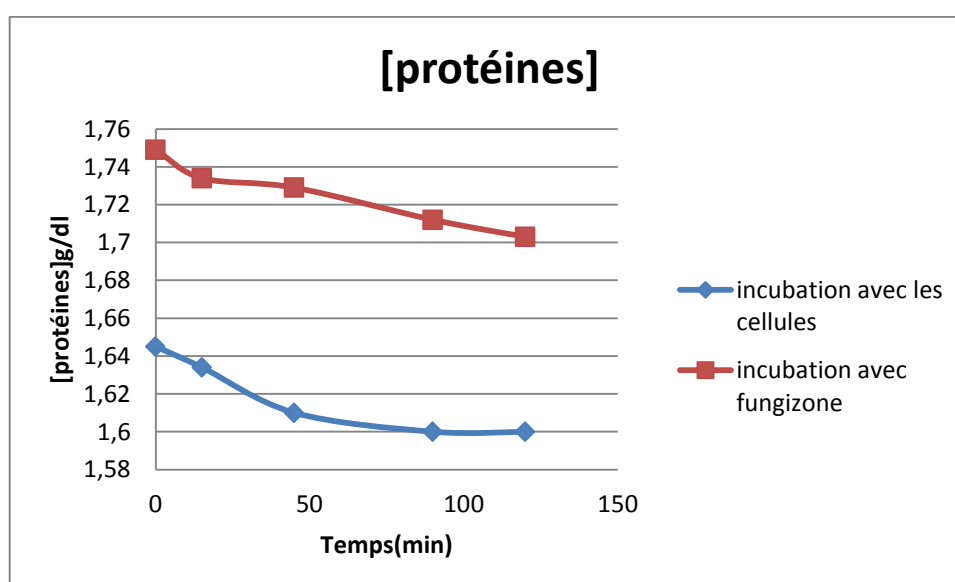


Figure 178 : Concentration des protéines en présence d'HSA (test 40)

Test n°41 :

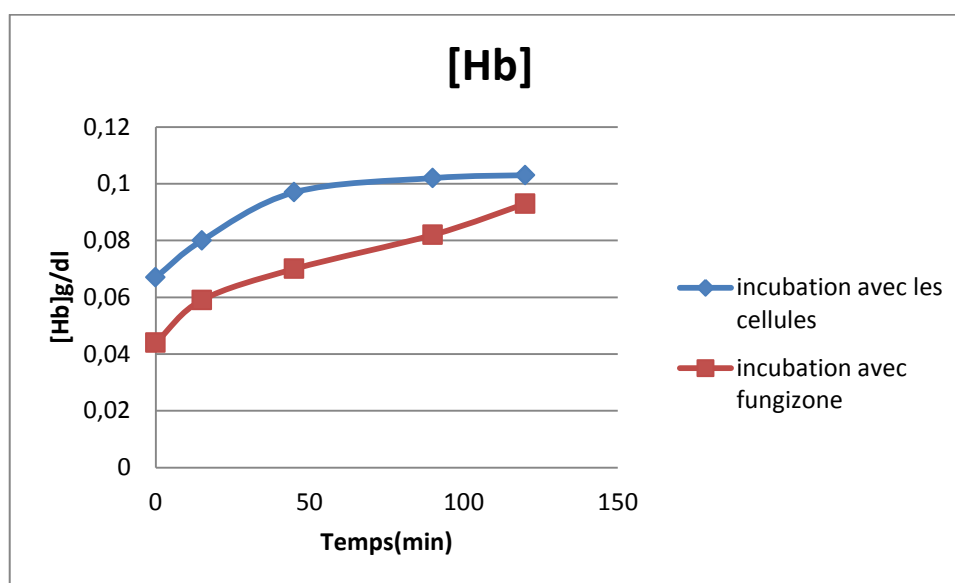


Figure 179 : Concentration de l'hémoglobine en présence d'HSA (test 41)

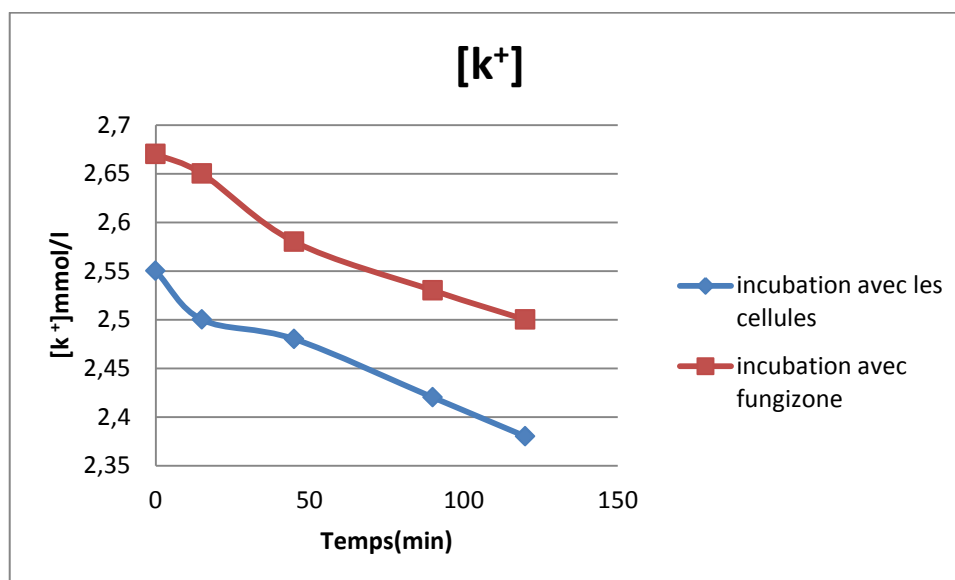


Figure 180 : Concentration du potassium intracellulaire en présence d' HSA (test 41)

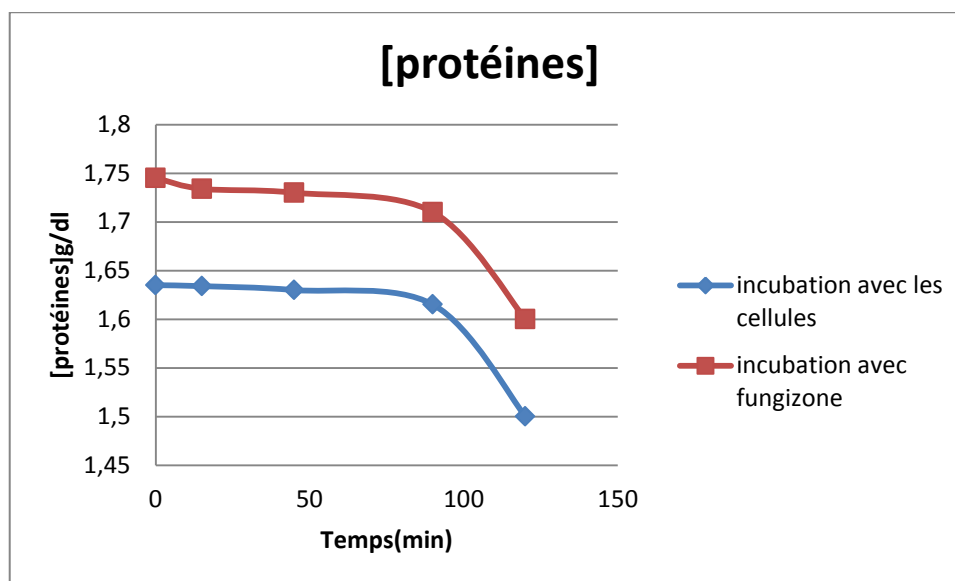


Figure 181: Concentration des protéines en présence d'HSA (test 41)

VI.2 Interprétation des résultats

1 L'évaluation de la toxicité de la fungizone® ($10^{-4}M$) à la dose de 150 µl

✚ L'effet de Fungizone® sur la concentration de l'hémoglobine

Au temps T0 nous avons remarqué que les concentrations de l'HB sont pratiquement les mêmes dans les deux milieux (avec et sans Fungizone®), à la 20^{ème} min les concentrations extracellulaires en Hb ont augmenté de manière remarquable dans l'échantillon avec la fungizone par rapport au T0 et cette augmentation s'est accentuée au cours du temps.

✚ L'effet de la Fungizone® sur la concentration du potassium intracellulaire

Les concentrations intracellulaires en potassium ont diminué dès la 15^{ème} min et cette diminution est très remarquable au temps (T90) dans l'échantillon avec la Fungizone®.

- **Dosage des protéines dans le culot**

Au temps T0 on a remarqué une diminution de taux des protéines dans le milieu avec Fungizone®, et ceci dans la majorité des tests, et cette diminution est très remarquable après 45 min.

2 Evaluation de l'effet de l'albumine sur la toxicité de Fungizone®

2.1 Premier cas : incubation HSA + Fungizone®

✚ L'effet de Fungizone® sur la concentration de l'hémoglobine en présence de HSA

Dans la majorité des tests on a remarqué une augmentation de la concentration de l'Hb dès la 15^{ème} min dans les deux milieux (Fungizone® avec et sans HSA) mais cette augmentation est plus importante dans le milieu sans HSA.

✚ Pour le dosage du potassium intracellulaire

La sortie de potassium est plus importante dans le milieu sans HSA dès la 10^{ème} min.

✚ Dosage des protéines dans le culot

On a remarqué une diminution importante du taux des protéines dès la 40^{ème} min dans le milieu où il y a que la Fungizone® sans HSA.

Effet dose réponse

On a constaté une augmentation de la concentration de l'Hb lorsqu'on augmente la dose de la Fungizone®.

En revanche, la concentration du potassium intracellulaire et le taux des protéines sont diminués à raison de l'augmentation des doses de la Fungizone®

2.2 Deuxième cas: préincubation avec les cellules

On a obtenue presque les mêmes résultats que le premier cas.

2.3 La comparaison entre la préincubation de la Fungizone® avec HSA et celle avec les cellules

La concentration de l'hémoglobine

Il y'a effectivement une fuite de l'Hb dans les deux milieux mais l'effet protecteur est plus remarquable lorsqu'il y'a la préincubation HSA avec la Fungizone®.

La concentration de potassium intracellulaire

La concentration de potassium est diminuée dès la 10^{ème} min dans les deux milieux mais cette diminution est plus importante dans le milieu où il y'a la préincubation de la Fungizone® avec les cellules.

Le dosage des protéines

Le taux des protéines est nettement inferieur dans le milieu où il y'a la préincubation de la Fungizone® avec les cellules.

V. Discussion

Le travail fait au sein du service de biochimie CHU Tlemcen a été confronté à des contraintes, notamment :

- La non disponibilité des réactifs pour le dosage des paramètres à étudier, ainsi que la limite du temps.
- Une telle étude nécessite un approfondissement et une réalisation *in vivo*.

Cette étude montre que la sérum albumine humaine a un effet protecteur sur la toxicité du Fungizone® sur le globule rouge, d'une part par modification de la perméabilité des ions K^+ et d'autre part par la diminution du taux d'hémolyse.

Il est clair que ce résultat nécessite un approfondissement des mécanismes de toxicité mis en œuvre et d'évaluer l'effet protecteur de la sérum albumine humaine en cherchant d'autres paramètres tels que le dosage de l'enzyme de la glycolyse anaérobie la LDH.

L'effet protecteur de la sérum albumine humaine sur la toxicité du Fungizone® a été aussi testé par d'autres études :

J. A. Sánchez-Brunete et coll ont proposé des microsphères hydrophiles d'albumine comme nouveau système de la livraison pour l'amphotéricine B (Am B ;Microsphères d'AMB), ils ont trouvé que la toxicité aiguë des microsphères d'Am B était inférieure à celle de la formulation de référence d'Am B-désoxycholate chez les hamsters et ils ont conclu que le traitement avec des microsphères d'AMB a eu comme conséquence l'amélioration de l' index thérapeutique(86).

M. BREZIS et coll : L'étude était faite *in vitro* ; l'hémolyse induite par l'amphotéricine B a été également nettement réduite en présence de l'albumine et ce dernier n'a pas réduit l'effet antibiotique de l'amphotéricine *in vitro*, ce qui confirme que l'activité antifongique de l'amphotéricine B est préservée *in vitro*. Ils ont conclu que la toxicité de l'amphotéricine B peut être considérablement réduite si elle est administrée dans un véhicule d'albumine. Les effets protecteurs *in vivo* d'albumine sur la vasoconstriction rénale amphotéricine-induite ont été aussi démontrés(87).

PORNANONG ARAMWIT et coll ont publié « The Effect of Serum Albumin on the Agrégation State and Toxicity of Amphotericin B », qui avait comme but d'évaluer l'effet de l'albumine humaine de sérum (HSA) sur la structure et la stabilité in vitro et ont trouvé que la Fungizone® est rapidement convertie de sa forme agrégée en monomère lié aux protéines en présence de HSA(88).

Brajtburg et collègues ont démontré que l'Am B lié des protéines du sérum, y compris la sérum l'albumine a pour résultat une toxicité réduite(88).

Conclusion et perspectives

Selon les résultats on a remarqué qu'il y a une réduction de la toxicité de l'Am B sur les globules rouges, en présence de la sérum albumine humaine, d'une part par la diminution de la fuite de K^+ intracellulaire et d'autre part par la diminution de taux d'hémolyse.

Ces résultats montrent clairement la nécessité de poursuivre les travaux sur l'effet antioxydant du sérum albumine humaine sur la toxicité de la Fungizone®, dans l'espoir d'aller en une amélioration de l'index thérapeutique et élaborer d'une nouvelle formulation de la Fungizone®.

Perspectives :

Pour enrichir notre étude on pouvait compléter ce travail :

- En étudiant d'autres paramètres tels que le dosage du lactate déshydrogénase (LDH) et le pyruvate.
- Tester l'activité fongitoxique de notre formulation sur des modèles animales.
- Effectuer des études microscopiques plus approfondies pour étudier le mécanisme d'action de notre formulation.
- Effectuer des études comparatives en utilisant d'autres antioxydants.

Bibliographie

1. Gellen-Dautremer J, Lanternier F, Dannaoui E, Lortholary O. Associations antifongiques dans les infections fongiques invasives. *Rev Médecine Interne*. janv 2010;31(1):72-81.
2. Pavese P, Ouachi Z, Vittoz J-P, Lebeau B, Foroni L, Allenet B, et al. Revue de pertinence des prescriptions des nouveaux antifongiques systémiques dans un hôpital universitaire. *Médecine Mal Infect*. déc 2007;37:S223-8.
3. Chabasse D, Guigen C, Contet-Andonneau N. *Mycologie médicale*. Elsevier Masson.
4. Kagan L, Gershkovich P, Wasan KM, Mager DE. Physiologically Based Pharmacokinetic Model of Amphotericin B Disposition in Rats Following Administration of Deoxycholate Formulation (Fungizone®): Pooled Analysis of Published Data. *AAPS J*. 23 mars 2011 [cité 7 mai 2016];13(2).
5. Gaïes E, Ben Ali R, Trabelsi S, Jebabli N, Salouage I, Charfi R, et al. Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'amphotéricine B par chromatographie liquide à haute performance. *Rev Francoph Lab*. févr 2013;2013(449, Part 1):67-70.
6. Mohamed-Ahmed AHA, Seifert K, Yardley V, Burrell-Saward H, Brocchini S, Croft SL. Antileishmanial Activity, Uptake, and Biodistribution of an Amphotericin B and Poly(α -Glutamic Acid) Complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 oct 2013;57(10):4608-14.
7. Aoun K, Idrissi ALE, Harrat Z, Marty P. Réunion « Leishmaniose viscérale au Maghreb », 2–4 avril 2015 à Tunis. Recommandations. *Bull Société Pathol Exot*. 22 mai 2015;108(3):229-30.
8. Zhou B, Li R, Zhang Y, Liu Y. Kinetic analysis of the interaction between amphotericin B and human serum albumin using surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy. *Photochem Photobiol Sci*. 3 avr 2008;7(4):453-9.
9. Ibrahim F, Gershkovich P, Sivak O, Wasan EK, Wasan KM. Pharmacokinetics and tissue distribution of amphotericin B following oral administration of three lipid-based formulations to rats. *Drug Dev Ind Pharm*. sept 2013;39(9):1277-83.
10. Volmer AA, Szpilman AM, Carreira EM. Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. *Nat Prod Rep*. 18 août 2010;27(9):1329-49.
11. vidal 2013.
12. Thériaque.
13. Caffrey P, Lynch S, Flood E, Finnan S, Olinyk M. Amphotericin B biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem.Biol*. Vol. 8. 2000. 713-723 p.
14. Nicolaou K, Ongawa Y, Chakraborty TK. Total synthesis of amphotericin B: 3 final stages. *Chem. Soc*. Vol. 110. 2003. 4696-4705 p.

15. Vandeputte P. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Université d'Angers; 2008.
16. MONOGRAPHIE DE PRODUIT: FUNGIZONE® amphotéricine B pour injection, USP Pour perfusion intraveineuse. Bristol-Myers Squibb Canada : Montréal, Canada; 2009.
17. Cohen Y, Jacquot C. Pharmacologie 6ème Edition. 6ème Edition Elsevier Masson. 2008. 384-386 p.
18. Principaux antifongiques et anti parasitaires AFECT. Editions Médicales. Vol. 5. 2008. 23-30 p.
19. Tutaj K, Szlajak R, Starzyk J, Wasko P, Grudzinski W, Gruszecki WI, et al. The orientation of the transition dipole moments of a polyene antibiotic Amphotericin B under UV–VIS studies. *J Photochem Photobiol B*. oct 2015;151:83-8.
20. Tutaj K, Szlajak R, Starzyk J, Wasko P, Grudzinski W, Gruszecki WI, et al. The orientation of the transition dipole moments of a polyene antibiotic Amphotericin B under UV–VIS studies. *J Photochem Photobiol B*. oct 2015;151:83-8.
21. Wojtowicz K, Gruszecki WI, Walicka M, Barwicz J. Effect of amphotericin B on dipalmitoylphosphatidylcholine membrane: Colorimetry, Ultrasound absorption and monolayer technique studies. *Biochimica et Biophysica acta*. 1998. 1373: 220-226.
22. Kéri G, Toth I. Molecular pathomechanisms and new trend in drug research. CRC press Ed. 2003. 283-284 p.
23. Van-Bambeke F. Antifongiques. *Farm*. 2009. 2129 p.
24. Vandermeulen G, Rouxhet L, Arien A, Brewster ME, Prétat V. Encapsulation of amphotericin B in poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles. *Int J Pharm*. 17 févr 2006;309(1–2):234-40.
25. Penet É, Bonneau L, Parinaud A-S, Gonnin S, Gaillard M-A, Javerliat M. Pharmacologie des antifongiques systémiques. *Actual Pharm Hosp*. nov 2011;7(28):10-20.
26. Andrès E, Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R. Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B. *Revue de la littérature. Rev Médecine Interne*. févr 2001;22(2):141-50.
27. Takemoto K, Yamamoto Y, Ueda Y, Sumita Y, Yoshida K, Niki Y. Comparative study on the efficacy of AmBisome and Fungizone in a mouse model of pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*. 1 avr 2006;57(4):724-31.
28. Henderson RJ, Leon CG, Wasan KM. Differences in human phospholipid transfer protein activity following incubation of Fungizone compared to lipid-based Amphotericin-B formulations in normolipidemic and hyperlipidemic plasma. *Drug Dev Ind Pharm*. sept 2009;35(9):1139-46.

29. Michel.Schodreret et coll. Pharmacologie Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques.Frisson Roche.1998.848 p.
30. D. Vital Durand, C. LJ. GUIDE PRATIQUE DES MEDICAMENTS. Maloine. 2014. 222-223 p.
31. Yang Z, Tan Y, Chen M, Dian L, Shan Z, Peng X, et al. Development of Amphotericin B-Loaded Cubosomes Through the SolEmuls Technology for Enhancing the Oral Bioavailability. AAPS PharmSciTech. 23 oct 2012;13(4):1483-91.
32. Martin C. Urgences et infections : Guide du bon usage des antibiotiques, antifongiques, antiviraux, antiseptiques. Ed Arnette. :102-10.
33. Michel S, coll. Pharmacologie Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Frisson Roch. 1998. 64-65 p.
34. Kettani A, Belkhadir ZH, Mosadik A, Faroudy M, Ababou A, Lazreq C, et al. Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. J Mycol Médicale J Med Mycol. mars 2006;16(1):16-25.
35. Stockmann C, Constance JE, Roberts JK, Olson J, Doby EH, Ampofo K, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antifungals in Children and their Clinical Implications.Clin Pharmacokinet.5 mars 2014;53(5):429-54.
36. Vandeputte P. Mecanismes moleculaires de la resistance aux antifongiques chez candida glabrata. [French]: Universite d'Angers; 2008.
37. Blanchet B, Huet E, Astier A, Hulin A. Suivi thérapeutique des médicaments antifongiques. Rev Fr Lab. sept 2004;2004(365):39-47.
38. Moore D, Robson GD, Trinci APJ. 21st Century Guidebook to Fungi with CD. Cambridge University Press; 2011.705 p.
39. Moulin M, Coquerel A. Pharmacologie. Masson. 2004. 262 p.
40. Hamoir J, Goret M, Mignon B, Gustin P. News on antifungal drugs registered in Belgium for the treatment of dermatophytosis in domestic carnivores. Ann Médecine Vét. 2001 [cité 14 juin 2016];145.
41. Chevrel G. Le Vademecum des médicaments injectables. Paris: Editions Masson; 2001. 853 p.
42. Maclean D, Sojé P. L'AMPHOTÉRICINE B. Sharon Walmsley MD FRCPC. 1997;
43. ZDROJEWSKA-BARWICZ J. Mecanisme de l'effet de surfactants sur la toxicité sélective d'un antibiotique polyénique, l'amphotéricine B. UNIVERSITÉ DU QUÉBEC; 1994.
44. Stockmann C, Constance JE, Roberts JK, Olson J, Doby EH, Ampofo K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals in children and their clinical implications. Clin Pharmacokinet. mai 2014;53(5):429-54.

45. Patel A, Forsythe P. *Small Animal Dermatology*. Elsevier Health Sciences; 2008.388 p.
46. Cillard J, Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Ol Corps Gras Lipides*. janv 2006;13(1):24-9.
47. Baginski M, Resat H, Borowski E. Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B–cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 23 déc 2002;1567:63-78.
48. Somerharju P, Virtanen JA, Cheng KH, Hermansson M. The superlattice model of lateral organization of membranes and its implications on membrane lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*.janv 2009;1788(1):12-23.
49. Harald T. *Atlas de poche hematologie* pge7. Médecine-Sciences Flammarion. 2000. 7 p.
50. Lang E, Lang F. Triggers, Inhibitors, Mechanisms, and Significance of Eryptosis: The Suicidal Erythrocyte Death. *BioMed Res Int*. 4 mars 2015;2015:e513518.
51. Mankelov T, Satchwell T, Burton N. Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane. *Blood Cells Mol Dis*. 15 juin 2012;49(1):1-10.
52. N.M. Weijers R. Lipid Composition of Cell Membranes and Its Relevance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Diabetes Rev*. 1 sept 2012;8(5):390-400.
53. Abraham EH, Sterling KM, Kim RJ, Salikhova AY, Huffman HB, Crockett MA, et al. Erythrocyte membrane ATP binding cassette (ABC) proteins: MRP1 and CFTR as well as CD39 (ecto-apyrase) involved in RBC ATP transport and elevated blood plasma ATP of cystic fibrosis. *Blood Cells Mol Dis*. févr 2001;27(1):165-80.
54. Gravelle S, Joly L, Detcheverry F, Ybert C, Cottin-Bizonne C, Bocquet L. Perméabilité optimale des aquaporines: Une histoire de forme - médecine/sciences. févr 2015;31(2):174-9.
- 55.
- Degenne, Michel and Binet, Christian. *Erythrocyte normal: morphologie, structure, composition chimique, métabolisme erythrocytaire*. Tours : s.n., novembre 2009. 1-8.
56. Delaunay J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Rev*. janv 2007;21(1):1-20.
57. Cabantchik ZI. Erythrocyte membrane transport. *Novartis Found Symp*. 1999;226:6-16-19.
58. Andreoli TE. *Membrane Physiology*.Springer Science & Business Media; 2013.474 p.

59. Kaestner L, Bernhardt I. Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry Amst Neth.* janv 2002;55(1-2):71-4.
60. <http://www.futura-sciences.com/magazines/sciences/recherche/?q=h%C3%A9moglobine>
61. Butcher JT, Johnson T, Beers J, Columbus L, Isakson BE. Hemoglobin α in the blood vessel wall. *Free Radic Biol Med.* août 2014;73:136-42.
62. Zhang J, Wu K, Xiao X, Liao J, Hu Q, Chen H, et al. Autophagy as a Regulatory Component of Erythropoiesis. *Int J Mol Sci.* 13 févr 2015;16(2):4083-94.
63. Rifkind JM, Nagababu E. Hemoglobin Redox Reactions and Red Blood Cell Aging. *Antioxid Redox Signal.* 10 juin 2013;18(17):2274-83.
64. J Evans. Le globule rouge dans tous ses états. 2013. SCOR Global Life SE.
65. Seigneurin, D. Cellules du sang - Normal et pathologique. Masson. Vol. 63.
66. Dreyfus B. L'hématologie. 1997. 25-26 p
67. Ucar K. Clinical presentation and management of hemolytic anemias. *Oncol Williston Park N.* sept 2002;16(9 Suppl 10):163-70.
68. Wilmotte R, Harper SL, Ursitti JA, Maréchal J, Delaunay J, Speicher DW. The exon 46-encoded sequence is essential for stability of human erythroid alpha-spectrin and heterodimer formation. *Blood.* 15 nov 1997;90(10):4188-96.
69. Jeney V, ria, Eaton JW, Balla G, rgy, Balla J, et al. Natural History of the Bruise: Formation, Elimination, and Biological Effects of Oxidized Hemoglobin, Natural History of the Bruise: Formation, Elimination, and Biological Effects of Oxidized Hemoglobin. *Oxidative Med Cell Longev Oxidative Med Cell Longev.* 16 mai 2013;2013, 2013:e703571.
70. Buttari B, Profumo E, Rigan, Rachele, Buttari B, Profumo E, et al. Crosstalk between Red Blood Cells and the Immune System and Its Impact on Atherosclerosis, Crosstalk between Red Blood Cells and the Immune System and Its Impact on Atherosclerosis. *BioMed Res Int BioMed Res Int.* 4 févr 2015;2015, 2015:e616834.
71. Spitalnik SL. Stored RBC Transfusions: Iron, Inflammation, Immunity, Infection 2013 Emily Cooley Lecture. *Transfusion (Paris).* oct 2014;54(10):2365-71.
72. Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev.* juill 2013;27(4):167-78.
73. King M-J, Garçon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, et al. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol.* juin 2015;37(3):304-25.

74. Barcellini W, Bianchi P, Fermo E, Imperiali FG, Marcello AP, Vercellati C, et al. Hereditary red cell membrane defects: diagnostic and clinical aspects. *Blood Transfus.*juill 2011;9(3):274-7.
75. Joncas F-H, Adjibade P, Mazroui R. Rôle de l' *heme regulated inhibitor* (HRI) dans la résistance à l'apoptose. *médecine/sciences.* oct 2014;30(10):882-8.
76. Farrugia A. Albumin usage in clinical medicine: tradition or therapeutic? *Transfus Med Rev.* janv 2010;24(1):53-63.
77. Nicholson JP, Wolmarans MR, Park GR. The role of albumin in critical illness.*Br J Anaesth.*oct 2000;85(4):599-610.
78. Yedgar S, Carew TE, Pittman RC, Beltz WF, Steinberg D. Tissue sites of catabolism of albumin in rabbits. *Am J Physiol.* janv 1983;244(1):E101-107.
79. Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med.* déc 2013;65:244-53.
80. Polito C, Martin GS. Albumin: Physiologic and Clinical Effects on Lung Function. *Minerva Anesthesiol.* oct 2013;79(10):1180-6.
81. Barone G, Giancola C, Verdoliva A. DSC studies on the denaturation and aggregation of serum albumins. *Thermochim Acta.* 1 mai 1992;199:197-205.
82. Haynes GR, Navickis RJ, Wilkes MM. Albumin administration--what is the evidence of clinical benefit? A systematic review of randomized controlled trials. *Eur J Anaesthesiol.* oct 2003;20(10):771-93.
83. Tullis JL. Albumin. 2. Guidelines for clinical use. *JAMA.* 31 janv 1977;237(5):460-463 concl.
84. Shahian M, Moslehi MA. Effect of albumin administration prior to exchange transfusion in term neonates with hyperbilirubinemia--a randomized controlled trial.*Indian Pediatr.*mars 2010;47(3):241-4.
85. Heyl JT, Gibson JG, Janeway CA, Shwachman A, Wojcik L. STUDIES ON THE PLASMA PROTEINS. V. THE EFFECT OF CONCENTRATED SOLUTIONS OF HUMAN AND BOVINE SERUM ALBUMIN ON BLOOD VOLUME AFTER ACUTE BLOOD LOSS IN MAN1. *J Clin Invest.* nov 1943;22(6):763-73.
86. Sánchez-Brunete JA, Dea MA, Rama S, Bolás F, Alunda JM, Raposo R, et al. Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis with Amphotericin B in Stable Albumin Microspheres. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 sept 2004;48(9):3246-52.
87. Brezis M, Heyman S, Sugar A. Reduced Amphotericin Toxicity in an Albumin Vehicle. *J Drug Target.* 1 janv 1993;1(3):185-9.

88. Aramwit P, Yu BG, Lavasanifar A, Samuel J, Kwon GS. The effect of serum albumin on the aggregation state and toxicity of amphotericin B. *J Pharm Sci.* 1 déc 2000;89(12):1589-93.

Annexes

Annexe 1 :

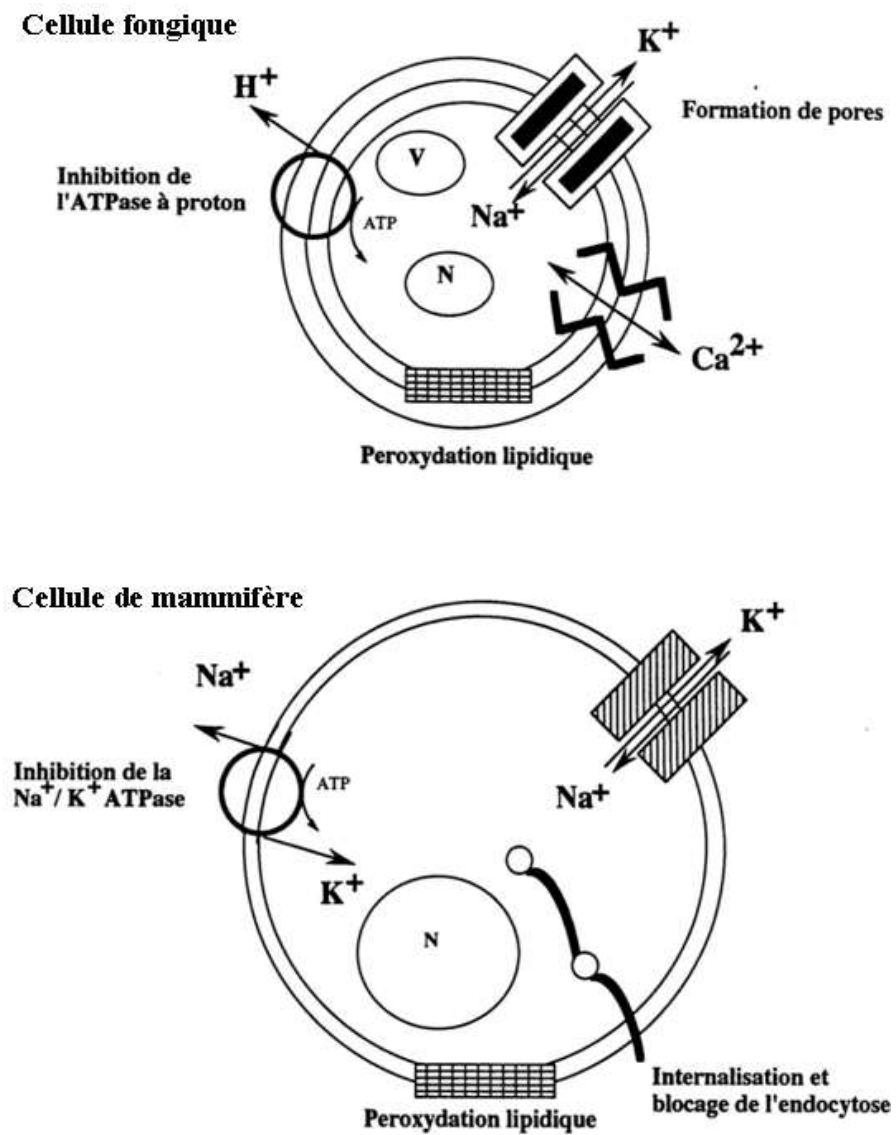


Figure : Toxicité cellulaire de l'amphotéricine B.

Annexe 2 :

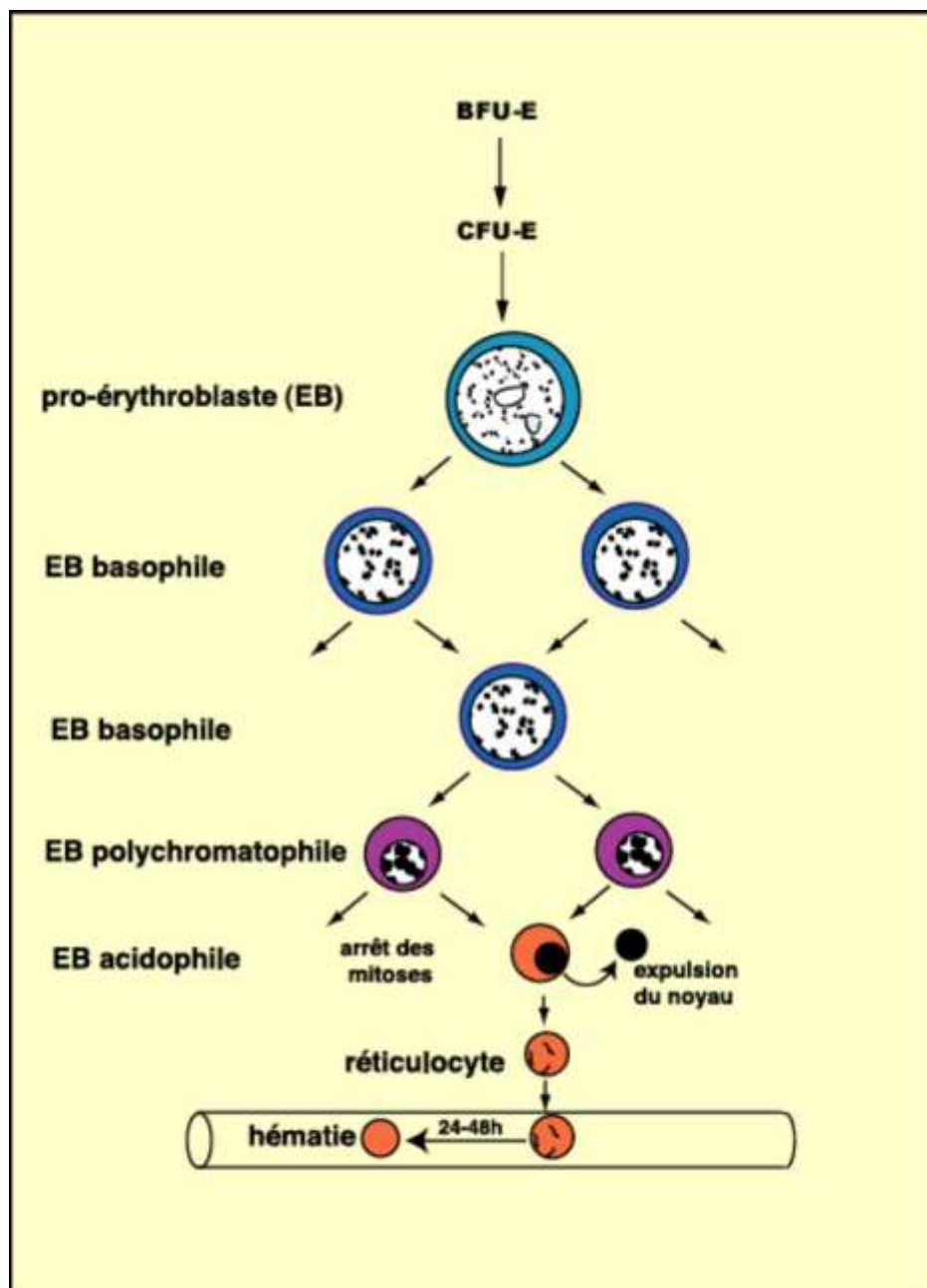
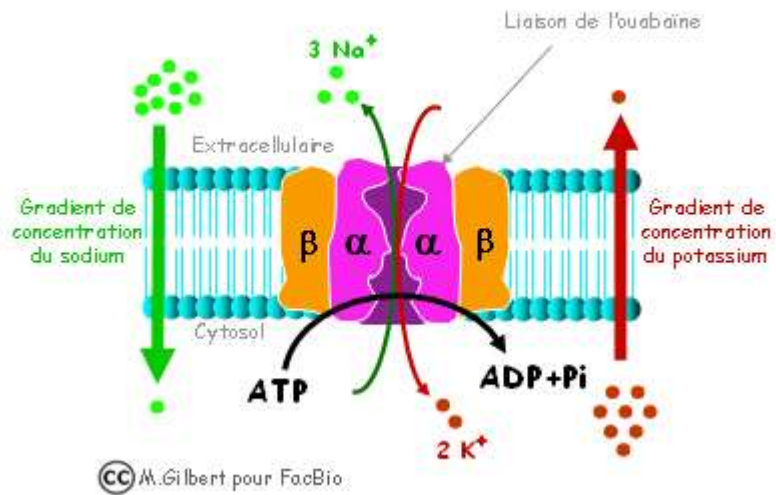


Figure : Erythropoïèse.

Annexe 3 :

FONCTIONNEMENT DE LA POMPE Na^+/K^+ ATPase



ملخص:

يبقى فونجيزون مضاد الفطريات الأفضل إلا أن سميته الكبيرة خاصة تأثيره على الكلى يحد من استعماله. من خلال هذه الدراسة نبحت عن تركيبة فونجيزون التي تسمح بتوسيع المؤشر العلاجي له ذلك بتقليل نسبة سميته دون التأثير على نشاطه. توصلنا من خلال النتائج إلى أن مصال الالبومين يؤدي إلى التقليل من سمية فونجيزون على الكريات الدموية الحمراء، من خلال التقليل من نسبة التحلل الدموي ونفاذية شوارد البوتاسيوم.

الكلمات المفتاحية: فونجيزون، كرية الدم الحمراء، التحلل الدموي، ألبومين.

Résumé :

L'amphotericine deoxycholate (Fungizone®) reste l'antifongique de référence pour la plupart des infections fongiques systémiques.

La toxicité de ce médicament est importante et est centré sur l'atteinte rénale ce qui limite son utilisation.

Notre travail est une recherche de formulation de la Fungizone® visant à améliorer l'indexe thérapeutique par diminution de sa toxicité sans altère son activité.

Les résultats retrouvent que la sérum albumine humaine réduit la toxicité de l'Am B sur les globules rouge illustrée par la diminution du taux d'hémolyse et la perméabilité des ions K⁺.

Cette étude a apporté la preuve de l'effet protecteur de l'albumine contre la toxicité de la Fungizone® sur le globule rouge.

Mots clés : Fungizone®, Globule rouge, Hémolyse, Albumine.

Abstract:

The amphotericine deoxycholate (Fungizone®) stays the principal antifungal; it's one of reference for most systemic fongics infections.

The toxicity of this drug is important and set centered on the renal attack what limits its utilisation.

Our work is a search for formulation of Fungizone, which the purpose is that to crease its therapeutic index; to decrease its toxicity without deteriorates its activity. The results find that the serum human albumin decreases the toxicity of Am B on the globules red illustrated by the reduction of hemolysis and the permeability of the K⁺ ions.

This study has brings the proof of the protective effect of albumin against toxicity of Fungizone® on the red globule.

Key words: Fungizone®, Red blood cell, Hemolysis, Albumin.

