

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD
FACULTE DE MEDECINE
DR. B. BENZERDJEB - TLEMCEEN

وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي

جامعة أبو بكر بلقايد
كلية الطب
د. ب. بن زرجب - تلمسان

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE POUR
L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

THÈME :

**QUELQUES TESTS DE TOXICITE DU
GLUCANTIME®**

Présenté par :

Mr. BELHACHEM AbdelAli

Mr. MANSOUR BENAOUF Yahia

Soutenu le : 23/06/2013.

LE JURY :

ENCADREUR:

Dr. N. BRIKCI NIGASSA

Maitre assistante en Biophysique

PRESIDENT:

Pr. A. BABA AHMED

Professeur en Biophysique

MEMBRES :

Dr. N. ABOURIJAL

Maitre assistante en Toxicologie

Dr. D. BENYAHIA

Maitre assistante en Parasitologie

Dr. B. BENALAL

Maitre assistante en Biophysique

Dr. B. BENABADJI

Chef de service de Microbiologie

REMERCIEMENT

A notre directeur de thèse,

Madame le Docteur N. BRIKCI NIGASSA

Maitre assistante en Biophysique

*Nous vous remercions d'avoir été à l'initiative de ce travail.
Vous nous avez guidés dans l'élaboration de cette thèse par votre
grande disponibilité, vos conseils et votre précieuse aide.
Merci de nous avoir fait partager vos connaissances, nous avons été
heureux de travailler avec vous et nous tenons à vous en remercier
sincèrement.*

Monsieur le Professeur BENYOUCEF

Chef de service de Biochimie

*Nous sommes reconnaissants de nous avoir accueillies au sein de
votre service tout en nous laissant une grande liberté de manœuvre
quant au déroulement et à l'organisation de notre propre démarche
scientifique.*

A notre Président de thèse,

Monsieur le Professeur ...BABAHMED

Chef département de pharmacie

*Nous vous remercions de nous faire l'honneur de présider le jury de
cette thèse,
Soyez assuré de notre profonde reconnaissance.*

A Docteur D.BENYAHIA,

Maitre assistante en Parasitologie,

*Nous vous remercions pour votre collaboration au cours de la
réalisation de ce travail, et pour le soutien et l'aide que vous avez
nous attribués.*

A toutes les personnes qui ont collaboré à l'élaboration de ce travail,

Le département de la pharmacie :

Un grand merci particulièrement au docteur ABOURIJAL, pour l'aide qu'il nous a rapporté. Merci pour votre aide et votre bonne humeur.

L'ensemble du personnel de service de Biochimie :

Un grand merci à Monsieur KHAOUANI, Mademoiselle Ilham et Mademoiselle Bouchama.

L'ensemble du personnel de CTS :

Un grand merci à Monsieur Boufeldja et Mademoiselle Fatima.

Nous exprimons notre gratitude aux Docteur CHABNI et Docteur SARI HASSOUNI pour leurs accueils, et pour le soutien et l'aide qu'ils nous ont attribués.

Aux résidentes, Docteur KADRI et Docteur DOUABI, nous vous remercions pour votre collaboration au cours de la réalisation de ce travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Dedicate:

My thanks and appreciations goes at first to my family;

my mom, my sisters;

Khadidja, Nadjat and Saliha;

***I wouldn't be here this day without you, without your support
and your help in every step of my life; you may help me in every way***

how a person can be helped

So thank you for everything

***I dedicate this project to my best friends; Noor, Mokha, Amine
and Sido, thank you for your support during my college life's***

experience

***And to my friends from high school who still support and
helping me till now, for Chahi, Téma, Pédro and Aicha... for all of
you thank you for every moment and every smile that made my life***

even better

***Finally to my classmates 2007, I couldn't be more honors to
share this past experience with you.***

*Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire
et de réfléchir, la
force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le
bonheur
de lever mes mains vers le ciel et de dire
" Ya Kayoum "*

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole
de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à
ma mère Oum El Kheire*

*A mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant
toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie
à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.*

Que dieu les gardes et les protège.

A mes sœurs et frèrest.

A mon binom AbdeAli.

*A tous ceux qui me sont chères... Maria, Lokmane, Haroune,
Zakaria, Meriem, Sohaib et OMAR.*

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

Je dédie ce travail.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	02
PREMIERE PARTIE ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	03
I. LEISHMANIOSE	04
1.1. <i>DÉFINITION</i>	04
1.2. <i>HISTORIQUE</i>	04
1.3. <i>RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE ET SITUATION ÉPIDÉMIologique</i>	05
1.3.1. <i>EN ALGERIE</i>	05
1.3.2. <i>A TLEMCCEN</i>	09
1.4. <i>LE CYCLE ÉVOLUTIF DE VIE DU PARASITE</i>	10
1.5. <i>CLASSIFICATION</i>	10
1.6. <i>LE PARASITE</i>	10
1.6.1. <i>FORME ET STRUCTURE</i>	11
1.6.1.2. <i>LES AMASTIGOTES</i>	11
1.6.1.1. <i>LES PROMASTIGOTES</i>	12
1.6.2. <i>VECTEUR</i>	12
1.6.3. <i>RESERVOIR</i>	12
1.7. <i>PATHOGÉNICITÉ</i>	12
1.8. <i>CLINIQUE</i>	13
□ <i>LEISHMANIOSE VISCERAL</i>	13
□ <i>LEISHMANIOSE CUTANEE</i>	13
1.9. <i>DIAGNOSTIC</i>	14
1.10. <i>TRAITEMENTS</i>	14
1.10.1. <i>LES TRAITEMENTS PHYSIQUES</i>	16
1.10.2. <i>LES TRAITEMENTS MEDICAMENTEUX</i>	16
II. GLUCANTIME	18
1. <i>PRÉSENTATION</i>	18
2. <i>CLASSE THÉRAPEUTIQUE</i>	18
3. <i>STRUCTURE CHIMIQUE</i>	18
4. <i>PROPRIÉTÉS PHYSIQUES</i>	19
5. <i>POSOLOGIE</i>	19
6. <i>INDICATION</i>	20
6.1. <i>LEISHMANIOSE VISCERALE</i>	20
6.2. <i>LEISHMANIOSE CUTANEE</i>	20
7. <i>MODE ET PRECAUTIONS D' ADMINISTRATION</i>	21
7.1. <i>LA VOIE INTRAMUSCULAIRE PROFONDE</i>	21
7.2. <i>LES INJECTIONS INTRAVEINEUSES</i>	22
8. <i>CONTRE INDICATION</i>	22
9. <i>PRECAUTIONS D'EMPLOI</i>	22
10. <i>TOLERANCE DU PRODUIT</i>	23
11. <i>INTERACTION</i>	23
12. <i>EFFETS INDÉSIRABLES</i>	24
13. <i>CARACTERISTIQUES PHARMACOLOGIQUES</i>	24
13.1. <i>CINETIQUE</i>	24
13.1.1. <i>ABSORPTION</i>	24
13.1.2. <i>DISTRIBUTION</i>	24
13.1.3. <i>METABOLISME</i>	25
13.1.4. <i>DEMI-VIE ET ELIMINATION</i>	25

.13.2.	<u>MODE D'ACTION</u>	25
.13.3.	<u>TOXICITE</u>	25
.13.4.	<u>EFFETS CLINIQUES</u>	26
.13.4.1.	<u>INTOXICATION AIGUE</u>	26
.13.4.2.	<u>INTOXICATION CHRONIQUE</u>	26
.13.5.	<u>DESCRIPTION ANALYTIQUE DES EFFETS TOXIQUE</u>	26
.14.	<u>TRAITEMENT</u>	28
III.	<u>GLOBULES ROUGES</u>	29
3.1.	<u>DEFINITION</u>	29
3.2.	<u>PARTICULARITÉ DU GR</u>	29
3.3.	<u>COMPOSITION DE LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE</u>	30
3.3.1.	<u>LES LIPIDES</u>	30
3.3.2.	<u>PHOSPHOLIPIDES</u>	30
3.3.3.	<u>CHOLESTEROL</u>	31
3.4.	<u>LES PROPRIETES PHYSIQUE DE LA MEMBRANE</u>	32
3.4.1.	<u>LA DEFORMABILITE DU GLOBULE ROUGE</u>	32
3.4.1.1.	<u>LA FORME DE LA CELLULE</u>	32
3.4.1.2.	<u>LA VISCOSITE INTRA-CYTOPLASMIQUE</u>	32
3.4.1.3.	<u>LA MEMBRANE</u>	32
3.4.2.	<u>LES ECHANGES TRANSMEMBRANAIRES</u>	32
3.5.	<u>MÉTHODES D'ÉTUDE DES GLOBULES ROUGES</u>	35
IV.	<u>L'HÉMOLYSE</u>	38
4.1.	<u>DEFINITION</u> :.....	38
4.2.	<u>HEMOLYSE PHYSIOLOGIQUE</u>	38
1.	<u>MODIFICATION DE LA FORME (MODIFICATION DU METABOLISME ENERGETIQUE)</u> :.....	38
2.	<u>SIEGE DE L'HEMOLYSE PHYSIOLOGIQUE</u> :.....	38
4.3.	<u>HEMOLYSE PATHOLOGIQUE</u>	39
4.3.1.	<u>MECANISME</u>	39
4.4.	<u>LES MARQUEURS BIOLOGIQUES DE L'HEMOLYSE</u>	40
4.5.	<u>PARAMETRES BIOLOGIQUES AU COURS DE NOTRE ETUDE SONT</u> :.....	40
4.5.1.	<u>POTASSIUM</u>	40
4.5.2.	<u>LACTATE DESHYDROGENASE</u>	40
4.5.3.	<u>LACTATE</u>	41
4.5.3.1.	<u>METABOLISME DU LACTATE</u>	41
4.5.3.2.	<u>VOIES METABOLIQUES DU LACTATE</u>	41
4.5.3.3.	<u>LE CATABOLISME DU GLUCOSE: LA GLYCOLYSE</u>	42
4.5.3.4.	<u>LE DEVENIR DU PYRUVATE</u>	42
4.5.3.5.	<u>TECHNIQUE DE DOSAGE</u>	42
4.5.4.	<u>LES PROTEINES TOTALES</u>	42
4.5.4.1.	<u>METHODE DE DOSAGE DES PROTEINES TOTALES : METHODE DE LOWRY</u>	43
4.5.5.	<u>HEMOGLOBINE</u>	44
	<u>DEUXIEME PARTIE ETUDE EXPERIMENTALE</u>	45
I.	<u>PRINCIPE DE LA RÉALISATION</u>	46
1.1.	<u>PROTOCOLE DE L'ETUDE</u>	46
1.1.1.	<u>Problématique</u>	46
1.1.2.	<u>Objectifs</u>	46
1.1.3.	<u>Type d'étude</u>	46
II.	<u>MATERIELS ET REACTIFS DE TRAVAIL</u>	47
2.1.	<u>Matériels du laboratoire</u>	47

□	<u>Ionogramme:</u>	47
□	<u>Agitateur: pour l'homogénéisation des suspensions du travail.</u>	47
□	<u>Vortex : est utilisé pour mieux mélanger les solutions de travail.</u>	47
□	<u>Autres matériels :</u>	47
2.2.	<u>Réactifs et solutions de travaux</u>	48
2.2.1.	<u>Solution de lavage glacée</u>	48
□	<u>Solution de chlorure de sodium NaCl :</u>	48
□	<u>Solution de MgCl₂ :</u>	48
2.2.2.	<u>Tampon PBS</u>	48
	<u>Tampon PBS : Tampon Phosphate Salin</u>	50
	<u>Préparation de la solution tampon :</u>	50
2.2.3.	<u>LDH pyruvate</u>	51
2.2.4.	<u>Les réactifs de dosage des protéines totales</u>	52
III.	<u>MODE OPÉRATOIRE</u>	53
I.	<u>LA DOSE DU GLUCANTIME : 75µL</u>	53
II.	<u>DOUBLE DOSE : 150µL</u>	57
IV.	<u>RESULTATS DE L'ETUDE</u>	60
1.	<u>LES TESTS A DOSE 75 µ</u>	60
2.	<u>LES TESTS A DOSE 150 µL</u>	76
V.	<u>DISCUSSION</u>	115
	<u>CONCLUSION</u>	119
	<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIES</u>	121
	<u>ANNEXES</u>	126

Liste des abréviations

C14 : Carbone 14

Chr : chromosome

CPs : cystine proteases

DDV : durée de vie

DPA : dérivés pentavalents de l'antimoine

DSP : direction de santé publique

Er : Erythrocytes

Fig : figure

GR : globules rouge

Hb : Hémoglobine

K+ : Potassium

L : leishmaniose

LCD : leishmaniose cutanée diffuse

LCL : leishmanioses cutanées localisées

LCM : leishmaniose cutanéomuqueuse

LPG : lipophosphoglycane

LV : leishmaniose viscérale

MCT: transporteur de monocarboxylate

mEq : milliequivalent

Na+: Sodium

NO : monoxyde d'azote

NT1 : transporteur de nucléoside

OMS : organisation mondiale de santé

PGE2 : prostaglandine

Spp : espèce

L = litre

dL = décilitre (1 x 10⁻¹)

mL = millilitre (1 x 10⁻³)

μl = microlitre (1 x 10⁻⁶)

nl = nanolitre (1 x 10⁻⁹)

pl = picolitre (1 x 10⁻¹²)

fl = femtolitre (1 x 10⁻¹⁵)

mmol = millimole

μmol = micromole

nmol = nanomole

pmol = picomole

fmol = femtomole

fl = femto litre

g = gramme

mg = milligramme

μg = microgramme

ng = nanogramme

pg = picogramme

fg = femtogramme

kg = kilogramme

Liste des tableaux

Tableau I : Évolution des fréquences de déclarations des cas de leishmanioses	7
Tableau II : Répartition des cas de leishmaniose.....	9
Tableau III: Valeurs normales par litre.....	30
Tableau IV: Propriété physico-chimique du NaCl	49
Tableau V: Propriété physico-chimique du MgCl ₂	49
Tableau VI: Résultats d'absorptions	58
Tableau VII: Calcule $\Delta A/\text{min}$ et [LDH].	58
Tableau VIII: Pourcentages d'hémolyse des tests	113

Liste des figures

Figure 1: Cas de leishmaniose viscéral en Algérie	5
Figure 2: Cas de leishmaniose cutanée en Algérie	6
Figure 3: Cycle de vie de parasite	10
Figure 4: La forme promastigote.	11
Figure 5: La forme amastigote.	11
Figure 6: Leishmaniose cutanée	16
Figure 7: Leishmaniose cutanée	16
Figure 8: Leishmaniose cutanée	16
Figure 9: Antimoniote de méglumine	19
Figure 10: Les échanges transmembranaires.....	39
Figure 11: Test 01 [K ⁺].	62
Figure 12: Test 01 [LDH].....	62
Figure 13: Test 02 [K ⁺].....	63
Figure 14: Test 02 [LDH].....	63
Figure 15: Test 03 [K ⁺].....	64
Figure 16: Test 03 [LDH].....	64
Figure 17: Test 04 [K ⁺].....	65
Figure 18: Test 04 [LDH].....	65
Figure 19: Test 05 [K ⁺].....	66
Figure 20: Test 05 [LDH].....	66
Figure 21: Test 06 [K ⁺].....	67
Figure 22: Test 06 [LDH].....	67
Figure 24: Test 07 [LDH].....	68
Figure 25: Test 08 [K ⁺].....	69
Figure 26: Test 08 [LDH].....	69
Figure 27: Test 09 [K ⁺].....	70
Figure 28: Test 09 [LDH].....	70
Figure 29: Test 10 [K ⁺].....	71
Figure 30: Test 10 [LDH].....	71
Figure 31: Test 11 [K ⁺].....	72
Figure 32: Test 11 [LDH].....	72
Figure 33: Test 12 [K ⁺]	73
Figure 34: Test 12 [LDH].....	73
Figure 35: Test 13 [K ⁺].....	74
Figure 36: Test 13 [LDH].....	74
Figure 37: Test 14 [K ⁺].	75
Figure 38: Test 14 [LDH].....	75

Figure 39: Test 15 [K ⁺]	76
Figure 40: Test 15 [LDH]	76
Figure 41: Test 01 [K ⁺]	79
Figure 42: Test 01 [LDH]	79
Figure 43: Test 02 [K ⁺]	80
Figure 44: Test 02 [LDH]	80
Figure 45: Test 03 [K ⁺]	81
Figure 46: Test 03 [LDH]	81
Figure 47: Test 04 [K ⁺]	82
Figure 48: Test 04 [LDH]	82
Figure 49: Test 05 [K ⁺]	83
Figure 50: Test 05 [LDH]	83
Figure 51: Test 06 [K ⁺]	84
Figure 52: Test 06 [LDH]	84
Figure 53: Test 07 [K ⁺]	85
Figure 54: Test 07 [LDH]	85
Figure 55: Test 08 [K ⁺]	86
Figure 56: Test 08 [LDH]	86
Figure 57: Test 09 [K ⁺]	87
Figure 58: Test 09 [LDH]	87
Figure 59: Test 10 [K ⁺]	88
Figure 60: Test 10 [LDH]	88
Figure 61: Test 11 [K ⁺]	89
Figure 62: Test 11 [LDH]	89
Figure 63: Test 12 [K ⁺]	90
Figure 64: Test 12 [LDH]	90
Figure 65: Test 13 [K ⁺]	91
Figure 66: Test 13 [LDH]	91
Figure 67: Test 14 [K ⁺]	92
Figure 68: Test 14 [LDH]	92
Figure 69: Test 15 [K ⁺]	93
Figure 70: Test 15 [LDH]	93
Figure 71: Test 16 [K ⁺]	94
Figure 72: Test 16 [LDH]	94
Figure 73: Test 17 [K ⁺]	95
Figure 74: Test 18 [K ⁺]	96
Figure 75: Test 19 [K ⁺]	97
Figure 76: Test 20 [K ⁺]	98
Figure 77: Test 01 [K ⁺]	101
Figure 78: Test 01 [Protéines]	101

Figure 79: Test 02 [K ⁺]	102
Figure 80: Test 02 [Protéines]	102
Figure 81: Test 03 [K ⁺]	103
Figure 82: Test 03 [Protéines]	103
Figure 83: Test 04 [K ⁺]	104
Figure 84: Test 04 [Protéines]	104
Figure 85: Test 05 [K ⁺]	105
Figure 86: Test 05 [Protéines]	105
Figure 87: Test 06 [K ⁺]	106
Figure 88: Test 06 [Protéines]	106
Figure 89: Test 07 [K ⁺]	107
Figure 90: Test 07 [Protéines]	107
Figure 91: Test 08 [K ⁺]	108
Figure 92: Test 08 [Protéines]	108
Figure 93: Rapport 01 [K ⁺] / [Protéines]	109
Figure 94: Rapport 02 [K ⁺] / [Protéines]	109
Figure 95: Rapport 03 [K ⁺] / [Protéines]	110
Figure 96: Rapport 04 [K ⁺] / [Protéines]	110
Figure 97: Rapport 05 [K ⁺] / [Protéines]	111
Figure 98: Rapport 06 [K ⁺] / [Protéines]	111
Figure 99: Rapport 07 [K ⁺] / [Protéines]	112
Figure 100: Rapport 08 [K ⁺] / [Protéines]	112
Figure 101: Test 01 [Hb]	113
Figure 102: Test 02 [Hb]	113
Figure 103: Test 03 [Hb]	114
Figure 104: Test 04 [Hb]	114
Figure 105: comparaison 1 ^{ère} dose/ 2 ^{ème} dose	116
Figure 106: comparaison 1 ^{ère} dose/ 2 ^{ème} dose	116

Résumé :

Les leishmanioses sont des infections parasitaires communes à l'homme et à certains animaux, engendrées par un protozoaire flagellé du genre leishmania. Il s'agit d'un groupe de maladies extrêmement divers tant sur le plan clinique qu'épidémiologique

L'antimoniote de méglumine ou Glucantime® reste le traitement de première intention de la leishmaniose en Algérie, administré par voie locale ou parentérale (IM IV). Les effets toxiques due à cette molécule sont très fréquents même à des doses thérapeutique en raison de sa marge thérapeutique étroite (si on augmente la dose la toxicité augmente, et si on diminue la dose la sensibilité n'est pas atteint).L'hospitalisation du malade est obligatoire au cours du traitement, pour le suivit biologique (LDH, hémoglobine...) et clinique.

Ce travail est effectué au niveau du service de BIOCHIMIE CHU Tlemcen pendant une période de 9 mois,qui représente une étude analytique prospective concernant l'évaluation de la toxicité hématologique du Glucantime® : l'hémolyse, en basant sur des tests *in vitro* porté sur le sang d'un sujet sain.

Ces tests sont réalisés sur des préparations cellulaires : globule rouge, en les mettant au contact avec la molécule en mesurant les concentrations des différent paramètres du globule rouge (K⁺, LDH, protéines, hémoglobine)

Mots clés :

Globule rouge, hémolyse, pompe Na⁺/K⁺ ATPase, K⁺, LDH, protéines, hémoglobine, toxicité du Glucantime®.

Summary:

Leishmaniasis is a parasitic infection caused by a flagellate protozoan of the genus *Leishmania* and is common in both humans and animals. This disease is an extremely diverse in both clinical and epidemiological.

Meglumine antimoniate or Glucantime® remains the first-line treatment of leishmaniasis in Algeria, it is administered by injection. Toxic effects due to this drug are very common even at therapeutic doses because of its narrow therapeutic range (if the dose is increased toxicity increases, and if the dose is not reached sensitivity is reduced). The hospitalization of the patient is required during treatment, followed by biological (LDH, hemoglobin ...) and clinic.

This work is performed at the Biochemistry Service at Tlemcen University Hospital for a period of 9 months, which is a prospective analytical study on the evaluation of hematologic toxicity Glucantime ®: hemolysis, based on *in vitro* tests carried out on the blood of a healthy subject.

These tests are performed on cell preparations: red blood cells, putting them in contact with the molecule by measuring the concentrations of the different parameters of the red blood cell (K, LDH, protein, hemoglobin)

Keywords:

Red blood cell, hemolysis, pump Na / K ATPase, K, LDH, protein, hemoglobin, toxicity Glucantime ®.

INTRODUCTION

Les leishmanioses sont endémiques en Algérie. La conséquence directe de leur recrudescence alarmante dans ce pays depuis la fin des années 1990 a entraîné une forte demande de diagnostic au laboratoire de cette affection. L'incidence des leishmanioses est en augmentation dans le monde, atteignant deux millions de nouveaux cas par an. Cette situation alarmante résulte de l'augmentation de la transmission vectorielle et pour la LV, de l'augmentation du réservoir humain du fait du sida.

Chez l'homme les leishmanioses sont des maladies à déclaration obligatoire. De part son extension à différentes régions du pays, la leishmaniose est devenue, un véritable problème de santé publique.

Les antimoniés représentent le traitement de première intention de la plupart des formes cliniques en raison de leur disponibilité et de leur moindre coût.

L'antimoniote de méglumine est commercialisé en sous le nom de Glucantime®. Le mode d'administration et la toxicité expliquent les nombreux effets indésirables de l'antimoniote de méglumine. La nécessité d'une asepsie rigoureuse, d'une bonne maîtrise technique et les modalités de surveillance justifient une hospitalisation.

Des manifestations hématologiques sont fréquents, l'hémolyse qui est l'objectif de notre travail : étude des effets toxiques de Glucantime® sur la globule rouge par le dosage des différents paramètres biologique de l'hémolyse (potassium, LDH, protéines cellulaires, hémoglobine).

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :

- ✓ LA LEISHMANIOSE
- ✓ LE GLUCANTIME®
- ✓ LA GLOBULE ROUGE

I. LEISHMANIOSE

1.1. DÉFINITION

Les leishmanioses sont un groupe de maladies dues à des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania*. Ces parasites affectent de nombreuses espèces de mammifères, dont l'Homme, auxquelles ils sont transmis par la piqûre infestant d'un insecte, le phlébotome femelle. Les leishmanies possèdent des tropismes distincts pour les organes profonds, la peau et les muqueuses de la face. Largement répandues à la surface du globe présent sur les quatre continents, elles affectent 88 pays, dont 72 parmi les plus faiblement développés. [1]

1.2. HISTORIQUE

Les leishmanioses étaient connues depuis longtemps, elles représentaient des entités nosologiques bien décrites lorsque agents pathogénies ont été découverts.

La première description clinique moderne est celle de Mac-Naught en 1882.

Cunningham en 1885 qui découvrit les parasites intra cellulaires à l'intérieur de macrophages d'une lésion cutanée.[2].

En 1900, Sir William LEISHMAN eut découvert l'agent de la leishmaniose dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-Dum en Inde ; c'est de kala-azar.[2].

A partir de Mars 1995, les leishmanioses sont devenues des maladies à déclaration obligatoire ce qui a permis une meilleure connaissance de leur profil épidémiologique à l'échelle nationale. [2].

En effet, Belazzoug signalait déjà la présence de 21 cas de leishmaniose viscérale à Biskra, foyer de leishmaniose cutanée, en 1986. D'autres cas continuent à être signalés dans le Hoggar et dans le Tassili N'ajjar. [5].

La leishmaniose cutanée décrite pour la première fois par Hamel en 1860, sévit à l'état endémo-épidémique sur toute la frange nord saharienne correspondant à l'étage bioclimatique aride et semi-aride.[5].

1.3. RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE ET SITUATION ÉPIDÉMIOLOGIQUE

En Algérie :

À côté des anciens foyers (Tizi Ouzou, Constantine, Jijel, Mila, Boumerdès et Médéa), de nouveaux sont apparus. Il s'agit d'Annaba et de Collo à l'Est, de Blida, Cherchell, Ténès et Chleff au centre et de Tlemcen et Oran à l'Ouest

Leishmaniose viscérale

Cas de Leishmaniose Viscérale Années 2000 à 2004 (Total = 715)

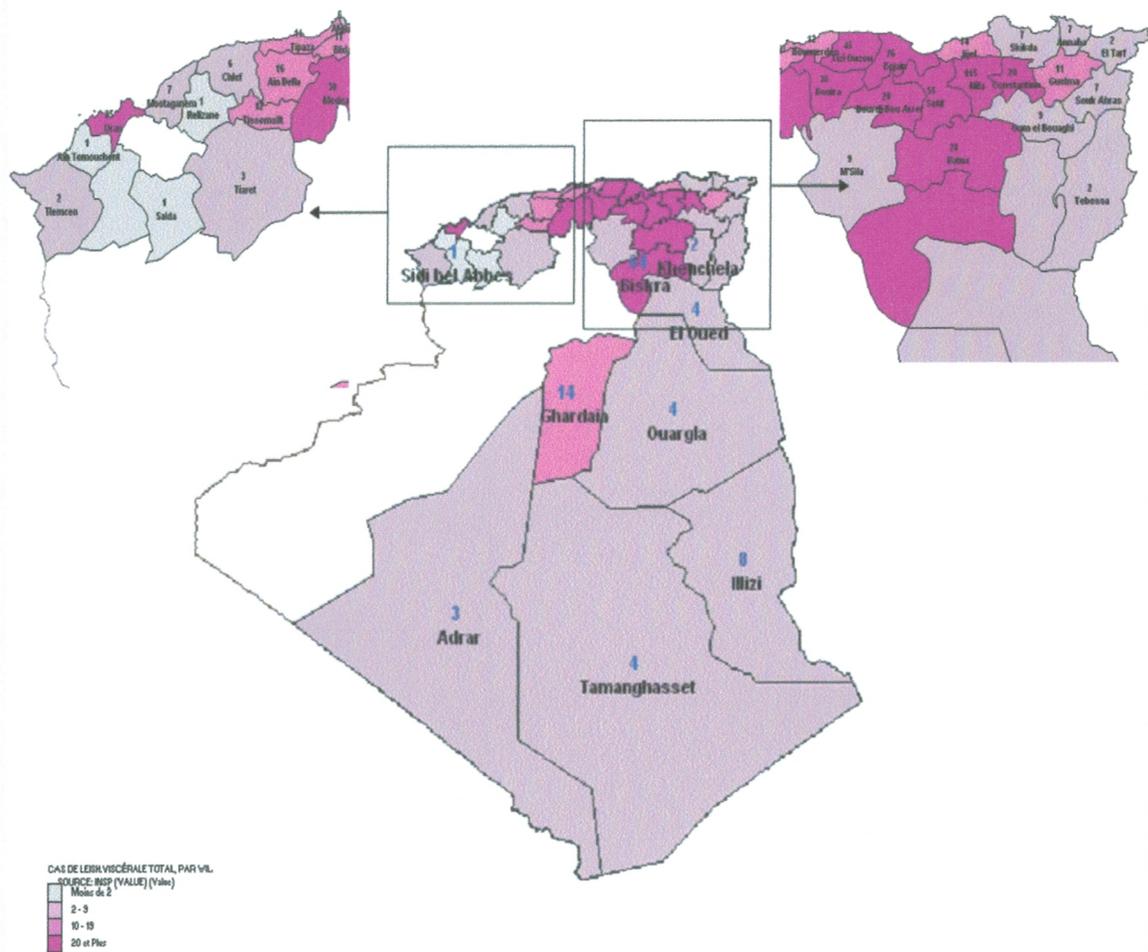


Figure 1 : Cas de leishmaniose viscéral en Algérie
(Source : INSP)

Leishmaniose cutanée :

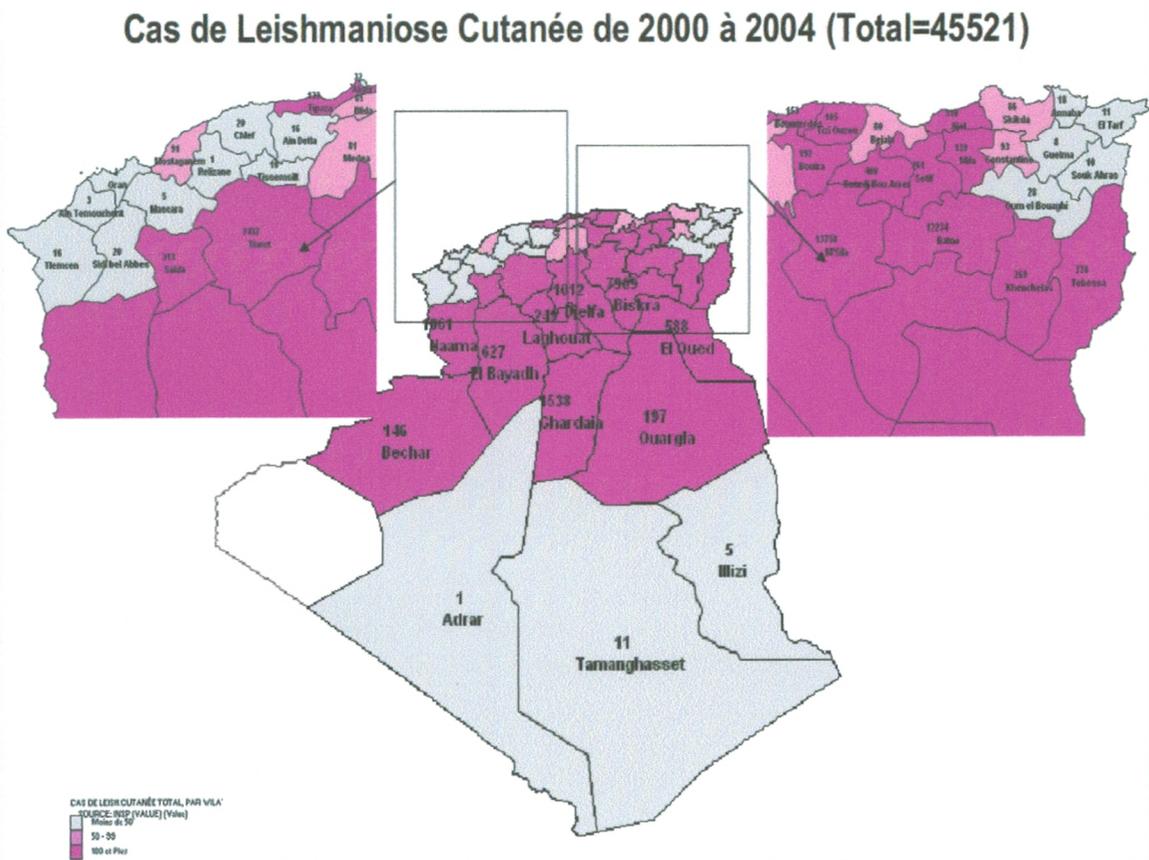


Figure 2 : Cas de leishmaniose cutanée en Algérie
(Source : INSP)

1.3.1. A Tlemcen :

Les états endémo-épidémiques sont ceux dans les tableaux suivants :

Tableau I : Évolution des fréquences de déclarations de cas de leishmanioses pendant l'année 2012 :

COMMUNE	Fréquence	Pourcentage	Cumul
Indéterminé	2	2.4%	2.4%
AIN FETTAH	1	1.2%	3.6%
AIN TALOUT	2	2.4%	6%
AIN TEMOUCHENT	4	4.8%	10.8%
AINNFEZA	3	3.6%	14.5%
AMIEUR	2	2.4%	16.9%
BEN SEKRANE	1	1.2%	18.1%
BENI BOUSSAID	1	1.2%	19.3%
BENI OUARSOUS	1	1.2%	20.5%
BCHAR	2	2.4%	22.9%
CHETOUANE	4	4.8%	27.7%
DJEBALA	1	1.2%	28.9%
EL ARICHA	2	2.4%	31.3%
EL BAYADH	4	4.8%	36%
EL BOUIHI	9	10.8%	47%
EL FEHOUL	2	2.4%	49.4%
ELFEHOUL	1	1.2%	50.6%
HENNAYA	1	1.2%	51%
HONAINÉ	1	1.2%	53%
MAGHNIA	6	7.2%	60.2%
MEDJA	1	1.2%	65.1%

NAAMA	3	3.6%	65.1%
NEDROMA	1	1.2%	66.3%
OULED MIMOUN	1	1.2%	67%
OUM EL BOUAGUI	1	1.2%	68.7%
REMCHI	1	1.2%	69.9%
SEBDOU	3	3.6%	73.5%
SEBRA	4	4.8%	78.3%
SIDI ABDLI	2	2.4%	80%
SIDI BELABBES	1	1.2%	81.9%
TIARET	1	1.2%	83.1%
TLEMCEN	13	15.7%	98.8%
ZENATA	1	1.2%	100%
Total	83	100%	

Source : Service d'épidémiologie CHU Tlemcen

Tableau II : répartition des cas de leishmaniose

REPARTITION DES CAS DE LIESHMANIOSE PAR ANNEE.PAR EPSP ET PAR COMMUNE

ANNEE 2012

EPSP	COMMUNES	2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012		TOTAL	
		LIESHMANIOSE		LIESHMANIOSE		LIESHMANIOSE		LIESHMANIOSE		LIESHMANIOSE		LIESHMANIOSE		LIESHMANIOSE		LIESHMANIOSE		LIESHMANIOSE		LIESHMANIOSE	
		V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C
T L E M C E N	TLEMCEM		4		2		1										2			0	9
	MANSOURAH																			0	0
	TERNY																			0	0
	A/GHORABA																			0	0
	B/MESTER																			0	0
	CHETOUANE		1													1				0	2
	A/FEZZA																	2		0	2
	AMIEUR						1													0	1
	SEBRA																2		1	0	3
	BOUHLLOU																			0	0
TOTAL	0	5	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	3	0	17	
M A G H N I A	MAGHNAIA	2															2			2	2
	H/BOUGHRARA																			0	0
	B/BOUSAID																			0	0
	S/MEDJAHED																			0	0
	TOTAL	2	0	0	2	0	0	2	2												
B A S E L A S S I A	B/E/ASSA																			0	0
	SOUANI																			0	0
	S/TELATA																			0	0
	M/B/M'hidi																			0	0
	MSIRDA FOUGUA																			0	0
	TOTAL	0	0	0	0																
G H A Z A O U E T	GHAZAOUET			1																1	0
	SOUAHLIA																			0	0
	TINET																			0	0
	NEDROMA																1			1	0
	DJEBALA										1									1	0
	D/YAGHMORACENE																			0	0
	FILLAOCUCENE																			0	0
	A/KEBIRA																			0	0
	A/FETTAH																2			0	2
	TOTAL	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	3	2
R E M C H I	REMCHI	1						1												1	1
	B/OUARSSOUS										1									1	0
	EL FEHOUL																	1		0	1
	A/YOUCF																			0	0
	SEBAA CHIOUKH																			0	0
	HENNAYA						1													1	0
	ZENATA				1															0	1
	O/RIAH																			0	0
	HONAINE	1																		1	0
	B/KHELAD																			0	0
TOTAL	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	4	
S E B D O U	SEBDOU				1		1					1								0	3
	EL GOR																			0	0
	SIDI DJILLALI																			0	0
	EL BOUHI						162		2				2							0	166
	BENI SNOUS									4										0	4
	EL ARICHA					1						2	1							0	4
	EL AZAIL																			0	0
	BENI BAHDEL																			0	0
TOTAL	0	0	0	1	0	164	0	2	0	4	0	3	0	3	0	0	0	0	0	177	
O / M I M O U N	OULED MIMOUN						1		1											0	2
	BENI SMEIL			1																1	0
	OULED LAKHDAR																			0	0
	AIN TELLOUT																			0	0
	AIN NEHALA																			0	0
	BENSEKRANE																			0	0
	SIDI ABDELLI							2												0	2
	TOTAL	0	0	1	0	0	1	0	3	0	0	1	4								
TOTAL WILAYA	4	5	2	4	0	167	1	6	0	4	2	3	0	3	0	9	1	4	10	205	

Source : DSP

1.4. LE CYCLE ÉVOLUTIF DE VIE DU PARASITE

Au cours d'un repas sanguin le phlébotome ingère les forme amastigotes de *Leishmania*, ces dernière se transforment dans l'intestin de l'insecte en formes promastigotes qui se divisent par scissiparité et se fixent à l'épithélium intestinal, puis migrent vers la partie antérieure du tube digestif. Les promastigotes infestantes sont régurgitées lors d'un nouveau repas sanguin.

Après la pique ou elles vont parasiter les cellules du système réticulohistiocytaire dont les macrophages, une fois retrouvés en intra cellulaire elles se transforment en formes amastigotes et se multiplient par scissiparité. Le macrophage bourré d'amastigotes éclate et libère ces formes parasitaires qui vont parasiter autres macrophages saines, une partie des amastigote va être prise par un phlébotome lors d'un nouveau repas sanguin et le cycle recommence.[3]

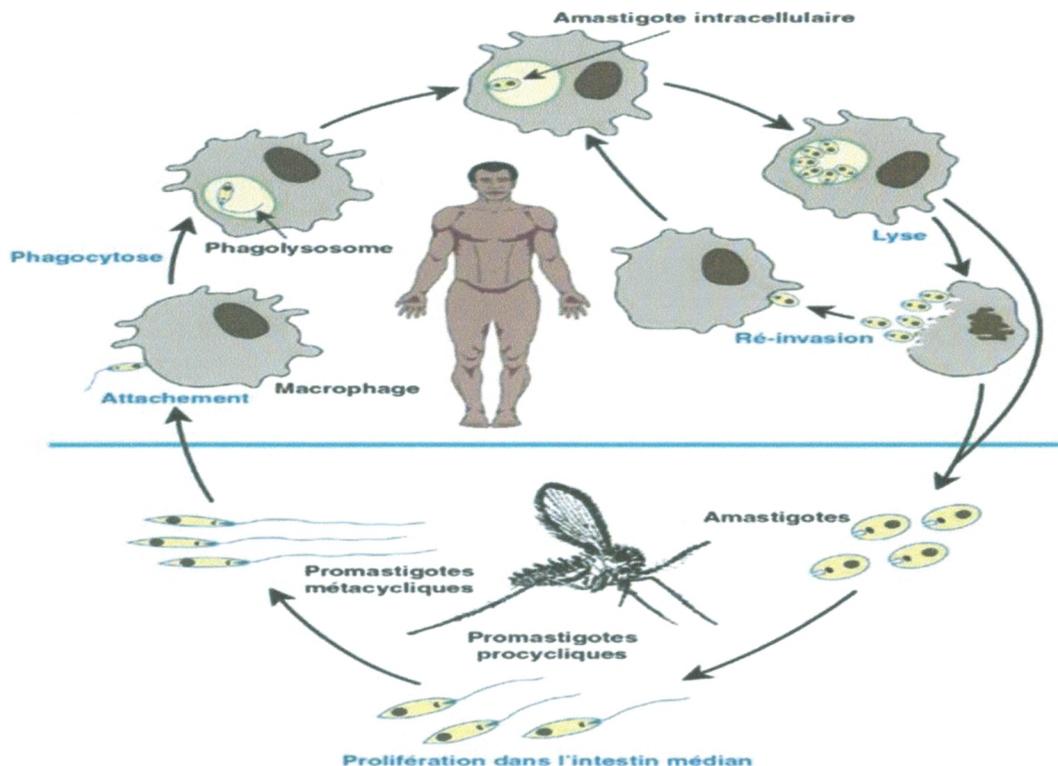


Figure 3: cycle de vie du parasite
(Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie)

1.5. CLASSIFICATION

- Règne : *Protista* (Heackel 1866)
- Embranchement : *Sarcomastigophora* (infantum et Balamuth 1963).
- Classe : *Zoomastigophora* (Calkins 1909).
- Ordre : *Kinetoplastida* (infantum 1963, Emend Vichekrman 1976).
- Famille: *Trypanosomatidae* (Dolffin 1901, Emend Grabben 1905).
- Genre: *Leishmania* (Ross 1903).

1.6. LE PARASITE

Dans le genre *Leishmania*, on distingue deux sous-genres définis par le site de développement du parasite chez le vecteur :

- Le sous-genre *Leishmania* est caractérisé par un développement suprapylorique (jonction intestin moyen-intestin postérieur du vecteur).
- le sous-genre *Viannia*, par un développement péripylorique (n'importe quel point de l'intestin).

En Algérie, les espèces responsables des deux formes cliniques appartiennent à deux complexes distincts, le complexe *Leishmania infantum* et le complexe *Leishmania major*.

La leishmaniose viscérale est due à *L. infantum*, ainsi que la leishmaniose cutanée du Nord, alors que la leishmaniose cutanée zoonotique est due à *L. major*. [3].

1.6.1. FORME ET STRUCTURE

Elles se présentent chez leurs hôtes successifs sous deux stades morphologiques principaux :

1.6.1.1. Les amastigotes :

est ovoïde, mesure 2 à 6 μ avec un noyau arrondi et un kinétoplaste en bâtonnet juxta-nucléaire.[6]

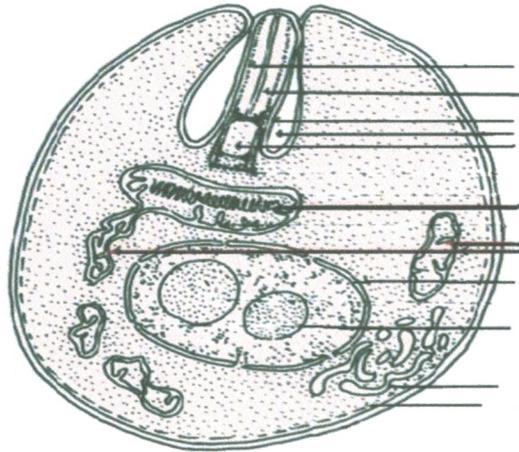


Figure 4: la forme amastigote
(Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie)

1.6.1.2. Forme promastigote :

Est allongée, mesure 10 à 25 μ de longueur avec un noyau central, un kinétoplaste antérieur et un flagelle libre antérieur. [4].

1.6.2. VECTEUR

Il représente un maillon important dans la chaîne de transmission.

C'est un insecte, diptère, nématocère de la famille des Psychodidae, sous-famille de Phlebotominae avec deux genres, Phlebotomus dans l'Ancien Monde et Sergentomyia dans le Nouveau Monde, dont seule la femelle est hématophage.

Les phlébotomes gâtent la journée dans les recoins sombres, sont actifs à la tombée du jour et piquent au niveau des zones découvertes du visage et des membres. [4].

1.6.3. RESERVOIR

Les leishmanies ont un spectre d'hôtes très large incluant des espèces sauvages, domestiques ou commensales. Certaines espèces de Leishmania sont limitées aux

mammifères inférieurs, les rongeurs, alors que d'autres sont adaptées aux mammifères carnivores et à l'homme.

En Algérie, la leishmaniose viscérale admet le chien comme réservoir, depuis les travaux des frères Sargent en 1910.

La leishmaniose canine concerne tout le territoire national avec une prévalence qui varie d'une région à une autre. Sa fréquence est passée de 11,4% (20) à 15,19 % et, au cours d'une enquête plus récente dans l'Algérois, réalisée à l'Institut Pasteur d'Algérie, cette fréquence était de 36,5 %. Parmi les chiens séropositifs, 25 % étaient asymptomatiques. [5].

1.7. PATHOGÉNICITÉ

D'après Banuls et al. (2007) : « Il apparaît que les différentes formes cliniques sont étroitement liées à la réponse immunitaire de l'hôte, spécialement à l'équilibre entre la réponse cellulaire et la réponse humorale. La nature du pathogène, particulièrement l'espèce, semble également être un facteur important. Cependant, la manière dont *Leishmania* est responsable des pathologies et pourquoi les symptômes cliniques sont si variables reste énigmatique ».

Ceci illustre le fait que de nombreux facteurs entrent en compte dans la genèse de la pathologie. [6].

1.8. CLINIQUE

Les leishmanioses se présentent sous trois formes cliniques, la leishmaniose viscérale, la leishmaniose cutanée et la leishmaniose cutanéomuqueuse.

En Algérie, on a deux formes cliniques :

1. Leishmaniose viscérale:

Elle touche dans 80% des enfants entre 1 et 4 ans, récemment des cas de LV ont été décrits chez le nourrisson entre 5 et 7 mois, avec une avancée vers le jeune adolescent jusqu'à 15 ans. Cette forme évolue en trois phases :

-Phase d'incubation : qui est silencieuse et dure 1 à 2 mois.

-Phase de début: elle est progressive, l'enfant dort mal et présente une pâleur, un amaigrissement et des accès fébriles.

-Phase d'état: caractérisée par une triade symptomatique qui associe :

Une fièvre élevée, anarchique, rebelle aux antipyrétiques, et qualifié de fièvre folle.

Une pâleur cutanéomuqueuse qui traduit l'anémie.

Une splénomégalie énorme, ferme, mobile et indolore de type IV considérée comme étant la plus grosse rate infantile.

Une hépatomégalie et parfois des adénopathies.

Des complications hémorragiques sous formes de pétéchies et purpura.

-L'évolution se fait vers la mort sans traitement.

La leishmaniose viscérale se présente chez l'adulte sous forme de tableau atypique ou incomplets ou prédomine un signe clinique.

Chez l'adulte la LV peut être associée ou non au SIDA et est marquée par la fièvre, les adénopathies et surtout les complications hémorragiques.[7]

2. Leishmaniose cutanée:

Elle détermine des lésions avec évolution chronique et peuvent guérir spontanément, mais qui laisse une cicatrice indélébile.

En Algérie, il existe deux entités nosoépidémiologiques différentes :

- La leishmaniose cutanée zoonotique : LCZ
- La leishmaniose cutanée du Nord : LCN

A- LCZ:

C'est une zoonose due à *Leishmania major* Mon 25, le parasite réalise une lésion ulcéro-croûteuse, parfois végétante. La lésion est unique ou multiple, siégeant au niveau des zones découvertes (la face et les membres). Evolue pendant 4 à 6 mois vers la guérison spontanée au prix d'une cicatrice indélébile. .[7]

B-LC du Nord:

Elle est due à *Leishmania infantum*, caractérisée par une lésion inflammatoire, le plus souvent unique qui siège au niveau de la face.

L'évolution est plus longue de 12 à 18 mois.[7]



Figure 6 : leishmaniose cutanée
(Laboratoire de parasitologie-mycologie, CHU Mustapha)



Figure 7: leishmaniose cutanée
(Laboratoire de parasitologie-mycologie, CHU Mustapha)

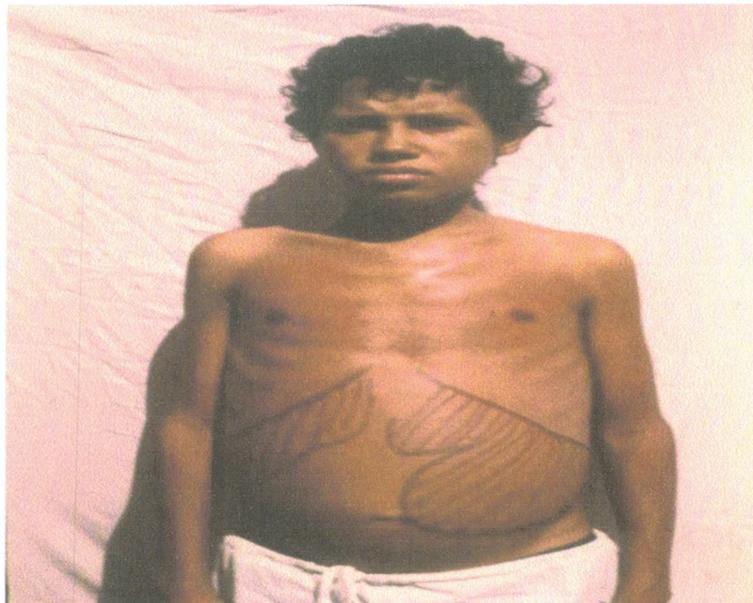


Figure 8: leishmaniose viscérale
(Laboratoire de parasitologie-mycologie, CHU Mustapha)

2.1. DIAGNOSTIC

La variabilité dans les manifestations cliniques entraîne, en l'absence de moyens technologiques modernes, des difficultés à diagnostiquer de façon simple la pathologie.

Le diagnostic différentiel est parfois délicat à établir. De plus, le nombre d'infections sub-cliniques serait très élevé ce qui laisse penser que le nombre de cas de leishmaniose, en dehors des circuits hospitaliers, est vraisemblablement sous-estimée. La guérison est assimilée à la disparition des symptômes et à l'absence de rechutes. [10].

2.2. TRAITEMENTS

2.2.1. LES TRAITEMENTS PHYSIQUES

Ce sont la cryothérapie, la thermothérapie, la chirurgie, l'électrothérapie, ou encore la photothérapie. [7].

2.2.2. LES TRAITEMENTS MEDICAMENTEUX

Les antimoniés pentavalents

Les principales molécules dans cette classe d'agents thérapeutiques sont l'antimoniote de N-méthylglucamine et le stibogluconate de sodium mis sur le marché en 1935. Le premier est surtout utilisé en Amérique du sud, alors que le second l'est dans la partie nord du continent. Leur mode de fonctionnement précis est encore mal compris aujourd'hui. Ces composés perturbent la bonne synthèse d'ATP dans le parasite. Ils sont administrés quotidiennement par voie intramusculaire ou intraveineuse. Pour les formes cutanées, l'OMS préconise 20 injections, et pour les formes viscérales ou cutanéomuqueuses, une trentaine d'injections sont conseillées. Ce sont les traitements de première intention dans de nombreux pays. [11].

L'amphotéricine B

L'amphotéricine B provoque des modifications de la perméabilité de la membrane parasitaire entraînant une perte létale de substances. Elle agirait en outre également sur les macrophages en stimulant leur production et en augmentant leurs capacités phagocytaires.

La pentamidine

La pentamidine inhibe la synthèse de l'ADN parasite par blocage de la thymidine synthétase et par fixation de l'ARN de transfert. [7].

II. GLUCANTIME

1. PRÉSENTATION

Les dérivés stibiés de sels pentavalents d'antimoine : Glucantime®, est une molécule utilisée au cours du traitement de la leishmaniose, il est sous forme d'une boîte de 5 ampoules de 5 ml correspondant à 1,5 gramme d'antimoniate de Meglumine, à reconstituer avec de l'eau pour préparation injectable, à usage parentéral intramusculaire, intraveineux et intra lésionnel.

Excipients: - Eau ppi,
- Potassium disulfite,
- Sodium sulfite anhydre. [12].

2. CLASSE THÉRAPEUTIQUE

Antiparasitaire ; Anti-leishmanies. [12].

3. STRUCTURE CHIMIQUE

Il existe deux molécules couramment utilisées contenant de l'antimoine, l'antimoniate de méglumine (Glucantim ®) et le stibogluconate de sodium (Pentostam ®). L'antimoniate de méglumine et le stibogluconate de sodium ont une structure chimique voisine.

Formule brute : Antimoniate de méglumine: $C_7H_{18}NO_8Sb$.

Stibogluconate de sodium: $C_6H_9Na_2O_9Sb$.

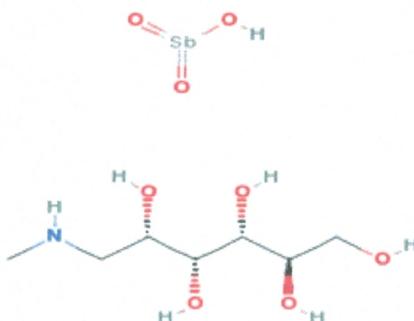


Figure 9 : Antimoniate de méglumine
(Médecine Tropicale • 2000 • 60 • 4 •)

4. PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

- Couleur : Antimoniote de méglumine: blanche.
- Forme : Cristaux.
- Poids moléculaire : Antimoniote de méglumine: 366g/mole.
- Description :
 - Antimoniote de méglumine: odeur faible.
 - Facilement soluble dans l'eau.
 - Le pH de la solution obtenue est compris entre 6 et 7.
 - Il est insoluble dans l'alcool; l'éther et le chloroforme.
- Conditions de stockage : À l'abri de la chaleur & humidité.
- Formes de présentation :
 - Caisse par 3 ampoules (ampoules par 5 ml).
 - Caisse par 5 ampoules (ampoules par 5 ml).
 - Caisse par 25 ampoules (ampoules par 5 ml).
 - Caisse par 50 ampoules (ampoules par 5 ml). [13].

5. POSOLOGIE

Un comité d'experts réuni par l'OMS (Ranque & Quirlici, 1986) préconise l'emploi des antimoniés à des doses moins importantes :

.5.1 TRAITEMENT LOCAL : Injection de 1 à 3 ml à la base de la lésion, à intervalles de 1 ou 2 jours. [14].

.5.2. TRAITEMENT GENERAL : Injection intramusculaire de 60 mg/kg/jour d'antimoine jusqu'à guérison clinique ou disparition du parasite dans le suc dermique recueilli par scarification, puis quelques jours au-delà.[14][15].

La posologie du Glucantime selon le service de dermatologie CHU Tlemcen est la suivante :

Adultes : 60 mg/kg/jr avec une dose maximale de 100 mg/kg/jr.

Enfant : soit la demi-dose : 30 mg/kg/jr

- Cure pendant 15 jours ; une injection IM/jr :

- $\frac{1}{4}$ de la dose totale le J1
- $\frac{1}{2}$ de la dose totale le J2
- $\frac{3}{4}$ de la dose totale le J3
- La dose totale le J4 pendant 13 jours
- Arrêt de 15 jr puis une deuxième cure pendant 15 jr.

6. INDICATION

Les dérivés pentavalents de l'antimoine (DPA) constituent depuis 50 ans le traitement de référence des leishmanioses viscérales (LV) et de la majorité des formes tégumentaires (LT). A l'inverse des pays anglo-saxons qui utilisent le stibiogluconate de sodium (Pentostam[®]), produit comparable, l'antimoniote de N-méthyl glucamine est largement prescrit dans les pays francophones et en Amérique du Sud. [16].

1.1.1. LEISHMANIOSE VISCERALE

Injection intramusculaire de 20 mg/kg/jour d'antimoine (soit 75 mg/kg/jour d'antimoniote de méglumine), sans dépasser 850 mg d'antimoine, pendant au moins 20 jours consécutifs. Le traitement doit être poursuivi jusqu'à disparition des parasites dans des ponctions de rate effectuées à intervalle de 14 jours.

En cas de récurrence, la cure doit être immédiatement recommencée avec les mêmes doses quotidiennes. [17].

1.1.2. LEISHMANIOSE CUTANEE

Au sein de l'ensemble hétérogène des leishmanioses tégumentaires, les antimoniés pentavalents par voie locale ou par voie générale occupent toujours une place essentielle malgré le développement de nombreux produits plus récents. Leur utilisation et le taux de guérison dépendent des formes cliniques et de l'espèce parasitaire. Les leishmanioses cutanées localisées (LCL) de l'Ancien Monde due à *Leishmania tropica* et *Leishmania major* peuvent bénéficier d'un traitement intra-lésionnel par une solution de Glucantime[®] diluée à 30 p. 100 (300 mg/mL) en cas de lésions ou peu nombreuses.

Le nombre d'injections (entre 2 et 10, espacées de quelques jours) et le volume injecté (1 à 1,5 mL) dépendent de la taille de la lésion et de son évolution sous traitement. Il est

recommandé d'associer un anesthésique local en raison du caractère douloureux des infiltrations.

Chaque lésion doit être traitée individuellement, les injections étant effectuées aux quatre points cardinaux de la lésion jusqu'au blanchiment complet. La tolérance du traitement est satisfaisante, La guérison est obtenue dans 75 p. 100 des cas de leishmanioses tégumentaires de l'Ancien Monde

Les leishmanioses cutanéomuqueuses du Nouveau Monde nécessitent un traitement plus prolongé de 28 jours Le taux de guérison obtenu varie de 10 à 75 p.100 suivant les pays et l'état d'avancement de l'infection

Les leishmanioses cutanées diffuses (*Leishmania aethiopica*, *Leishmania amazonensis*), classiquement rebelles aux antimoniés, peuvent être améliorées transitoirement par des cures successives de Glucantime® par voie parentérale.

A l'exception des formes à *Leishmania braziliensis* et *Leishmania amazonensis* Les injections au niveau des lésions ne doivent être envisagées qu'au stade précoce. L'infiltration doit être profonde jusqu'à l'obtention d'un blanchiment complet à la base de la lésion. Un traitement par voie générale est nécessaire quand les lésions sont trop nombreuses, enflammées, ulcérées ou situées dans un endroit où des cicatrices risqueraient d'être inesthétiques ou incapacitantes, en particulier s'il y a obstruction des voies lymphatiques ou atteinte cartilagineuse. [17].

7. MODE ET PRECAUTIONS D'ADMINISTRATION

Les injections sont faites en milieu hospitalier avec surveillance journalière du patient c-à-d le patient doit être hospitalisé durant la période du traitement.

1.1.3. LA VOIE INTRAMUSCULAIRE PROFONDE

Voie d'administration préférentielle, expose aux risques de complications infectieuses (abcès, transmission virale, tétanos nosocomial), musculaires et neurologiques (atteinte du nerf sciatique). [14].

1.1.4. LES INJECTIONS INTRAVEINEUSES

Doivent être réalisées lentement (5 minutes) avec des aiguilles de faible diamètre afin de limiter le risque de thrombophlébite.

Le caractère douloureux des injections péri-lésionnelles est diminué par l'adjonction d'un anesthésique local.

Des réactions cutanées locales à type de prurit ou d'érythème sont possibles, exceptionnellement à type d'urticaire. [14].

8. CONTRE INDICATION

- Hypersensibilité à l'un des constituants.
- Insuffisances cardiaque ou hépatique.
- Insuffisance rénale sévère.
- Tare cardiaque ou troubles de conduction.
- Tuberculose pulmonaire.
- Syndrome hémorragique.

➤ Grossesse :

Il n'y a pas d'étude de tératogénèse disponible chez l'animal.

Il n'existe actuellement pas de données pertinentes sur un éventuel effet malformatif ou foetotoxique de l'antimoniote de méglumine. [12].

➤ Allaitement :

En l'absence d'étude, à éviter pendant l'allaitement. [12].

9. PRECAUTIONS D'EMPLOI

Avant de commencer le traitement on doit faire un bilan pré-thérapeutique pour s'assurer que le patient ne présente aucune pathologie qui peut s'aggraver par l'administration du Glucantime.

Les bilans pré-thérapeutiques :

- ✓ Fonction rénale : urémie, créatinémie
- ✓ Chimie des urines
- ✓ Fonction hépatique : TGO-TGP, phosphatase alcalines
- ✓ Téléthorax
- ✓ ECG
- ✓ FNS
- ✓ Bilan d'hémostase

Durant la période du traitement Il est très important de surveiller les paramètres biologiques : LDH et Hb (indicateurs d'hémolyse), si le patient présente un taux élevé en ces deux paramètres on doit arrêter le traitement.

Une alimentation riche en protéines doit être administrée pendant toute la durée du traitement, celui-ci étant précédé si possible par

La correction d'une de toute carence spécifique. [18]. [15].

10. TOLERANCE DU PRODUIT

Habituellement bonne mais les accidents mortels reste possible, alors l'hospitalisation est obligatoire et systématique :

La réalité fait distinguer deux types d'effets : Les signes de stibiée tolérance de type allergique et les signes de stibio-intoxication.

Les premiers sont d'apparition précoce, survenant dès les premières injections et régressant lors de la suspension du traitement. Ils traduisent une hypersensibilité immédiate : hyperthermie, frissons, myalgies, arthralgies, toux quinteuse, éruption cutanée. Des céphalées sont signalées dans 20% des cas. [19].

Les signes de stibio-intoxication surviennent en fin de cure, soit en règle lors de la troisième semaine de traitement. Ils traduisent un surdosage : troubles cardiaque atteinte pancréatique et rénale. [20].

L'expression clinique de la stibio - toxicité est comparable à celle de la stibio-intolérance, mais sur un mode plus intense. Des troubles cardiaques peuvent être observés : les manifestations électro-cardiographiques doses-dépendantes sont fréquentes, généralement réversibles.

11. INTERACTION

En absence d'études, ce médicament ne doit pas être associé avec d'autres médicaments. [12].

12. EFFETS INDÉSIRABLES

- Maux de tête, Céphalées, Malaise général
- Hémolyse

- Éruption cutanée
- Rash cutané et œdème du visage
- douleur abdominale
- Augmentation des enzymes hépatiques
- Insuffisance hépatique ou rénale.[18].

13. CARACTERISTIQUES PHARMACOLOGIQUES

1. CINETIQUE

ABSORPTION

L'absence d'absorption digestive de l'antimoniote de N-méthyl glucamine (L'absorption par l'homme de l'antimoine est faible) impose une injection par voie parentérale.

Après administration IM de 10 mg/Kg d'antimoine pentavalent, un pic sérique de 10 µg /mL est atteint en quinze minutes. [21].

DISTRIBUTION

L'antimoine pénètre dans le corps par la circulation sanguine où il se répartit différemment suivant la valence. L'antimoine pentavalent serait sous forme chargée en conditions biologiques. Le temps de distribution est de 51 minutes. [22].

Depuis le sang, l'antimoine est distribué et stocké dans différents compartiments corporels. Il reste affiné du sang, s'accumule dans les tissus mous vascularisés comme le foie et la rate mais aussi au niveau des os.

Chez l'homme, dans la population générale, l'antimoine est retrouvé dans les fluides et tissus à de très faibles niveaux, de l'ordre de 7 mg pour l'ensemble du poids corporel

L'antimoine est affiné des résidus thiols (groupement SH). Ceci pourrait expliquer son affinité pour l'hémoglobine des globules rouges et sa toxicité, sans que ces derniers soient bien compris. En effet, les groupes SH sont essentiels à la structure et à la fonction des protéines. [23].

METABOLISME

L'antimoine subit peu de métabolisation chez les mammifères. [24].

DEMI-VIE ET ELIMINATION

Les antimonies pentavalent ont plus de concentration plasmatique que les trivalent, parce que la plupart de la dose est excrète par l'urine dans 24 heures. Ils sont distribués dans un volume de 0.22L/kg et éliminés dans deux phases.

L'élimination urinaire est rapide, 50% dans les 6 heures et 80% dans les 24 heures qui suivent l'injection.

Elle peut être incomplète, avec risque d'accumulation. [23].

2. MODE D'ACTION

Le mécanisme d'action de l'antimoine est mal connu, il présente une action inhibitrice sur la synthèse d'ATP, sur l'oxydation glycolytique et sur le métabolisme des acides gras du parasite.

On ne connaît pas avec précision le mécanisme d'action d'antimonie pentavalente, mais on pense que beaucoup des enzymes de Leishmanie sont inhibés sélectivement, inhibant la phosphofructoquinase avec un blocage subséquent de la production de l'adénosine triphosphate. [18].

3. TOXICITE

Données chez l'homme

Adulte : Les signes de mauvaise tolérance aux sels pentavalents d'antimoine apparaissent à partir de 30 mg/kg/injection et paraissent constants à partir de 40 mg/kg.

Enfant : Les signes de mauvaise tolérance aux sels pentavalents d'antimoine apparaissent à partir de 30 mg/kg/injection et paraissent constants à partir de 40 mg/kg. [25].

EFFETS CLINIQUES

➤ INTOXICATION AIGUE

En cas de dose totale très élevé :

- Atteintes hépatique (ictère grave).
- Rénal (insuffisance rénale aigüe).
- Cardiaque (bradycardie, allongement de QT, aplatissement ou inversement de l'onde T)
- Hématopoïétique (anémie, agranulocytose).
- Neurologie (polynévrites). [12].

➤ INTOXICATION CHRONIQUE

On ne connaît pas encore exactement les conséquences d'une exposition faible répétée ou continue (faible de longue durée) aux dérivés d'antimoine. Les études existantes se contredisent et sont difficiles à interpréter. [26].

DESCRIPTION ANALYTIQUE DES EFFETS TOXIQUES

➤ Hématologiques :

Les pentavalents d'antimoine sont responsables de troubles hémorragiques plus rarement d'anémie hémolytique.

Un cas d'agranulocytose est apparu au 6ème jour du traitement par l'antimoniote de méglumine chez un enfant.

L'antimoine est affiné des résidus thiols (groupement SH). Ceci pourrait expliquer son affinité pour l'hémoglobine des globules rouges et sa toxicité, sans que ces derniers soient bien compris

➤ Cardiovasculaires :

Modification de l'électrocardiogramme: inversion de l'onde T, allongement de QT (ces signes disparaissent à l'arrêt du traitement par les sels d'antimoine).

Bradycardie.

Myocardite

Choc cardiogénique.

Mort subite.

➤ Respiratoires : *Toux quinteuse.*

➤ Neurologiques :

- Système nerveux central: Hémorragie cérébro-méningée.
- Système nerveux périphérique: Des polynévrites peuvent s'observer tardivement

➤ Gastro-intestinaux : Nausées, vomissements et diarrhées peuvent apparaître surtout au début du traitement.

➤ Hépatiques et rénal :

Le risque d'hépatite mortelle justifie de diminuer les doses ou d'arrêter le traitement quand les transaminases sont supérieures à 5 fois la normale.

L'hyper-amylasémie et la lipasémie attestent d'une pancréatite, le plus souvent infra-clinique, transitoire et régressant à l'arrêt du traitement. [27].

➤ Système endocrinien et de la reproduction : L'hyper amylasémie et la lipasémie attestent d'une pancréatite, le plus souvent infraclinique, transitoire et régressant à l'arrêt du traitement. Mais d'authentiques pancréatites aiguës ont été observées.

1.2. TRAITEMENT

Ils consistent en:

- Arrêt du médicament dès qu'il y a apparition des signes de la stibio-intolérance.
- Traitement symptomatique des différentes perturbations.
- Maintien d'un équilibre hydro électrolytique.
- Correction d'un état de choc.
- Assistance respiratoire éventuelle.
- Traitement des troubles du rythme.
- Epuration extra rénale en cas d'insuffisance rénale.
- Traitement antidotique :

L'emploi du BAL (ou 2,3, Dimercapto-1- propanol) est proposé comme chélateur; il est administré selon le schéma suivant par voie intramusculaire profonde:

3 mg/kg/6 heures le premier jour, 3 mg/kg/12 heures le deuxième jour, 3 mg/kg/24 heures le troisième jour.

DMSA (ou acide 2,3,dimercapto-succinique), son efficacité expérimentale est égale à celle du BAL. [29].

III. GLOBULES ROUGES

III.1. DEFINITION

Le globule rouge est une cellule anucléée dont la structure est adaptée à sa fonction essentielle, le transport et la délivrance de l'oxygène aux tissus. Il va subsister dans la circulation environ 120 jours grâce aux propriétés de la membrane qui lui permet de traverser les sinusoides les plus étroits. [30].

Le globule rouge qui à l'état normal a la forme d'un disque biconcave, peut facilement se déformer et traverser des vaisseaux dont le calibre est inférieur à 3 μm . Cette déformabilité, essentielle à sa survie dépend de la forme de la cellule et du rapport entre la surface et le volume.[31].

Tableau III : valeurs normales par litre

CELLULES	HOMME	FEMME	ENFANT 1 an	NOUVEAU-NÉ
Globules rouges	4,5 à 5,9 X 10 ¹²	4 à 5,4 X 10 ¹²	3,6 à 5 X 10 ¹²	4 à 6 X 10 ¹²

Le contenu de l'érythrocyte : contrairement aux autres cellules, le cytoplasme érythrocytaire mature ne contient pas d'organite cellulaire. Il s'agit essentiellement d'une solution aqueuse très riche en hémoglobine (la protéine responsable du transport de l'oxygène), et contenant également des enzymes et leurs cofacteurs, des sucres et des ions. Chaque globule rouge contient quelque 300 millions de molécules d'hémoglobine, ce qui équivaut au tiers de son poids environ.

III.2. PARTICULARITÉ DU GLOBULE ROUGE :

L'absence de noyau implique 3 notions :

- Incapacité du système protéique (il n'existe pas d'ADN ni d'ARN).
- Donc un stock enzymatique et énergétique limité et prédéterminé.
- L'usure progressive et la disparition des constituants non renouvelables.

Le métabolisme énergétique du GR a pour rôle de :

- 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.
- Produire 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. [32].

III.3. COMPOSITION DE LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE

La membrane érythrocytaire désigne la bicouche phospholipidique, contenant les protéines transmembranaires, et le squelette érythrocytaire, assemblage de protéines entrelacées en mailles régulières et tapissant la face interne de la bicouche. Le squelette est en parti responsable de la forme et de la déformabilité du globule rouge. Il comprend plusieurs protéines dont la spectrine, l'ankyrine, l'actine et la protéine

La membrane est composée de 40 % de lipides, de 52 % de protéines et de 8 % de glucides. [33].

III.3.1. LES LIPIDES

Les lipides constituent la bicouche lipidique. Les lipides totaux représentent environ 44% des membranes totales. Les principales constituantes sont les phospholipides (65 à 70% des lipides totaux) et le cholestérol (20 à 25 %). Il existe en outre de faibles quantités d'acides gras libres et de glycolipides dont certains sont porteurs d'antigènes de groupes sanguins. [34].

III.3.2. PHOSPHOLIPIDES

La répartition est la suivante :

- lécithine (phosphatidylcholine), environ 30 %.
- phosphatidyl-éthanolamine, 27 %.

- sphingomyéline, 22 à 25 %.
- phosphatidyl-sérine et phosphatidylinositol, 13,5 %.
- lysolécithine, 1,2 à 2,5 %.
- Acide phosphatidique et polyglycérol phosphatide, 2 %. [34].

III.3.3. CHOLESTEROL

20 à 25 % des lipides totaux. Ils existent exclusivement sous forme libre répartie régulièrement dans la membrane.

III.3.4. LES PROTEINES MEMBRANAIRES

Les protéines de la membrane érythrocytaire sont classées en deux catégories: les protéines dites intrinsèques ou transmembranaires, parce qu'elles traversent de part en part la double couche lipidique, et les protéines dites extrinsèques, qui sont en dehors de celle-ci, à l'extérieur ou à l'intérieur de la double couche de lipides.[35].

Les Protéines extrinsèques :

- La spectrine.
- L'ankyrine.
- La protéine 4.1.
- La protéine 4.2.
- L'actine.
- L'adducine.[36].

Les protéines transmembranaires ou protéines intégrales :

- La protéine bande 3.
- Les glycophorines :
 - Glycophorine A.
 - La glycophorine C. [36].

III.4. LES PROPRIETES PHYSIQUE DE LA MEMBRANE

III.4.1. LA DEFORMABILITE DU GLOBULE ROUGE

Cette propriété est essentielle à la survie de la cellule durant son long périple vasculaire. Trois facteurs interviennent :

III.4.1.1. LA FORME DE LA CELLULE

Le globule rouge, disque biconcave a une surface en excès par rapport à son volume. Cet excès de surface permet des déformations importantes et toute modification de cet équilibre fragilise la cellule. Cette forme discoïde apparaît après le stade de réticulocyte qui est encore une cellule rigide. La disparition des organelles intra-cytoplasmiques, la perte des récepteurs à la transferrine, à l'insuline, à la fibronectine ainsi que des modifications internes dans la composition et la structure de la membrane permettent l'acquisition progressive de cette forme si nécessaire à la survie de la cellule.

A l'inverse, une augmentation de surface explique l'hémolyse. De même, une réduction de volume explique l'hémolyse des thalassémies ou des hémoglobinopathies, alors qu'une augmentation de volume a la même conséquence au cours des stomatocytoses. [35].

III.4.1.2. LA VISCOSITE INTRA-CYTOPLASMIQUE

Toute déshydratation intracellulaire, augmente la viscosité et fragilise la cellule. [35].

III.4.1.3. LA MEMBRANE

Sa capacité de déformation et de résistance à la fragmentation sont enfin nécessaires. Un état de déformation réversible est tolérable par la cellule mais tout excès de force ou tout défaut dans la structure de la membrane entraîne une déformation irréversible qui entraîne la destruction de la cellule. [35].

III.4.2. LES 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. 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. [37].

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).[38].

Transport passifs

À travers des « pores » de la membrane suivant le gradient de concentration des ions. [38].

Échange des cations:

Les échanges de cations demandent, pour leur plus grande part, un 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. [40].

Un second système d'échange constitue le cotransport $\text{Na}^+ \text{K}^+$. Ce système est bidirectionnel 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. [40].

L'hémoglobine au pH cellulaire se comporte comme un anion et sa présence explique la teneur en ions chlore et en ions CO_3^{1-} plus faible dans le globule rouge que dans le plasma. Surtout, l'hémoglobine, par sa très haute concentration, exerce une pression oncotique qui, en l'absence d'un mécanisme régulateur maintient la concentration des cations relativement basse par rapport au plasma, conduirait à un appel d'eau vers le contenu cellulaire, à un gonflement de l'hématie et à la lyse osmotique. [37].

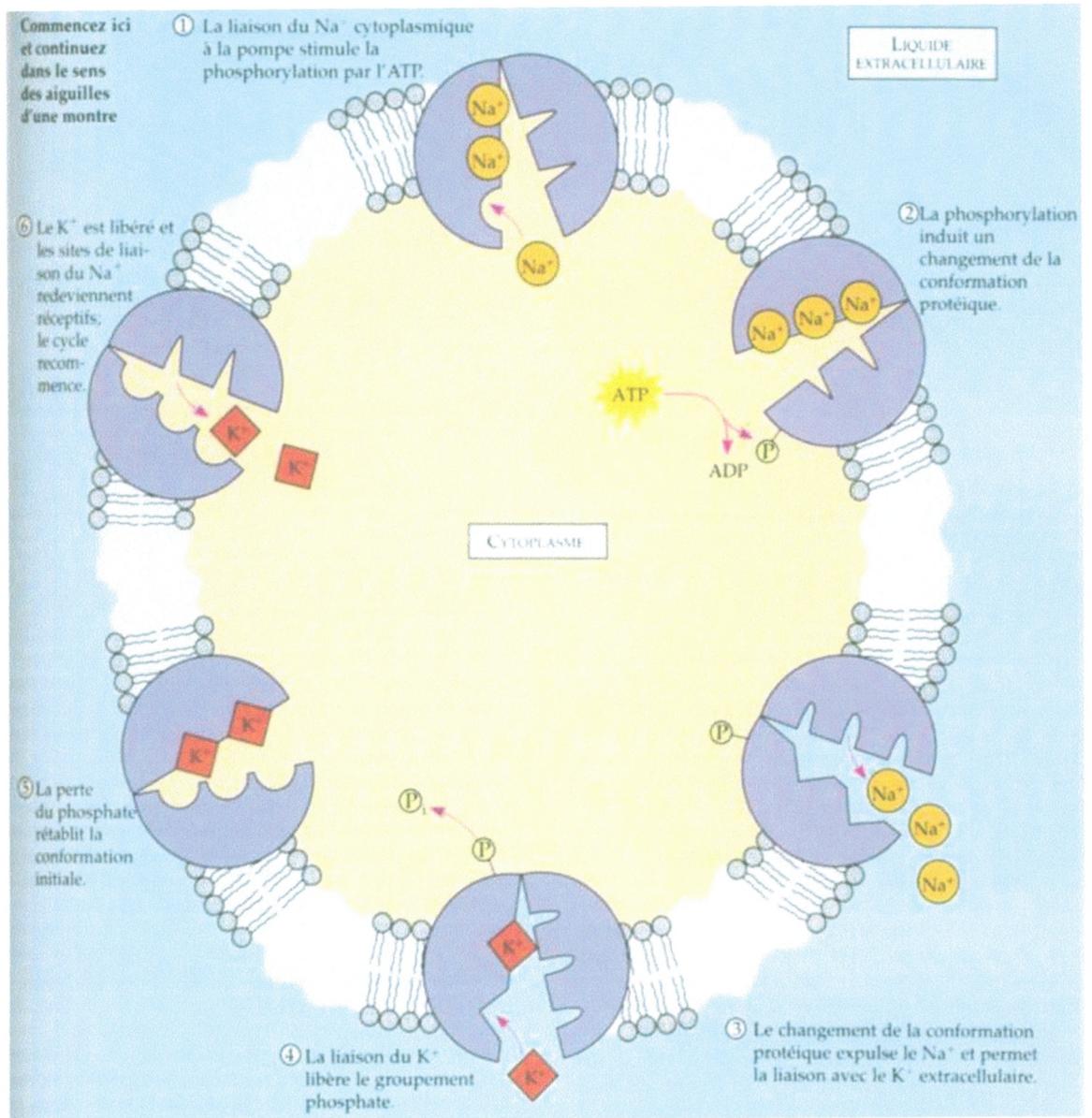


Figure 10 : Les échanges transmembranaires

(L'Analyse clinique biologique Vol. 63)

III.5. MÉTHODES D'ÉTUDE DES GLOBULES ROUGES

Outre les techniques de numération des hématies et des réticulocytes, on mesure également des paramètres moyens qui caractérisent la ou les populations érythrocytaires, appelés constantes érythrocytaires, et on apprécie également la variation morphologique individuelle (étude de la dispersion) par l'examen des hématies sur frottis colorés.

Les constantes érythrocytaires :

Celles-ci sont obtenues à l'aide des trois mesures suivantes : le taux de l'hémoglobine (mesuré en gramme/Litre de sang), l'hématocrite et le nombre d'érythrocytes/L.

Les constantes érythrocytaires sont : le volume globulaire moyen (VGM), la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH) et la concentration globulaire moyenne en hémoglobine (CGMH). [41].

- ❖ Le VGM s'obtient en divisant l'hématocrite par le nombre de globules rouges contenus dans 1 X 10⁻¹² Litre de sang, ce qui correspond à l'équation suivante:

$$\text{VGM} = \text{Hcte (0,00)} \times 1000 / \text{nombre de G.R. (x } 10^{12} / \text{L)} = \dots \text{femtolitres (10-15)}$$

Les valeurs normales du VGM vont de 80 à 98 fL. En dessous de 80 fL, on parlera de microcytose, et au-dessus de 98 fL, de macrocytose. Quand le VGM est normal, on parle de normocytose. [41].

- ❖ La TGMH renseigne sur la quantité (absolue) moyenne d'hémoglobine contenue dans chaque globule rouge. Elle s'obtient en divisant le taux d'hémoglobine par le nombre de globules rouges, soit :

$$\text{TGMH} = \text{Hb (g/L)} / \text{nombre de G.R. (x } 10^{12} / \text{L)} = \dots \text{picogrammes (10-12)}$$

La valeur normale de la TGMH est de 27 à 33 picogrammes. La TGMH n'apporte guère de renseignement additionnel car elle évolue toujours de façon parallèle au VGM.

- ❖ La CGMH se calcule en divisant l'hémoglobine par l'hématocrite, obtenant ainsi la quantité d'hémoglobine par unité de volume de globules rouges, c'est-à-dire la concentration d'hémoglobine dans l'érythrocyte :

$$\text{CGMH} = \text{Hb (g/L)} / \text{Hcte (0,00)} = \dots \text{grammes/litre}$$

La valeur normale de la CGMH est de 320 à 360 g/L. Lorsque la CGMH est abaissée en dessous de 320, il y a hypochromie.

Lorsque la CGMH est comprise entre 320 et 360 g/L, il y a normochromie. Il n'existe pas d'hyperchromie, la CGMH ne pouvant pas s'élever au-dessus de 360 g/L. [41].

Examen des hématies sur frottis :

L'examen des hématies permet de repérer certaines anomalies morphologiques révélant des modifications pathologiques. Ces anomalies peuvent affecter la taille, la forme ou la coloration des hématies. [41].

IV. L'HÉMOLYSE

IV.1. DEFINITION :

- C'est la destruction précoce et exagérée des GR circulants sous l'effet d'un processus hémolytique. Ce processus affecte toujours un des constituants vitaux du GR : membrane, enzyme, Hb. [41]. On a deux types d'hémolyse ; physiologique et pathologique :

IV.2. HEMOLYSE PHYSIOLOGIQUE

Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer la fin de vie des GR après environ 120j, mais aucune n'est prépondérante ni clairement démontrée.

1. Modification de la forme (modification du métabolisme énergétique) :

- ✓ 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 altérant la structure et la fonction de la membrane et de l'hémoglobine.

- ✓ 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

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).

- ✓ 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. [42].

2. Siège de l'hémolyse physiologique :

Le siège principal de la destruction érythrocytaire est la moelle osseuse (50% des hématies y sont détruites par le système des phagocytes mononucléés). Le reste est détruit dans le foie et la rate. En réalité toute cellule macrophagique est capable de dégrader l'hémoglobine libérée.

L'hémolyse physiologique est essentiellement intra tissulaire, une faible partie se déroule au sein même de la circulation sanguine. [43].

IV.3. HEMOLYSE PATHOLOGIQUE

IV.3.1. MECANISME

L'hémolyse pathologique relève de plusieurs mécanismes plus ou moins intriqués :

La masse globulaire perdue de façon journalière devient supérieure au 1/120ème du total perdu normalement dans le cadre de l'hémolyse physiologique

1- Diminution du rapport Surface/volume érythrocytaire :

Une augmentation du volume érythrocytaire est consécutive aux mécanismes favorisant l'entrée du sodium et d'eau dans la cellule. [41].

2- Altérations structurales membranaires :

Une modification du squelette membranaire est responsable de l'anomalie morphologique

De même des modifications de la bicouche lipidique diminuent la fluidité membranaire et donc rigidifient la cellule.

L'élasticité membranaire, dépendante de la spectrine, est une propriété distincte de la fluidité membranaire. Elle est diminuée par l'accumulation intracellulaire et membranaire de calcium, comme dans les déplétions en ATP. [41].

Les hémolyses d'origine médicamenteuse :

Plusieurs médicaments d'usage courant sont capables de causer une anémie hémolytique par l'intermédiaire de l'un ou l'autre des mécanismes énumérés précédemment.

Les médicaments tels la phénacétine, sulfamides antihistaminiques et dans notre cas le Glucantime ont une toxicité directe sur le GR.[41].

IV.4. LES MARQUEURS BIOLOGIQUES DE L'HEMOLYSE

Bilan biochimique :

- ❖ Au cours des hémolyses intra tissulaires : Augmentation des produits du catabolisme des GR :
 - ✓ Bilirubine libre élevée.
 - ✓ Augmentation du fer sérique.
 - ✓ Augmentation de l'urobilinurie et stercobilinogène fécal.
- ❖ Au cours des hémolyses intra vasculaires :
 - ✓ Hémoglobinémie plasmatique.
 - ✓ Hémoglobinurie.
 - ✓ Haptoglobine effondrée.
 - ✓ Hémosidérinurie.
 - ✓ la méthémalbumine est augmentée. [44].

IV.5. PARAMETRES BIOLOGIQUES AU COURS DE NOTRE ETUDE SONT :

IV.5.1. POTASSIUM

Au cours d'une hémolyse on a recouru à une augmentation des concentrations plasmatique du potassium due à la lyse membranaire du globule rouge.

IV.5.2. LACTATE DESHYDROGENASE

Le lactate déshydrogénase (LDH) est présente dans de nombreux organes, cœur, foie, muscle, rein. Elle catalyse la réaction suivante :



Valeurs usuelles :

200 à 600 VU (cinétique UV à 37 °C par la méthode des plaques LDH Vitros, lecture à 340 nm). De très nombreuses méthodes donnent des valeurs physiologiques des LDH inférieures à 250 U/l, tout en utilisant aussi des cinétiques à 37 °C avec lecture à 340 nm.[45].

Variations pathologiques :

- ✓ Affections cardiaques
- ✓ Affections hépatiques
- ✓ Anémies : L'anémie pernicieuse présente des valeurs extrêmement élevées de LDH pouvant atteindre 8 000 à 10 000 U/l.
- ✓ Les anémies hémolytiques présentent des taux de LDH moins élevés de 1 000 à 2 000 U/l [45].

Détermination de l'activité enzymatique du lactate déshydrogénase :

La réaction est directe :



La vitesse initiale d'oxydation du NADH est proportionnelle à l'activité catalytique de la LDH. Elle est déterminée par mesure de la diminution d'absorbance à 340 nm. . [45].

Isoenzymes des LDH :

Le lactate déshydrogénase sérique possède Cinq variétés d'isoenzymes différentes qui peuvent être séparées par électrophorèse du sérum sur acétate de cellulose.

Ces isoenzymes résultent de l'association quatre par quatre de deux types de protomères (A et B).[45].

LDH1 = 84 (20 %).

LDH2 = A1B3 (40 %).

LDH3 = A2B2 (20 %).

LDH4 = A3B1 (10 %).

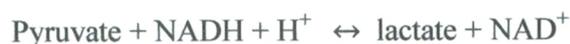
LDH5 = A4. (10 %).

IV.5.3. LACTATE**IV.5.3.1. METABOLISME DU LACTATE**

La concentration de lactate, ou lactatémie, est une concentration d'un état stationnaire qui résulte à la fois du flux de production et du flux d'élimination du lactate. [45].

IV.5.3.2. VOIES METABOLIQUES DU LACTATE

Le lactate est formé dans le cytosol à partir du pyruvate qui est réduit grâce à une enzyme, la lactico-déshydrogénase (LDH). Cette réaction réversible peut être schématisée comme suit :



Et selon la loi d'action de masse :

$$[\text{Lactate}] = \frac{K \cdot [\text{pyruvate}] \times [\text{NADH}]}{[\text{NAD}^+] \times [\text{H}^+]}$$

Ainsi, la concentration cellulaire de lactate dépend des trois déterminants que sont le pyruvate, le rapport $\frac{\text{NADH}}{\text{NAD}^+}$ et la concentration en $[\text{H}^+]$.

IV.5.3.3. LE CATABOLISME DU GLUCOSE: LA GLYCOLYSE

C'est la voie de transformation du glucose en pyruvate au niveau cytosolique.

C'est une voie anaérobie. Elle est stimulée par le manque d'ATP, et inhibée par l'augmentation de la concentration en H^+

IV.5.3.4. LE DEVENIR DU PYRUVATE

Dans les conditions de faible oxygénation comme dans notre cas les cellules ne possèdent pas de mitochondries (GR), Le pyruvate est réduit en lactate dans le cytosol (grâce à la lactate-déshydrogénase - LDH), qui va diffuser dans le sang.

IV.5.3.5. TECHNIQUE DE DOSAGE

Les laboratoires de biochimie possèdent généralement des appareils qui mesurent automatiquement, de façon fiable et assez rapidement la lactatémie selon la technique de lecture spectrophotométrique après catalyse enzymatique induisant une réaction colorimétrique. [46]. [47].

Les nouvelles techniques de microdialyse permettent l'évaluation précise de la concentration de lactate la plus proche de celle du secteur interstitiel. [48].

IV.5.4. LES PROTEINES TOTALES

Les propriétés des protéines sont très variables : transporteurs, anticorps, enzymes, agents de pression oncotique, marqueurs de l'inflammation, marqueurs tumoraux, agents de la coagulation, facteurs de croissance, etc...

Leurs fonctions sont très variées: immunité, transport d'hormones, Elles permettent, de maintenir la pression oncotique du plasma, et ainsi cela assure la rétention de l'eau dans les vaisseaux sanguins. [49].

Il est souvent nécessaire de connaître la concentration totale de l'ensemble des différentes protéines d'un milieu, c'est pourquoi on cherche à mettre en œuvre des réactions

capables de révéler plus ou moins stoechiométriquement toutes les protéines. Malheureusement, vu l'hétérogénéité de ces molécules, l'intensité de la réaction retenue est très variable d'une protéine à l'autre et le résultat global dépend de la nature des protéines présentes et de leur composition relative. L'interprétation est souvent difficile, parfois fausse. [49].

IV.5.4.1. METHODE DE DOSAGE DES PROTEINES TOTALES : METHODE DE LOWRY

Principe et techniques :

La méthode de Lowry est une méthode de dosage colorimétrique des protéines, complémentaire à celle du Biuret. En effet, la protéine réagit tout d'abord avec un réactif cuivrique alcalin puis un second réactif, dit phosphotungstomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu), est ajouté. [49].

Ce réactif permet la réduction des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont on mesurera l'absorbance. Le protocole à suivre pour réaliser un dosage selon la méthode de Lowry est de mélanger la solution alcaline (solution de carbonate de sodium alcalin à 20g/L dans 0.1M de soude) à la solution de protéines à doser, puis d'ajouter une solution de sulfate de cuivre et de tartrate double de sodium et de potassium. Laisser incuber au minimum 10 minutes à température ambiante. Ajouter ensuite le réactif de Folin (dilué au demi) sous agitation rapide. Attendre 30 minutes, et mesurer la DO à 710 nm. [49].

Avantage :

Cette technique bénéficie d'une meilleure sensibilité que la méthode du Biuret (augmentation d'un facteur cent). Il est ainsi possible de réaliser des mesures dans des mélanges pauvres en protéines ou dans des solutions relativement diluées. Les interférences dues aux détergents et aux lipides sont également supprimées. [49].

Inconvénients :

La méthode de Lowry n'est pas totalement fiable à cause des interférences possibles dues aux réactifs. De plus, elle nécessite un certain temps de mise en œuvre. La gamme étalon nécessaire à la détermination de la concentration d'une solution inconnue est délicate à réaliser. [49].

IV.5.5. HEMOGLOBINE

L'hémoglobine est une protéine de structure quaternaire, dont la principale fonction est le transport du dioxygène dans l'organisme humain et chez les autres vertébrés. L'hémoglobine se trouve essentiellement à l'intérieur des globules rouges du sang ce qui leur confère leur couleur rouge. [50].

L'hémoglobine humaine est constituée de quatre chaînes identiques deux à deux : deux chaînes α de 141 acides aminés chacune et de deux chaînes β de 146 acides aminés chacune (ce qui donne un total de 574 acides aminés pour l'hémoglobine). Chacune de ces chaînes est associée à un groupement prosthétique : l'hème. Le nom d'hémoglobine provient de deux mots : hème et globine. On la symbolise par « Hb ». Une molécule d'hème est constituée d'un ion fer complexé par une porphyrine. [[50].].

Valeurs normales chez l'adulte :

Hommes : 13 - 17,87 g/dL de sang ou 8,3 - 10,5 mmol/L de sang.

Femmes : 12,10 - 16,40 g/dL de sang ou 7,4 - 9,9 mmol/L de sang. [50].

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE :

- ✓ **PRINCIPE DE LA REALISATION**
- ✓ **MATERIELS ET REACTIFS**
- ✓ **METHODES**
- ✓ **RESULTATS ET INTERPRETATION**
- ✓ **DISCUSSION**

I. PRINCIPE DE LA RÉALISATION

1.1. PROTOCOLE DE L'ETUDE

1.1.1. Problématique

L'utilisation du Glucantime *in vitro* nous permet de percevoir et d'interpréter un phénomène d'hémolyse en mettant en contact le globule rouge avec la molécule. Pour cela on veut savoir à quelle dose et à quel niveau le Glucantime exerce son effet toxique sur le globule rouge.

1.1.2. Objectifs

Dans le cadre très limité de ce travail, il s'agit de contribuer à la compréhension d'une petite partie du mécanisme de toxicité de cette molécule (Glucantime) sur le globule rouge.

1.1.3. Type d'étude

Il s'agit d'une étude analytique prospective concernant des tests biochimiques sur le sang d'un sujet sain.

II. MATERIELS ET REACTIFS DE TRAVAIL

1. Matériels du laboratoire

➤ **Ionogramme:**

Pour déterminer la concentration ionique du sang: sodium (Na), potassium (K), chlore (Cl)

➤ **Centrifugeuse :** utilisée pour centrifuger les échantillons pour séparer le culot globulaire de surnageant

➤ **Agitateur:** pour l'homogénéisation des suspensions du travail.

➤ **Vortex :** est utilisé pour mieux mélanger les solutions de travail.

➤ **Spectrophotomètre :**

Un spectrophotomètre est un appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée à fin de déterminer sa concentration. Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution diluée,

Le spectrophotomètre UV-visible (UV : ultraviolet) comprend :

Une source de lumière

La lampe UV est généralement de type deutérium

La lampe visible est généralement de type halogène.

un monochromateur formé d'un réseau diffractant la lumière de la source.

une fente de largeur fixe ou variable pour régler la bande passante ;

Un porte-cuvette

Une cuvette transparente dans laquelle on place la solution à étudier.

Une cellule photoélectrique,

Un détecteur électronique.

➤ **Autres matériels :**

- ✓ Les gans.
- ✓ Tubes : EDTA, Tubes héparine, Tubes sec
- ✓ Micropipette : 1000,200, 100,20 μ L
- ✓ Seringues 10 ml, coton, sparadrap, alcool,

- ✓ Béschers, pots stériles.
- ✓ étiquettes pour marquer les tubes.
- ✓ Chronomètre.

2. Réactifs et solutions de travaux

1. Solution de lavage glacée

Pour préparer la solution de lavage on a mélangé : 150 m.mole/L de NaCl avec 2 m.mole/L de MgCl₂. Elle doit être conservée au frigo à 2-5°C, elle est instable à température ambiante.

➤ *Solution de chlorure de sodium NaCl :*

Préparation d'une solution NaCl 150 m.mole :

A partir de La solution mère 1 molaire du NaCl du poids moléculaire 58.44 g/mole on a préparé 1L d'une solution NaCl de 150 mmole/l.

Tableau IV : Propriété physico-chimique du NaCl

<i>Caractère</i>	<i>Propriété</i>
Formule brute	NaCl
Masse molaire ²	58,443 ± 0,002 g/mol Cl 60,66 %- Na 39,34 %,
Moment dipolaire	9,00117 D
T° fusion	801 °C
T° ébullition	1461 °C
Solubilité	357 g·l ⁻¹

➤ **Solution de $MgCl_2$:**

Préparation d'une solution mère de $MgCl_2$ à 1 mole/L :

Pour préparer 50 ml solution du $MgCl_2$ du poids moléculaire 203.3 g/mole, on a calculé la quantité du $MgCl_2$ pour 50 ml (203.3/20) : 10.165g, alors on a pesé cette quantité puis ajusté avec de l'eau distillée jusqu'à 50ml.

Tableau V : Propriété physico-chimique du $MgCl_2$

Caractère	Propriété
Formule brute	$MgCl_2$
(anhydre)	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$
Masse molaire	$95,211 \pm 0,005$ g/mol Cl 74,47 %, Mg 25,53 %,
T° fusion	712 °C
T° ébullition	1 412 °C
Solubilité Dans l'eau :	542 g·l ⁻¹ (20 °C)
Dans l'éthanol :	74 g·l ⁻¹ (30 °C)
Masse volumique	2,32
Structure type	$CdCl_2$
Géométrie	Octaèdre, coordination

2. Tampon PBS

Tampon PBS : Tampon Phosphate Salin

Le tampon phosphate salin (souvent abrégé PBS, de l'anglais : phosphate buffered saline), est une solution physiologique. Son pouvoir tampon repose sur le couple

dihydrogénophosphate / hydrogénophosphate ($pK_A = 7,2$), qui est par ailleurs un des trois grands mécanismes permettant le maintien du pH sanguin.

Préparation de la solution tampon :

Pour la préparation de la solution tampon on a mélangé les sels suivants : le phosphate de sodium (10mmole) avec du NaCl (140mmole) et du MgCl₂ (2mmole).

Solution de phosphate monosodique NaH₂PO₄ :

Ou sel d'acide phosphorique du poids moléculaire 119.98g/mole. On a besoin de 0.2 mole de NaH₂PO₄ donc on a pesé 23.996g (119.98×0.2) et ajuster avec de l'eau distillée pour 1 litre.

Solution de dénatium hydrogenphosphate Na₂HPO₄ :

De poids moléculaire 358.14g, on a besoin de 0.2 mole de Na₂HPO₄ donc on a pesé 71.628g (358.14×0.2) et ajuster avec de l'eau distillée pour 1 litre.

Préparation de solution mère :

- On mélange :

80.2ml de Na ₂ HPO ₄	}	100 ml
19.8ml de NaH ₂ PO ₄		

- On ajoute 100ml de l'eau distillé pour obtenir une solution mère tampon 0.1 molaire.
- Donc le volume est de 200ml à pH= 7.4

Préparation de la solution fille : on a mélangé 10ml solution mère avec 14ml NaCl et 2ml MgCl₂ puis on ajuste à 100ml avec de l'eau distillé

NB :

Avant d'utilisé la solution tampon on a testé cette solution pour confirmer qu'elle est isotonique et qu'elle ne change pas l'équilibre ionique de nos suspensions :

Dans l'étape ou on a ajouté le TPBS à la suspension cellulaire, on a fait une lecture des concentrations ionique par l'ionogramme et on a refait cette lecture après deux heurs on a trouvé les mêmes valeurs; donc la solution est isotonique.

3. LDH pyruvate

Composition :

Réactif A :

- Tris 100 $\mu\text{mole/L}$.
- Pyruvate 2,75 $\mu\text{mole/L}$.
- Chlorure de sodium 222 $\mu\text{mole/L}$.
- pH= 7,2.

Réactif B :

- NADH 1.55 $\mu\text{mole/L}$.
- Azide de sodium 9.5 g/L.

Remarque :

- Nocif par ingestion.
- En contact avec de l'acide libre des gaz dangereux.
- En cas de contact avec la peau laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.

Conservation :

Les réactifs doivent être conservés à 2-8°C. Bien refermer les flacons et éviter toute contamination lors de l'utilisation. Dans ces conditions ils resteront stables jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette.

En cas de dégradation : présence de particules, turbidité, absorbance du blanc inférieure à 1,200 à 340 nm (cuvette de 1 cm).

Préparation des réactifs :

Vider le contenu d'un flacon de réactifs B dans un flacon de réactif A, homogénéiser.

Le réactif de travail est stable 2 mois à 2-8°C.

4. Les réactifs de dosage des protéines totales

Composition :

Biuret	Potassium-Sodium-Tartrate.....15 mmol/l
	Hydroxyde de sodium.....100 mmol/l
	Iodure de potassium.....5mmol/l
	Sulfate de cuivre.....19mmol/l
Standard	Protéine sol

Conservation et stabilité :

Tous les réactifs sont stable entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée, à condition d'être conservé dans un récipient fermé hermétiquement et à l'abri de la lumière et d'éviter les contaminations lors de leur utilisation.

Le standard doit être manipulé très soigneusement pour prévenir les contaminations.

Le réactif doit se présenter sous l'aspect d'une solution limpide.

III. METHODES ET MODE OPÉRATOIRE

1. La dose du Glucantime : 75µl

Préparation de l'échantillon

Prélèvement :

- On réalise un prélèvement sur un volontaire sain à jeun à l'aide d'une seringue de 10 ml.

Échantillon : ne doit pas être hémolysé pour ne pas fausser les résultats, puisque notre étude est basée sur ce phénomène (hémolyse). Pour cela on doit éviter la manipulation inappropriée d'un échantillon, par exemple son agitation excessive, l'aspiration trop rapide du sang au cours du prélèvement, la pose prolongée d'un garrot.

- On partage ce volume sur 2 tubes :

1. 1 tube EDTA pour faire une FNS.
2. 1 tube héparine pour les dosages.

FNS :

On pratique une FNS pour s'assurer que cellules érythrocytaire ne présente aucune anomalies et qu'elles soient dans les normes, en raison qu'on ne peut pas pratiquer sur un sujet présent des anomalies par se qu'il va nous fausser les résultats.

Préparation de suspension de travaille :

- Centrifugation du tube hépariné pendant 10 minutes à 3000 tour/min.
- Après la centrifugation ; à l'aide d'un marqueur on trace le niveau du plasma avant de l'éliminer.
- Elimination du surnageant (plasma) à l'aide d'une micropipette.
- On récupère la suspension cellulaire qu'on va utiliser pour préparer la suspension de travaille.
- A l'aide d'une micropipette ; on ajoute une quantité suffisante de solution de lavage glacée qu'on a déjà préparé pour éliminer toute trace du plasma.
- Mélanger légèrement le tube pour éviter l'hémolyse mécanique
- Centrifugation pendant 5 minutes pour que la solution de lavage ne se chauffe pas.
- Elimination du surnageant.

- On répète le lavage une deuxième fois pour s'assurer de l'élimination totale du plasma.

Préparation de la suspension de travail :

- On ajoute le tampon PBS dans le même tube jusqu'au même niveau du plasma qu'on a marqué au début.
- Mélanger doucement ; c'est la solution mère.
- Faire une deuxième FNS, dont le but est de comparer le VGM avec la première FNS pour s'assurer qu'il n'a pas changé au cours de la manipulation et pour confirmer ci-après que l'hémolyse est due à l'action du Glucantime sur les globules rouge et pas aux manipulations inappropriée.

Préparation des suspensions cellulaires : On met dans un béscher à l'aide d'une pipette :

- 9.9 ml T.PBS + 0.1 ml suspension mère.
- Au total on a un volume de 10 ml, c'est la solution fille de travail.
- On prépare 6 tubes correspondant au 3 temps (T0, T45, T90) de dosage dont on va faire nos lectures.
- Dans chaque tube on met 3 ml d'une solution de lavage
- Etiquetage des tubes :

Tube T0	Tube T45	Tube T90
Tube T0+G	Tube T45+G	Tube T90+G

- On prend deux beschers propres :
 Dans le premier : 5 ml de solution fille
 Dans le deuxième : 5 ml de solution fille + 75 µL de Glucantime
 On pose les 2 beschers sur un agitateur mécanique et on lance le chronomètre.
- A ce moment T0 : on prend de chaque bescher 1 ml de la suspension cellulaire qu'on va les mettre dans les 2 premiers tubes :
 Suspension sans G → 1 ml → tube T0
 Suspension avec G → 1 ml → tube T0+G
- Centrifugation pendant 5 minutes à vitesse maximal.
- Elimination du surnageant, on récupère le culot dans 1 ml de l'eau distillé
- Vortexer les 2 tubes.

1) Détermination de la concentration du potassium

- A T0 : Lectures sur l'ionogramme des deux premiers tubes qu'on a vortexé.
- On patiente 45 minutes de T0, et on répète la même procédure précédente sur les deux deuxièmes tubes, et la même chose après 90 minutes.

2) Détermination de la concentration du LDH :

Principe de la méthode :

La lactate déshydrogénase (LD ou LDH) catalyse la réduction du pyruvate par le NADH, pour donner le lactate et le NAD⁺. La concentration catalytique est déterminée à partir de la vitesse de disparition du NADH, mesuré à 340 nm.



➤ Dosage :

- On prépare 6 tubes correspondant au 3 temps (T0, T45, T90) de dosage dont on va faire nos lectures.
- Dans chaque tube on met 1 ml de réactif du travail.
- Etiquetage des tubes :

{	Tube T0	{	Tube T45	{	Tube T90
{	Tube T0+G	{	Tube T45+G	{	Tube T90+G

- A l'aide d'une micropipette on prélève 20µl de la suspension cellulaire correspondant au 2 tubes qu'on a déjà vortexer dans la première partie ; et on les ajoute dans les 2 premiers tubes (T0, T0+G).

<i>Réactif du travail</i>	<i>1 ml</i>
<i>Echantillon</i>	<i>20µl</i>

- Mélanger et mettre les cuves dans le spectromètre.
- Après 30 secondes on note l'absorbance initiale et on effectue de nouvelles lectures chaque minute pendant 3 minutes.
- On calcule l'accroissement moyen d'absorbance par minute ($\Delta A/\text{min}$).

On a : $\Delta A = \Delta A_1 + \Delta A_2/2$

La concentration en LDH de l'échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{LDH}] = \Delta A / \text{min} \times \frac{V_t \times 106}{\epsilon \times l \times V_s} \dots\dots\dots \text{U/L}$$

V_t : volume total de la réaction = 1.02

V_s : volume de l'échantillon = 0.02

ϵ : coefficient d'absorption molaire de NADH à 340 nm = 6300

l : le pas de lumière = 1 cm

1 UL = 0.0166 $\mu\text{kat/L}$

On en déduit la formule suivante pour le calcul de la concentration catalytique :

$$\begin{aligned} &\Delta A / \text{min} \times 8095 \text{ U/L} \\ &\quad \times 135 \mu\text{kat/L} \end{aligned}$$

Exemple de Procédure du Calcule :

Après lecture sur spectrophotomètre ; les résultats d'absorption comme suite :

Tableau VI : Résultats d'absorptions :

T	T_0		T_{45}		T_{90}	
	-	+	-	+	-	+
30''	1.840	1.682	1.783	1.736	1.695	1.798
1'	1.830	1.674	1.778	1.729	1.691	1.788
2'	1.816	1.657	1.767	1.712	1.679	1.765
3'	1.800	1.639	1.751	1.695	1.665	1.750

Tableau VII : Calcule $\Delta A/\text{min}$ et [LDH] :

<i>T</i>	<i>T0</i>		<i>T45</i>		<i>T90</i>	
	-	+	-	+	-	+
$\Delta A/\text{min}$	0.017	0.015	0.017	0.013	0.013	0.011
[LDH] U/L	142	121	142	109	109	89

2. Double dose : 150 μl

On répète les même étapes que l'expérience précédente à condition qu'à l'étape ou on va ajouter le Glucantime on double la dose (150 μl) et on détermine les concentrations de potassium, LDH et aussi les concentrations des protéines et hémoglobines

✓ Détermination de la concentration des protéines totales :

Principe :

Les protéines dans un milieu basique de sulfate de cuivre contenant le tartrate (réactif de Biuret) forment un complexe coloré en bleu violet.

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des protéines totales de l'échantillon.

Préparation du blanc :

1 ml de Biuret + 200 μl d'eau distillée \longrightarrow 10 mn \longrightarrow 150 μl de folin (1N) \longrightarrow 30 mn \longrightarrow lecture à 710 nm.

Préparation des échantillons :

On procède sur les mêmes échantillons témoins (T0/T45/T90) et échantillons avec Glucantime (T0G/T45G/T90G) :

1 ml de Biuret + 200 μl échantion \longrightarrow 10 mn \longrightarrow 150 μl de folin (1N) 30 mn \longrightarrow lecture de la concentration (g/dl) à 710 nm.

✓ Détermination de la concentration d'hémoglobine :

On répète les mêmes étapes que l'expérience précédente : Après préparation des 2 beschers : suspension témoin et suspension avec Glucantime :

- a) Détermine la concentration d'hémoglobine dans 1ml du suspension : à partir de la suspension témoin on prélève 1ml et la mettre dans un tube avec 3ml de solution de lavage, centrifuger, éliminer le surnageant et récupérer le culot dans 1ml d'eau distillée puis vortexer.

Lecture de concentration d'Hb par le spectrophotomètre, cette concentration correspond à l'hémoglobine totale présente dans 1 ml de la suspension c-à-d : 100%.

- b) Déterminer les concentrations des deux suspensions en fonction du temps :
 - On prépare 6 tubes correspondant au 3 temps (T0, T45, T90) de dosage dont on va faire nos lectures.
 - Dans chaque tube on met 3 ml d'une solution de lavage
 - Au moment de l'ajout du Glucantime (T0) on prélève 1ml de chaque suspension et on les met dans les 2 premiers tubes.
 - Centrifuger et récupérer le surnageant ou on va faire la lecture des concentrations dans le spectrophotomètre.

IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS :

Les résultats de nos tests et les valeurs qu'on a trouvés sont démontrés dans les graphes suivants en fonction du temps :

A. Les tests à dose = 75 µl

Pour la première dose on a pratiquée 18 tests, dont on a exclus les tests erronés.

1) Potassium et LDH :

Test 1 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	88	87
GR.....Cell/l	$5.33 \cdot 10^{12}$	$5.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	46.6	44.6

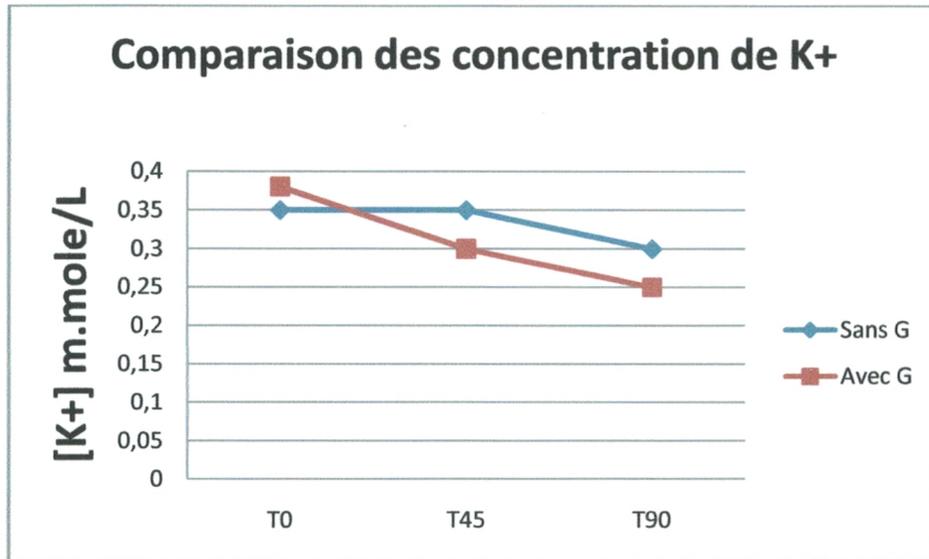


Figure 10 : Test 01 [K+]

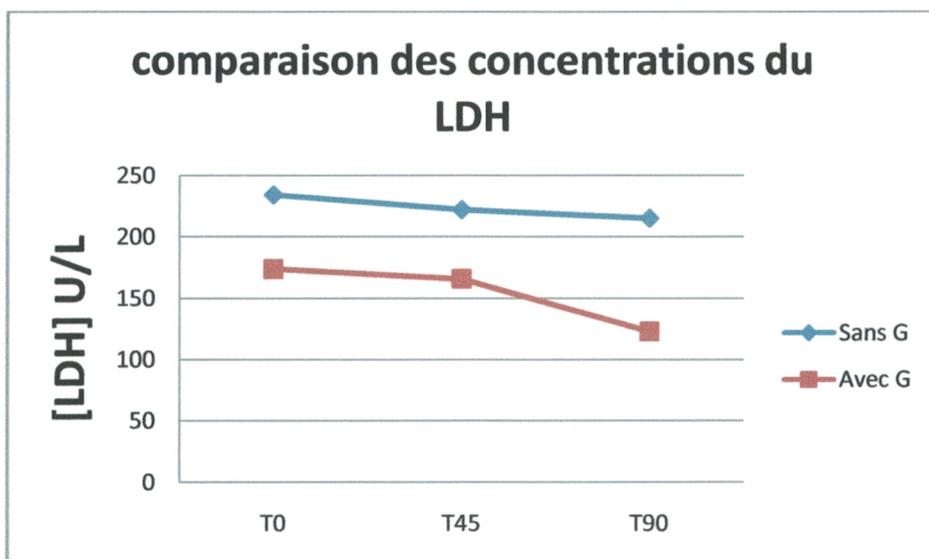


Figure 11 : Test 01 [LDH]

Test 2 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	81	80
GR.....Cell/l	$6.33 \cdot 10^{12}$	$6.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	74.6	76.6

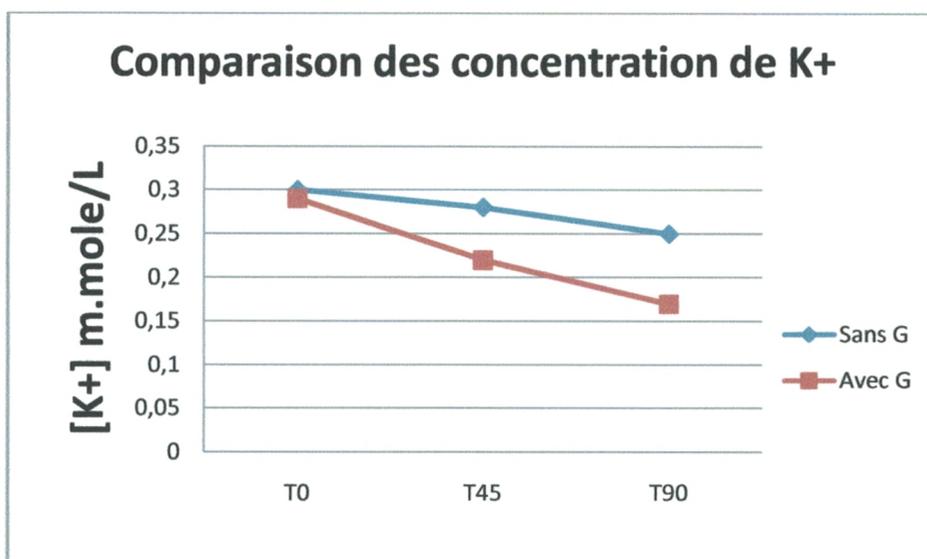


Figure 12 : Test 02 [K+]

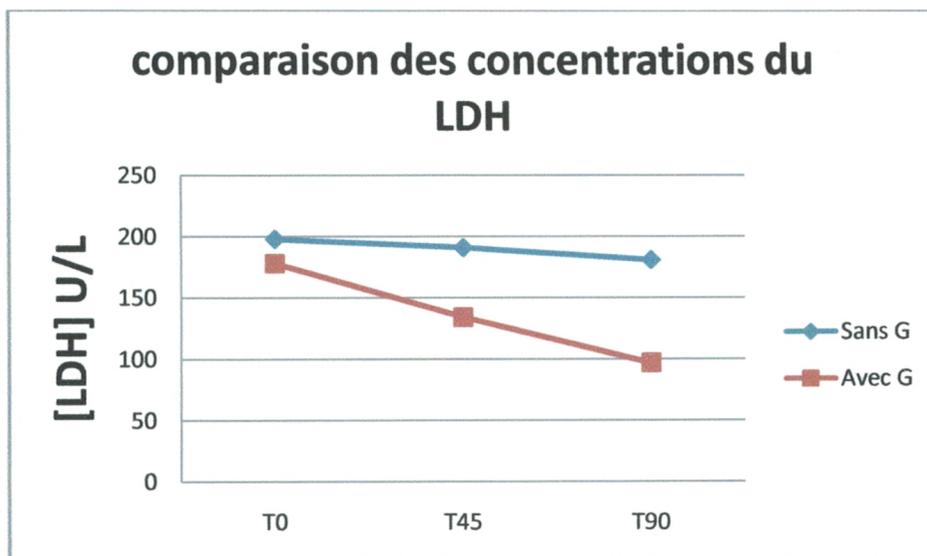


Figure 13 : Test 02 [LDH]

Test 3 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	82	80
GR.....Cell/l	$5.08 \cdot 10^{12}$	$5.00 \cdot 10^{12}$
HC.....%	51.67	51.6

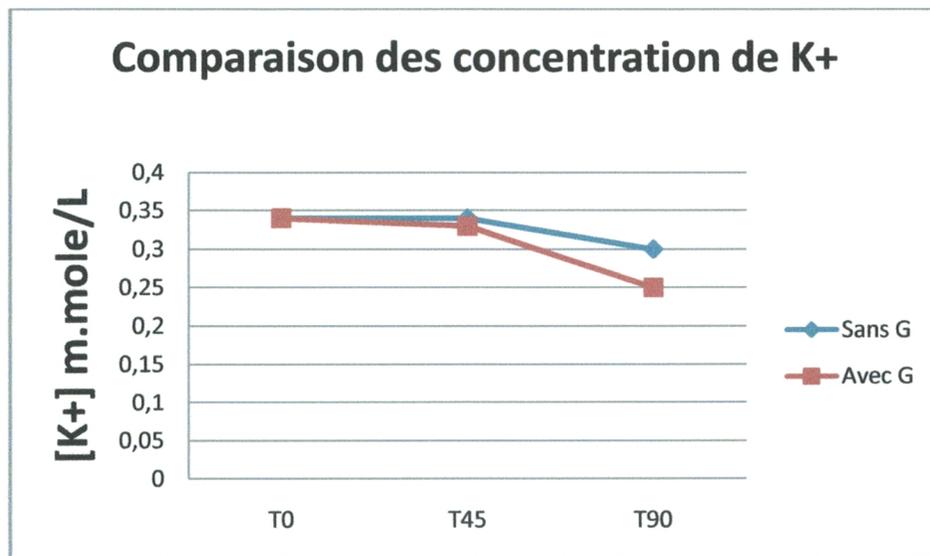


Figure 14 : Test 03 [K+]

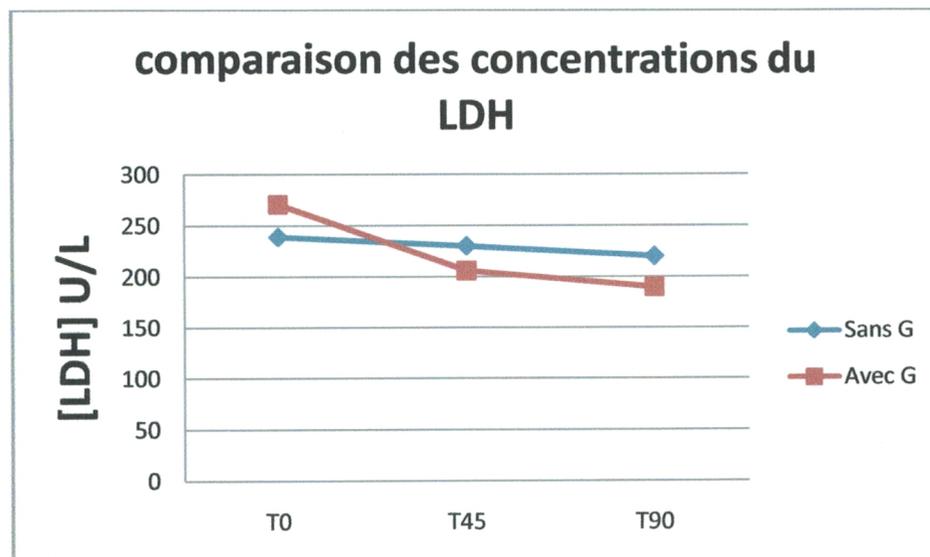


Figure 15 : Test 03 [LDH]

Test 4 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	86	85
GR.....Cell/l	$5.32 \cdot 10^{12}$	$5.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	45.4	44.6

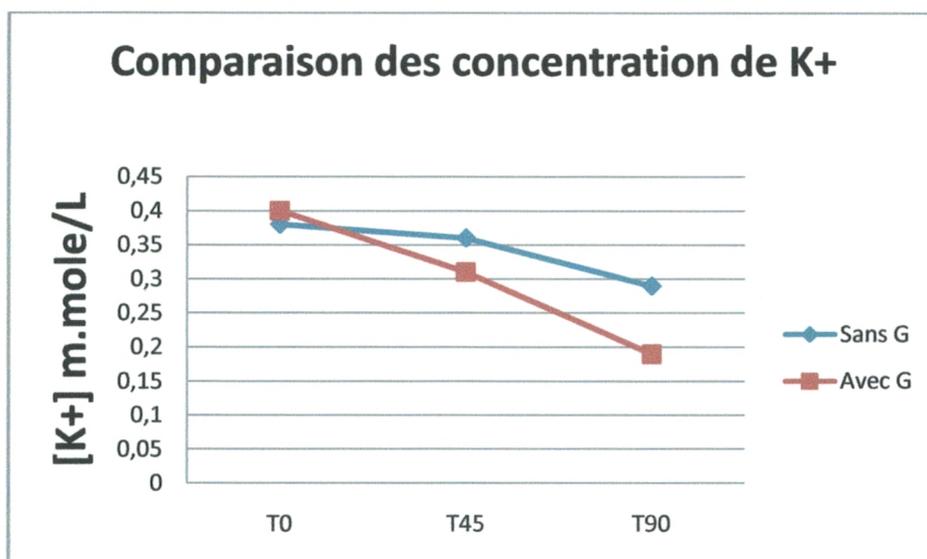


Figure 16 : Test 04 [K+]

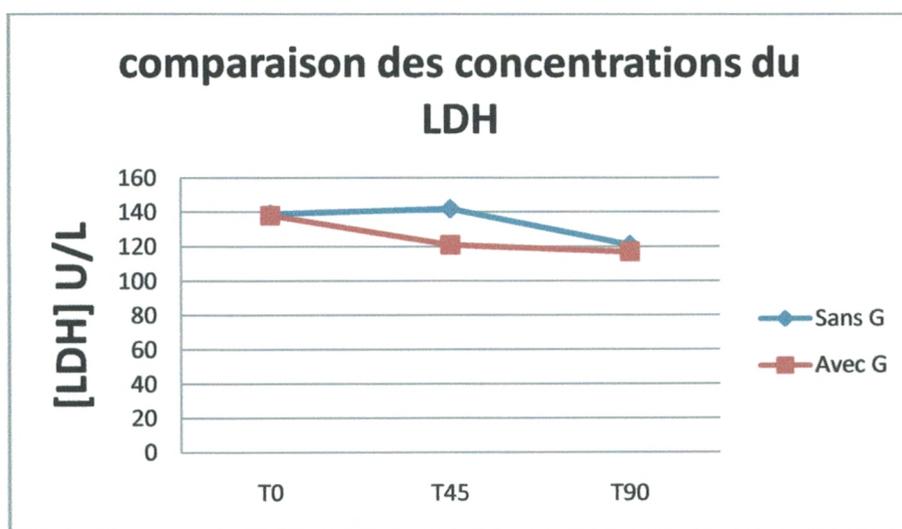


Figure 16 : Test 04 [LDH]

Test 5 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	82	80
GR.....Cell/l	$5.22 \cdot 10^{12}$	$5.18 \cdot 10^{12}$
HC.....%	46.6	44.6

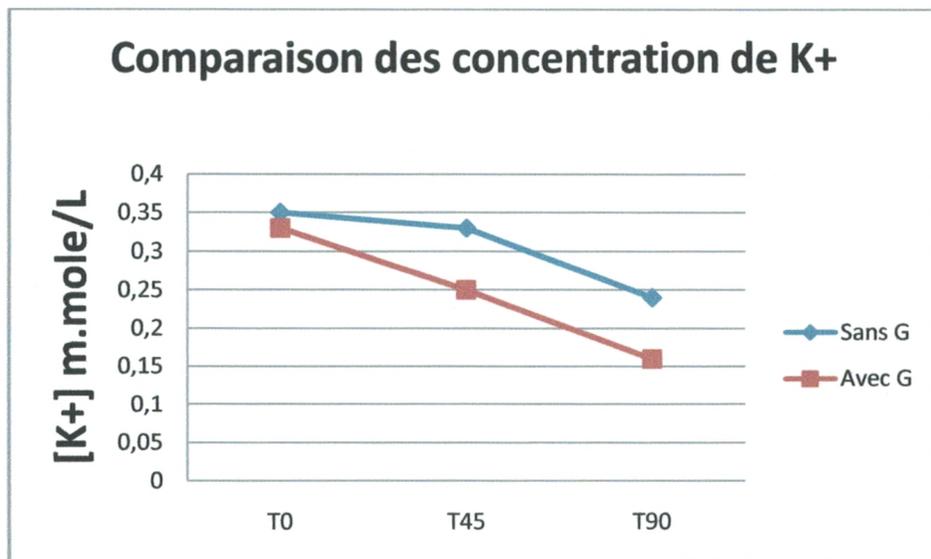


Figure 17 : Test 05 [K+]

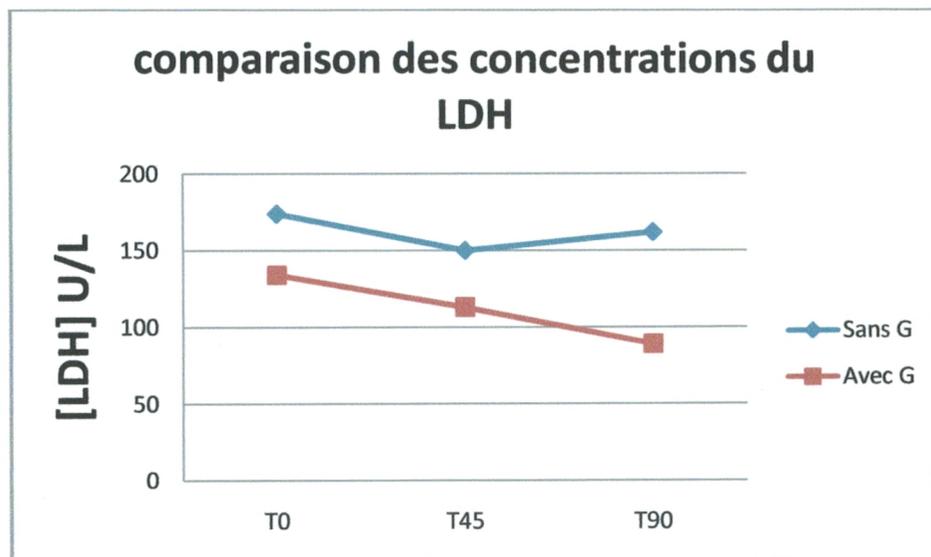


Figure 18 : Test 05 [LDH]

Test 6 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	81	80
GR.....Cell/l	$6.32 \cdot 10^{12}$	$6.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	52.98	51.6

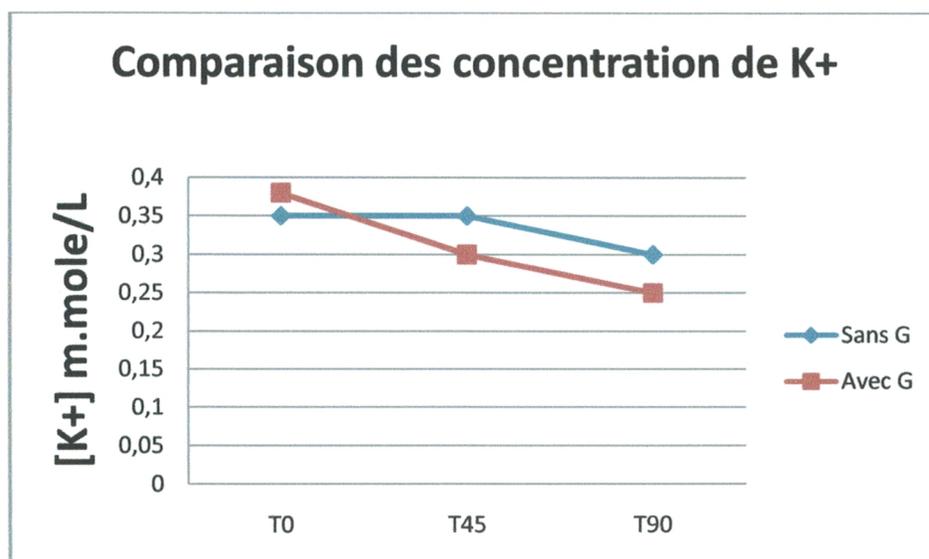


Figure 19 : Test 06 [K+]

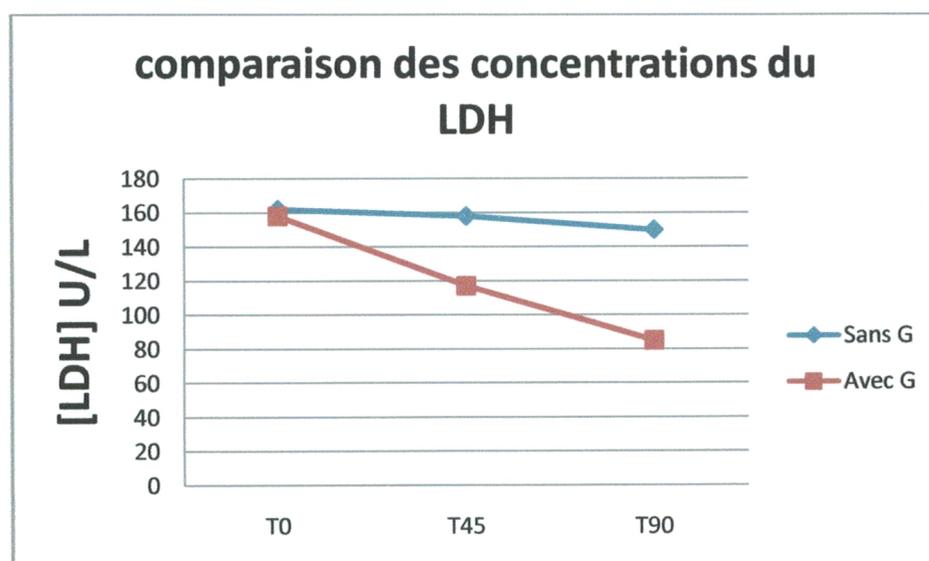


Figure 20 : Test 06 [LDH]

Test 7 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84.9	83
GR.....Cell/l	$6.33 \cdot 10^{12}$	$6.32 \cdot 10^{12}$
HC.....%	74.6	72.8

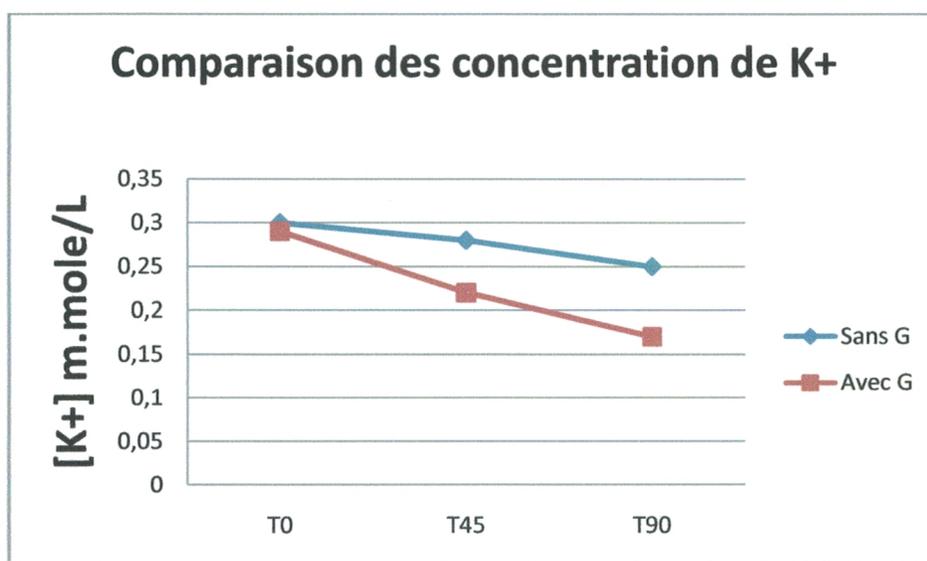


Figure 21 : Test 07 [K+]

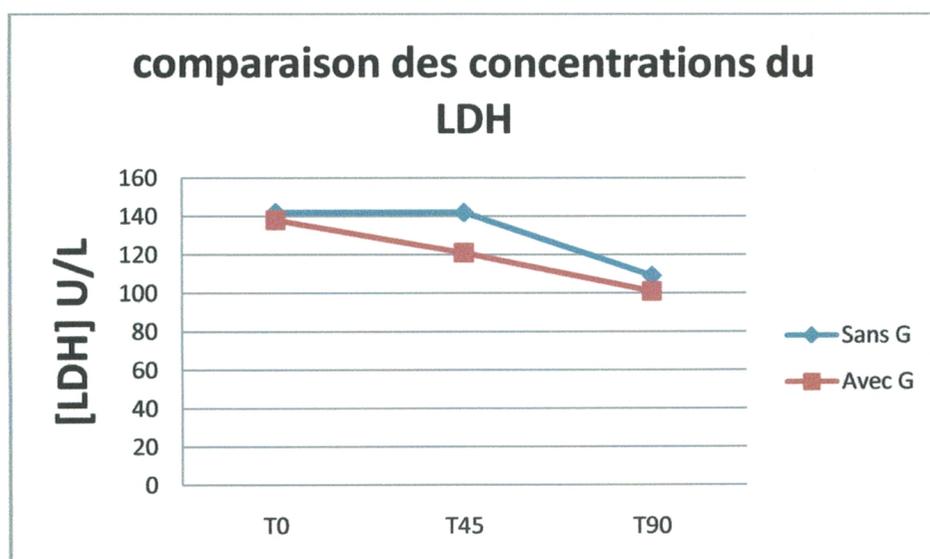


Figure 22 : Test 07 [LDH]

Test 8 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	88	87
GR.....Cell/l	$6.16 \cdot 10^{12}$	$6.06 \cdot 10^{12}$
HC.....%	51.67	51.56

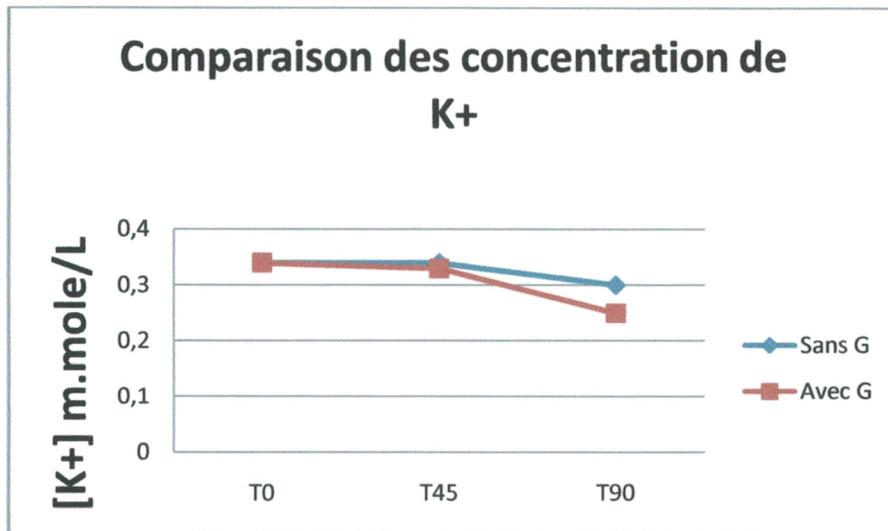


Figure 23 : Test 08 [K+]

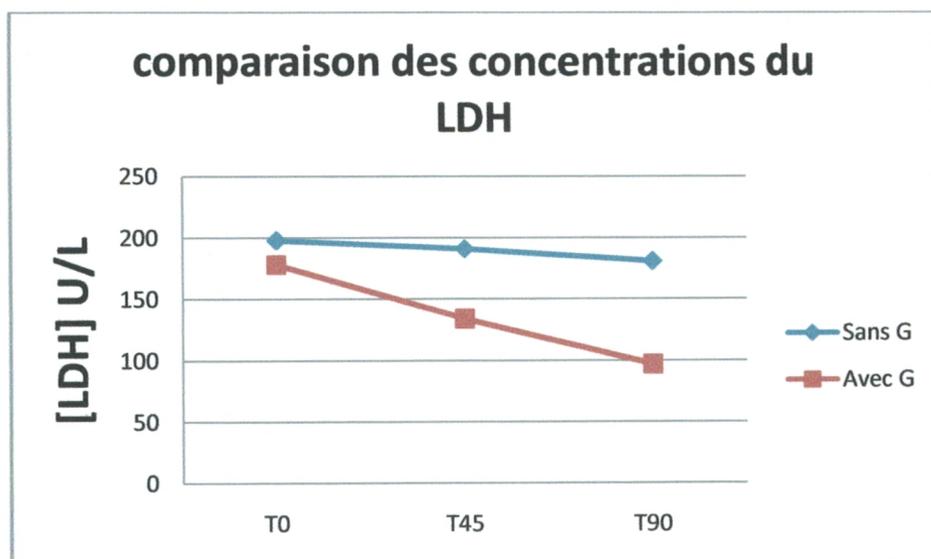


Figure 24 : Test 08 [LDH]

Test 09 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	87	87
GR.....Cell/l	$5.07 \cdot 10^{12}$	$5.02 \cdot 10^{12}$
HC.....%	44.45	44.3

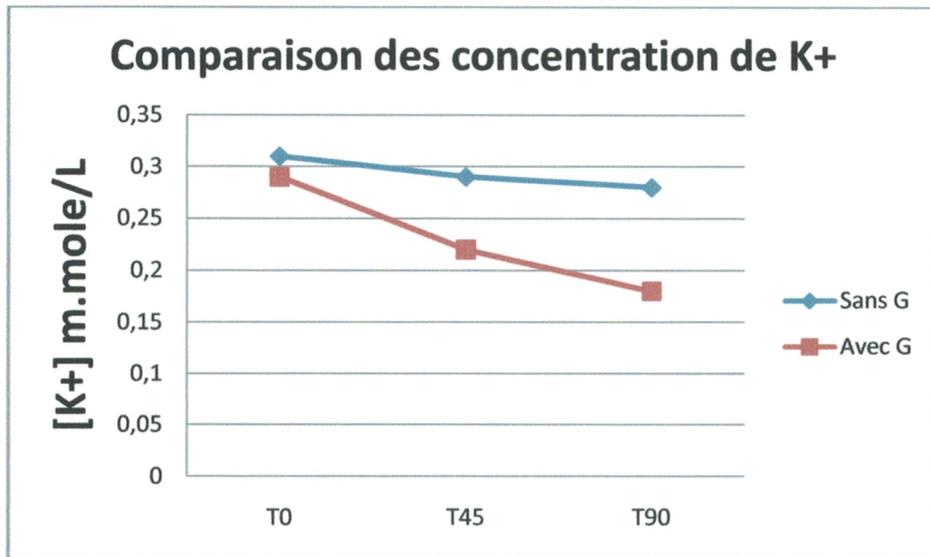


Figure 25 : Test 09 [K+]

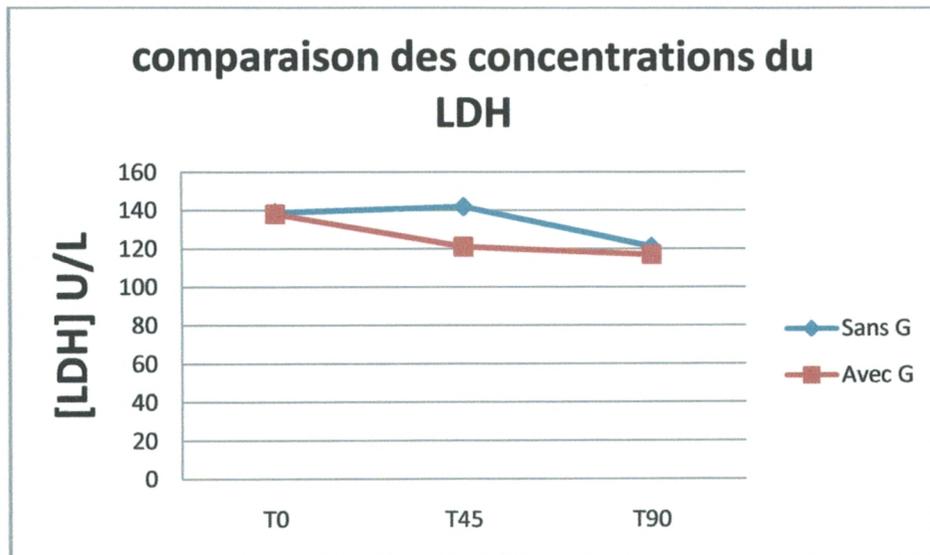


Figure 26 : Test 09 [LDH]

Test 10 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84.9	83
GR.....Cell/l	$6.33 \cdot 10^{12}$	$6.08 \cdot 10^{12}$
HC.....%	61.65	61.6

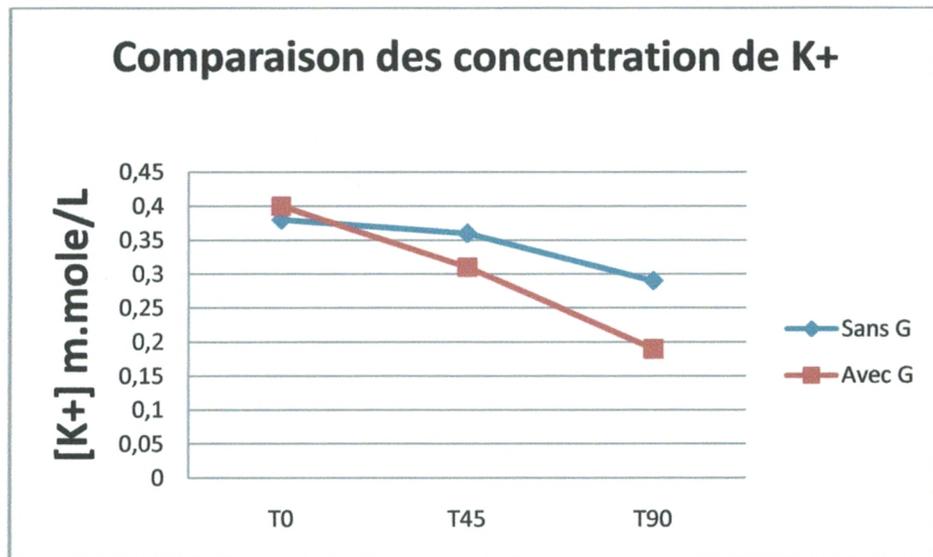


Figure 27 : Test 10 [K+]

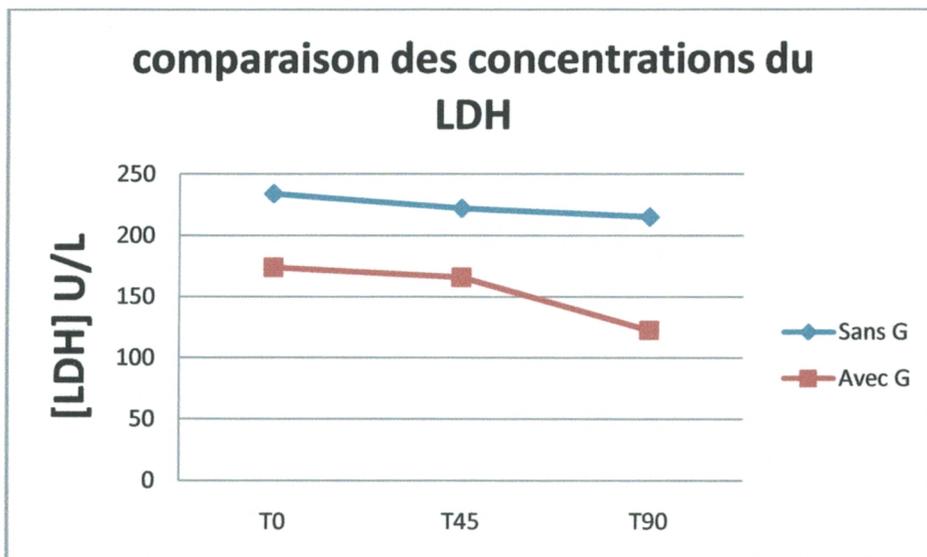


Figure 28 : Test 10 [LDH]

Test 11 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	87	87
GR.....Cell/l	$5.08 \cdot 10^{12}$	$5.01 \cdot 10^{12}$
HC.....%	43.6	40.6

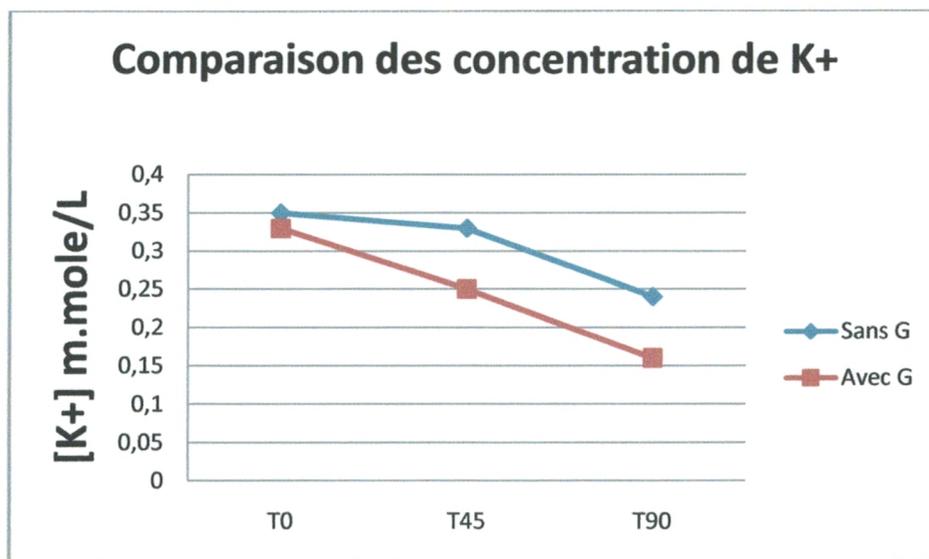


Figure 29 : Test 11 [K+]

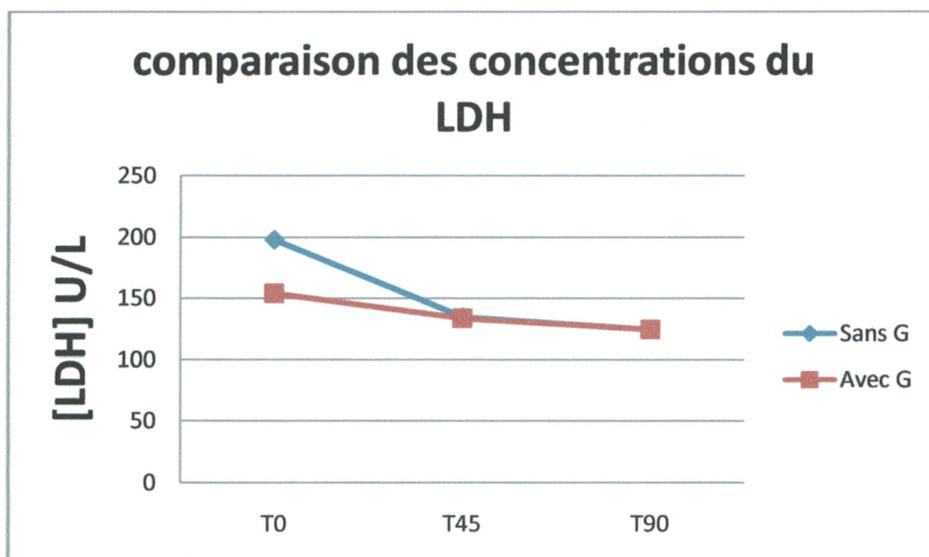


Figure 30 : Test 11 [LDH]

Test 12 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84	83
GR.....Cell/l	$5.33 \cdot 10^{12}$	$5.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	46.6	44.6

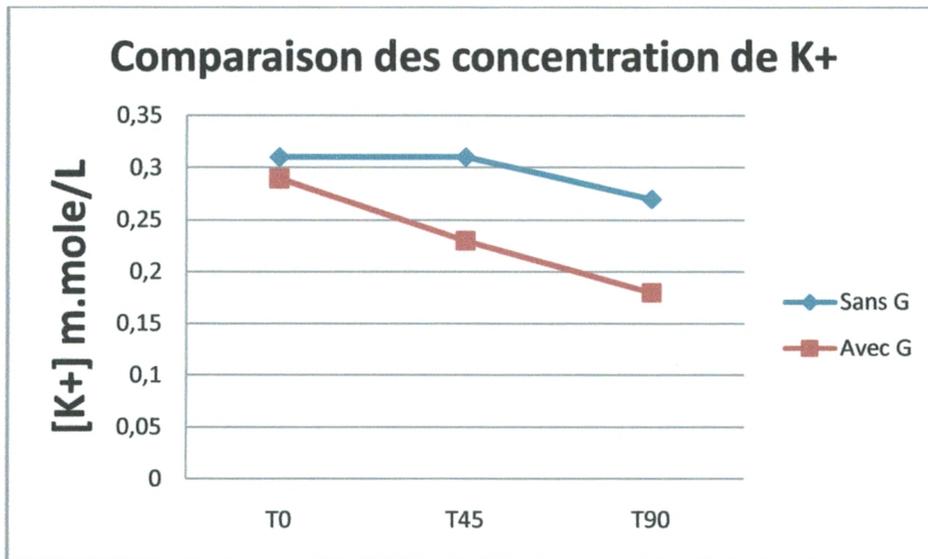


Figure 31 : Test 12 [K+]

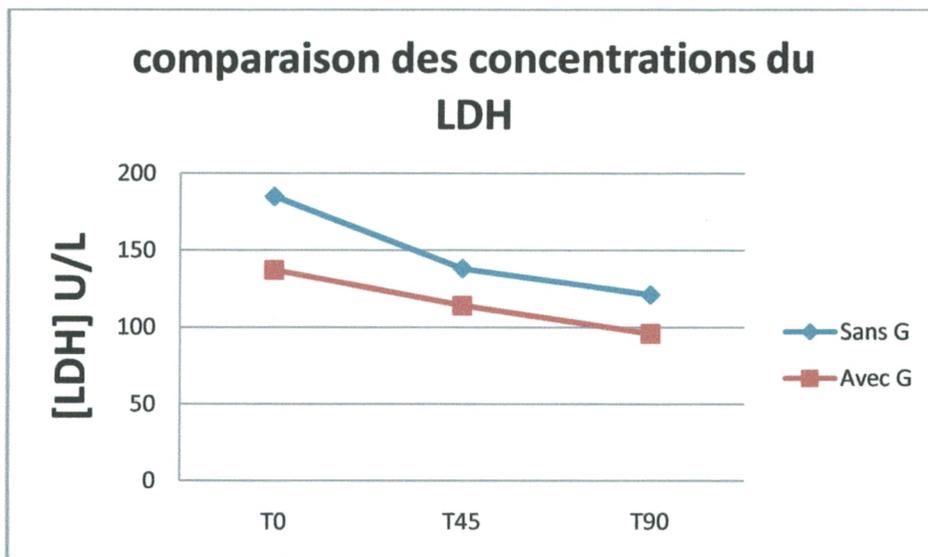


Figure 32 : Test 12 [LDH]

Test 13 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84.9	83
GR.....Cell/l	$5.12 \cdot 10^{12}$	$5.02 \cdot 10^{12}$
HC.....%	74.6	73.6

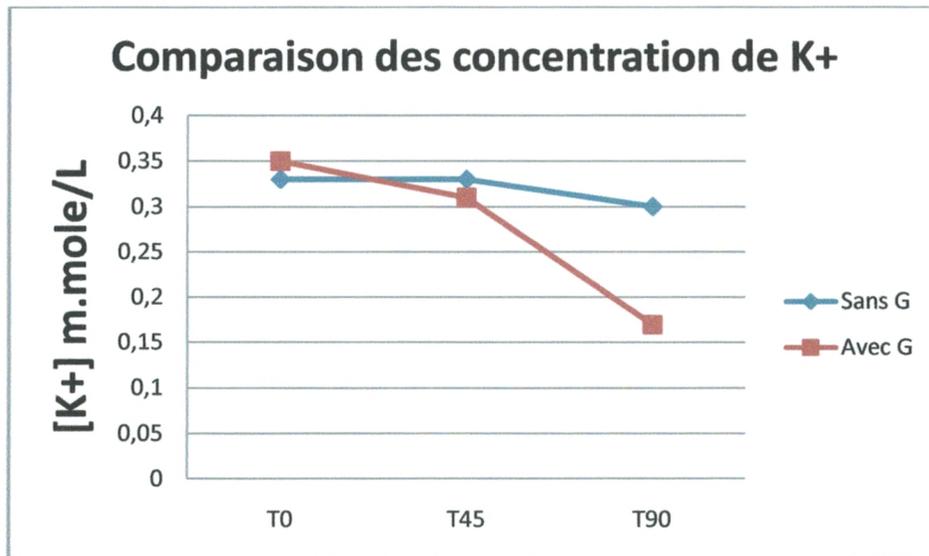


Figure 33 : Test 13 [K+]

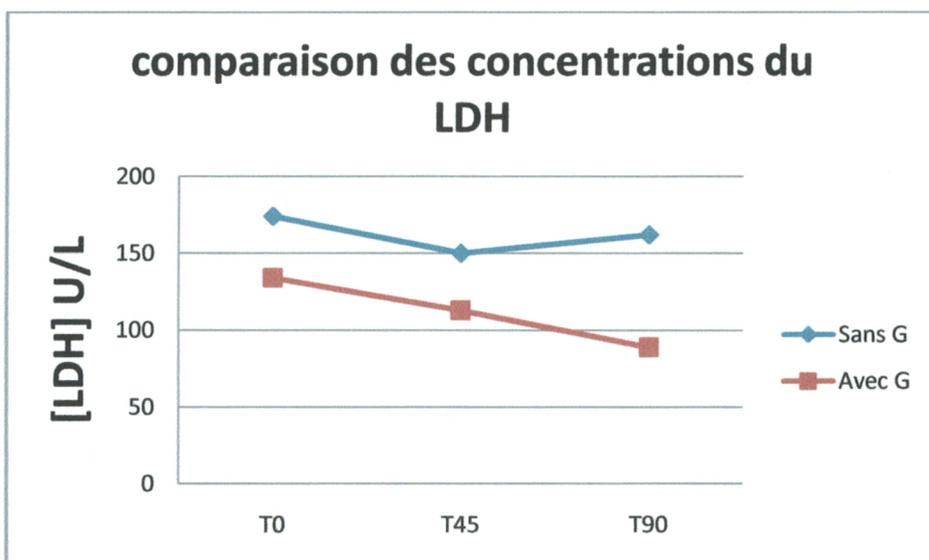


Figure 34 : Test 13 [LDH]

Test 14 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84	83
GR.....Cell/l	$5.41 \cdot 10^{12}$	$5.35 \cdot 10^{12}$
HC.....%	45.6	43.6

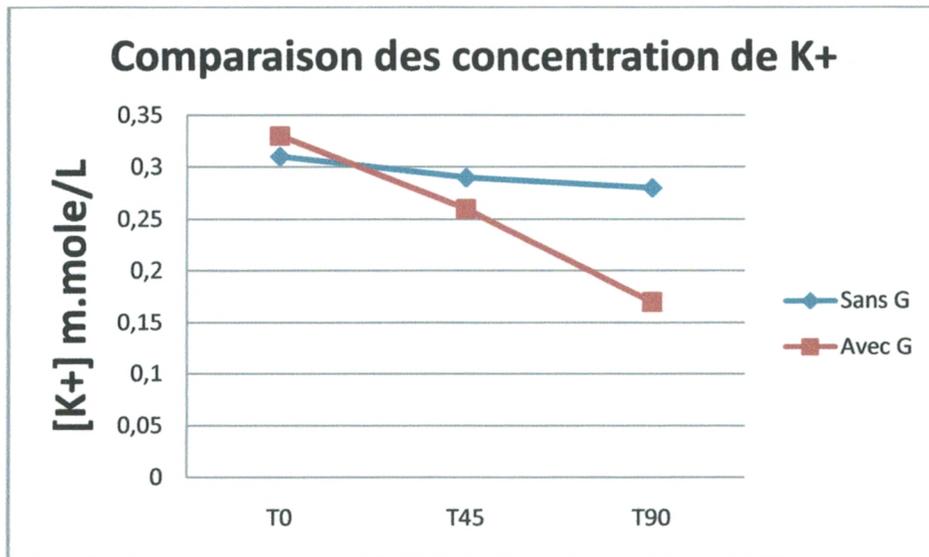


Figure 35 : Test 14 [K+]

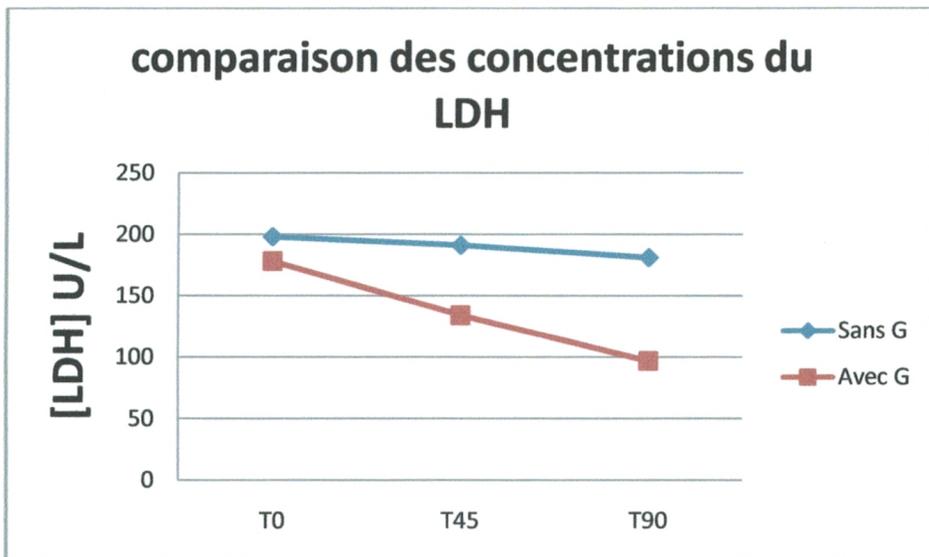


Figure 36 : Test 14 [LDH]

Test 15 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	87	87
GR.....Cell/l	$6.33 \cdot 10^{12}$	$6.28 \cdot 10^{12}$
HC.....%	51.45	49.6

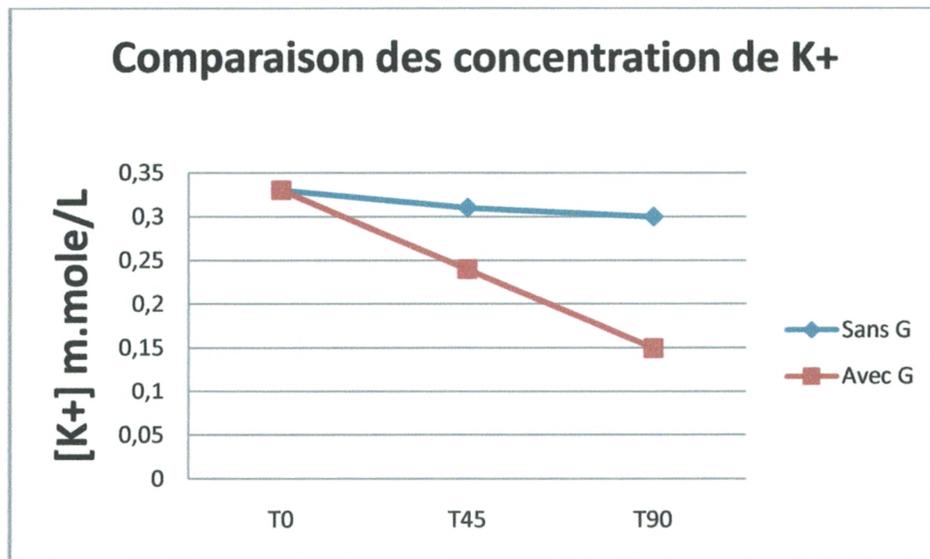


Figure 3 : Test 15 [K⁺]

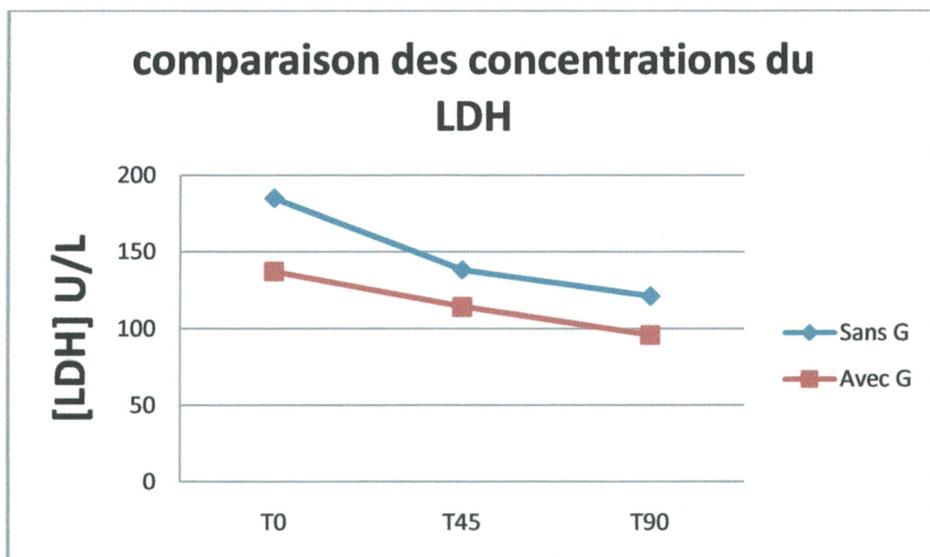


Figure 38 : Test 15 [LDH]

Interprétation des graphes :

A T0 : on a remarqué que la concentration intracellulaire du potassium et celle du LDH est pratiquement la même dans les deux suspensions cellulaires.

Après 45 minutes on a remarqué que la concentration intracellulaire en potassium et en LDH a nettement diminuée dans la suspension cellulaire qui est au contact avec la molécule par rapport à T0.

A T90, la concentration intracellulaire du potassium et du LDH a encore diminué dans les deux suspensions cellulaires et cette diminution est beaucoup plus dans celle qui contient la molécule.

La sortie du potassium peut être due soit à l'inhibition de la pompe K^+/Na^+ ATPase, soit à une lyse de la membrane cellulaire soit les deux.

Pour le LDH on a remarqué une nette diminution de la concentration au cours du temps, qui est plus remarquable dans la suspension cellulaire qui contient la molécule. Cette diminution peut être expliquée par une lyse de la membrane du globule rouge.

Pour la suspension sans Glucantime, il y a une légère diminution de la concentration s'explique par l'hémolyse mécanique au cours de la manipulation et au cours de l'agitation mécanique.

B. Les tests à double dose = 150 µl :

1. Potassium et LDH:

Pour la deuxième dose on a pratiqué 20 tests pour les deux paramètres potassium et

LDH :

Test 01:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	88	87
GR.....Cell/l	$5.33 \cdot 10^{12}$	$5.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	46.6	44.6

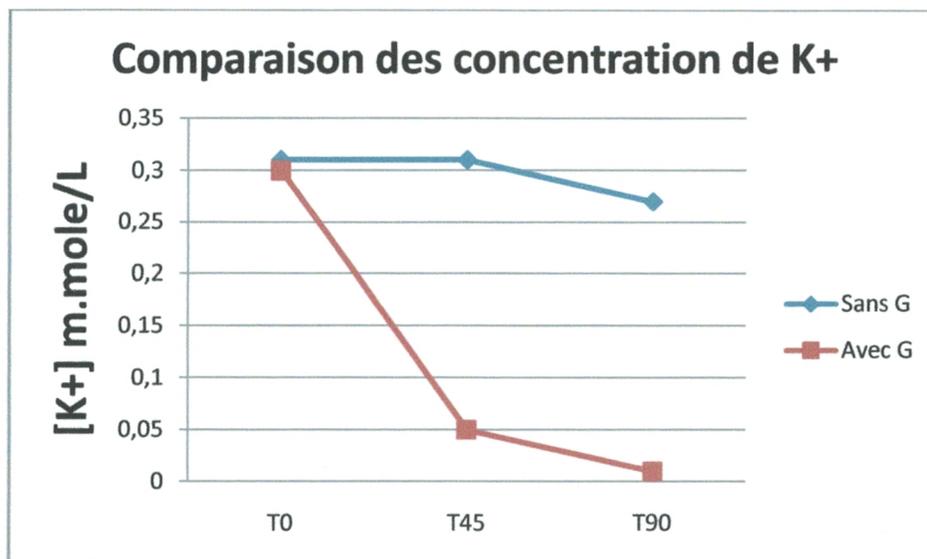


Figure 39 : Test 01 [K⁺]

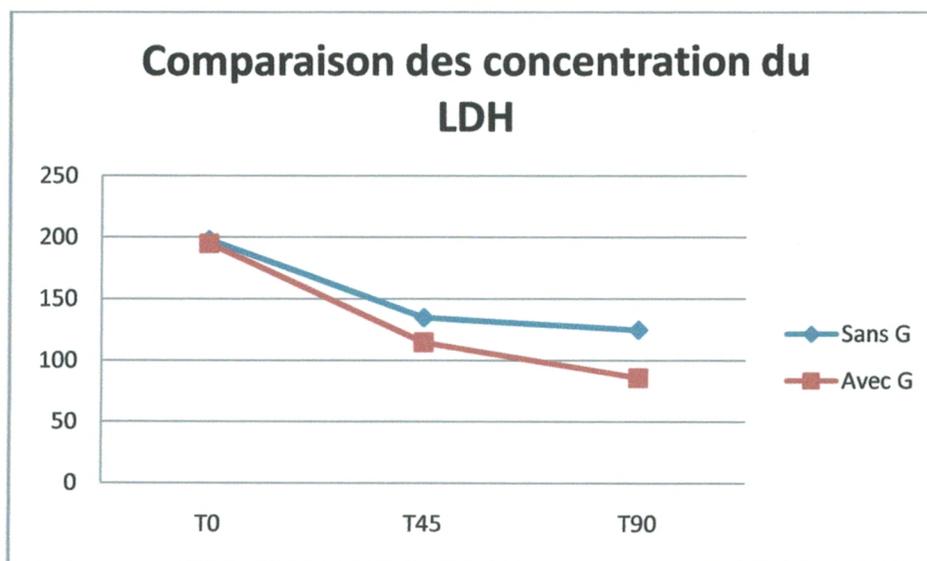


Figure 40 : Test 01 [LDH]

Test 02:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	81	80
GR.....Cell/l	$6.33 \cdot 10^{12}$	$6.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	74.6	76.6

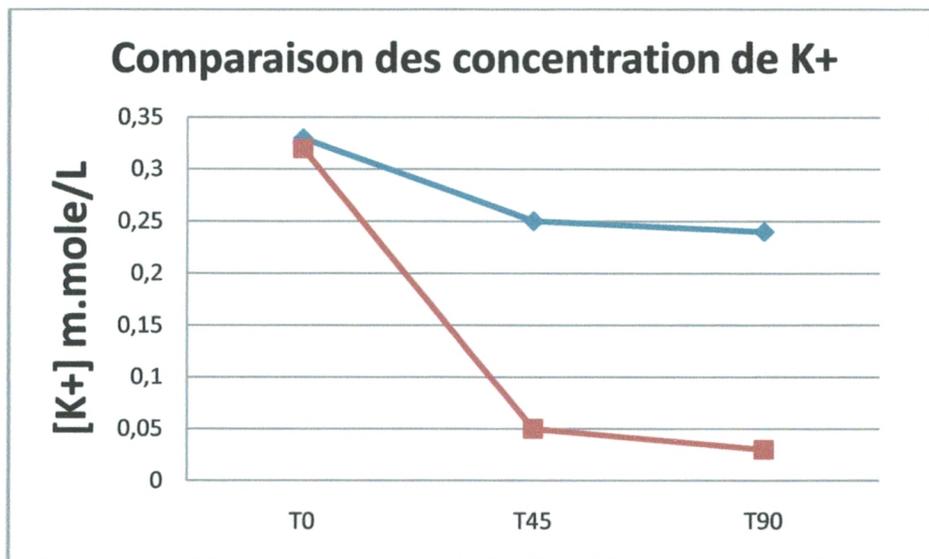


Figure 41 : Test 02 [K+]

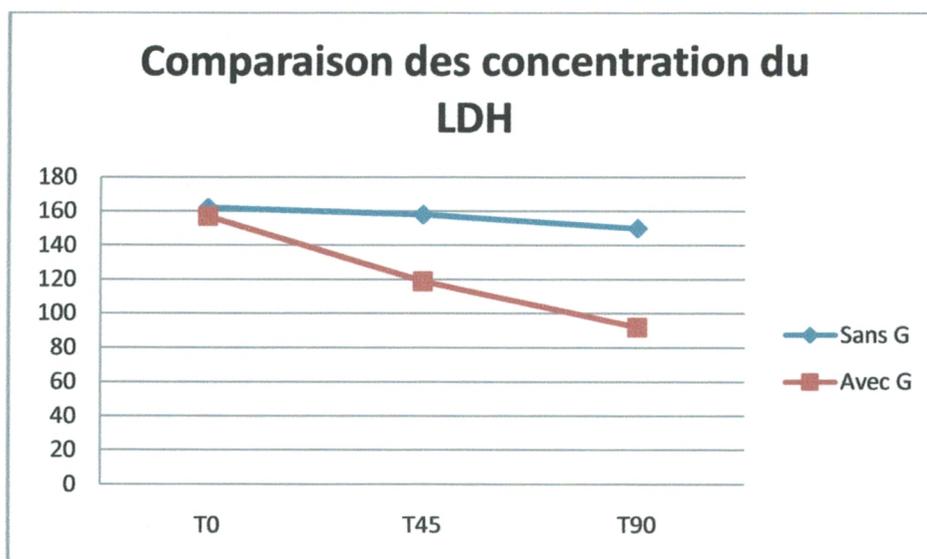


Figure 42 : Test 02 [LDH]

Test 03:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84	83
GR.....Cell/l	$5.41 \cdot 10^{12}$	$5.35 \cdot 10^{12}$
HC.....%	45.6	43.6

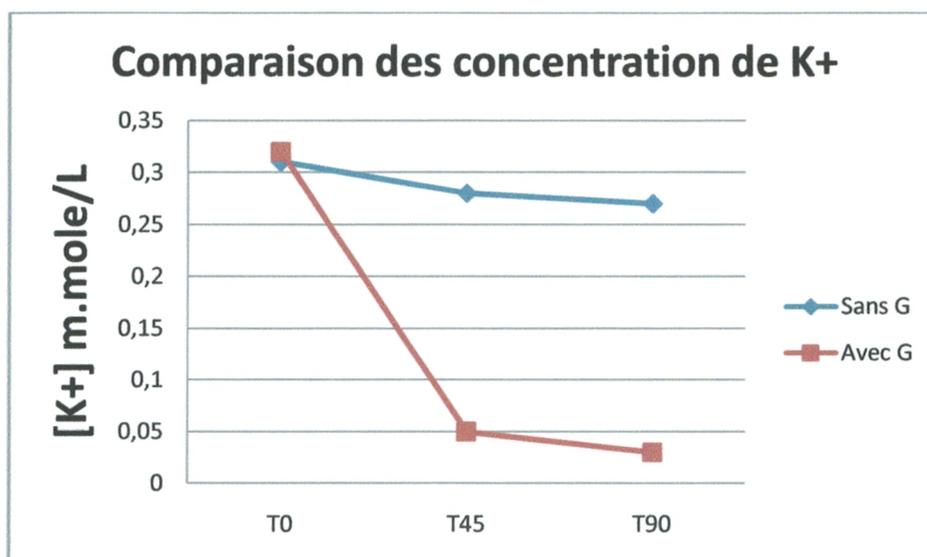


Figure 43 : Test 03 [K+]

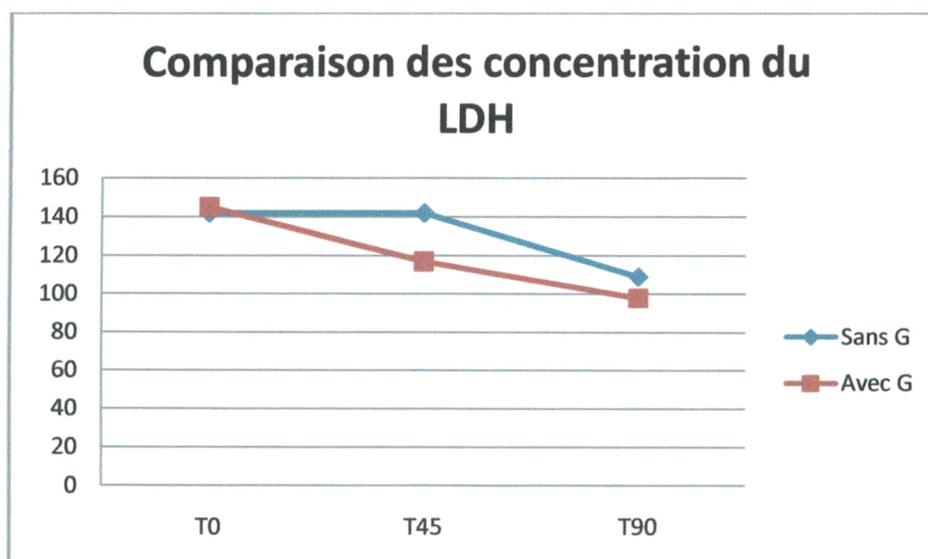


Figure 44 : Test 03 [LDH]

Test 04:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84.9	83
GR.....Cell/l	$5.12 \cdot 10^{12}$	$5.02 \cdot 10^{12}$
HC.....%	74.6	73.6

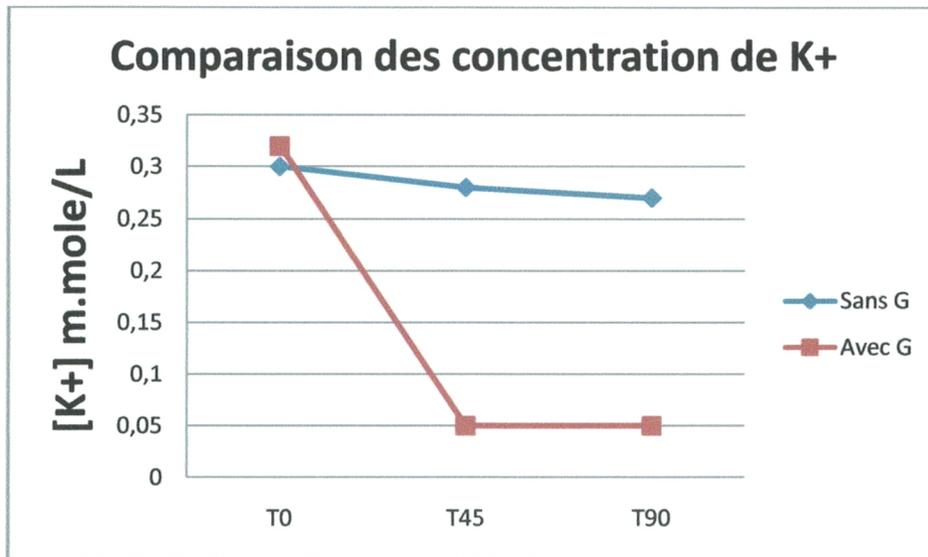


Figure 45 : Test 04 [K+]

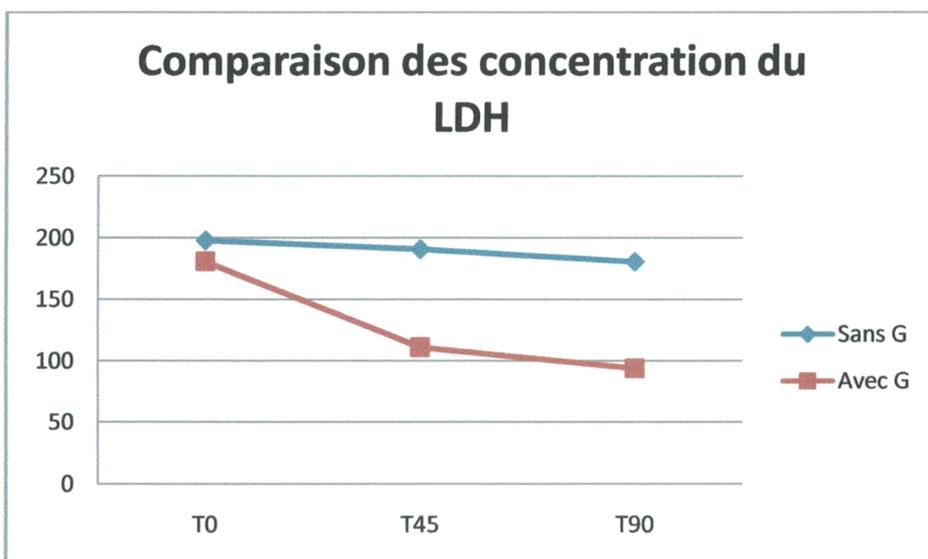


Figure 46 : Test 04 [LDH]

Test 05:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84	83
GR.....Cell/l	$5.33 \cdot 10^{12}$	$5.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	46.6	44.6

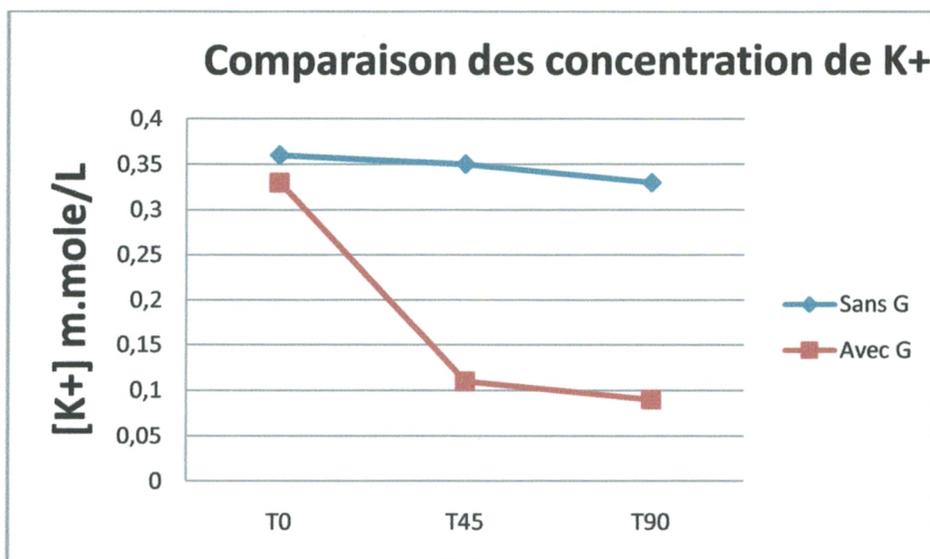


Figure 47 : Test 05 [K+]

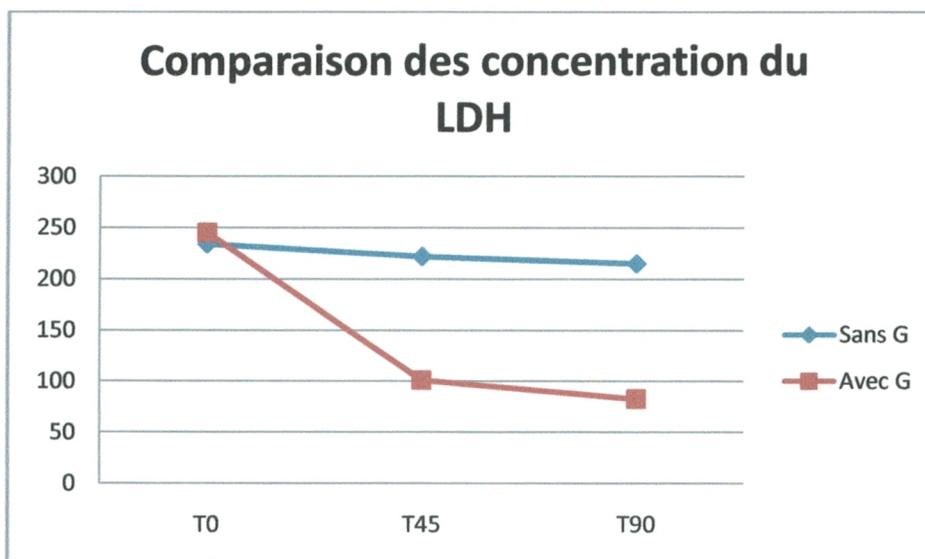


Figure 48 : Test 05 [LDH]

Test 06:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84.9	83
GR.....Cell/l	$5.12 \cdot 10^{12}$	$5.02 \cdot 10^{12}$
HC.....%	74.6	73.6

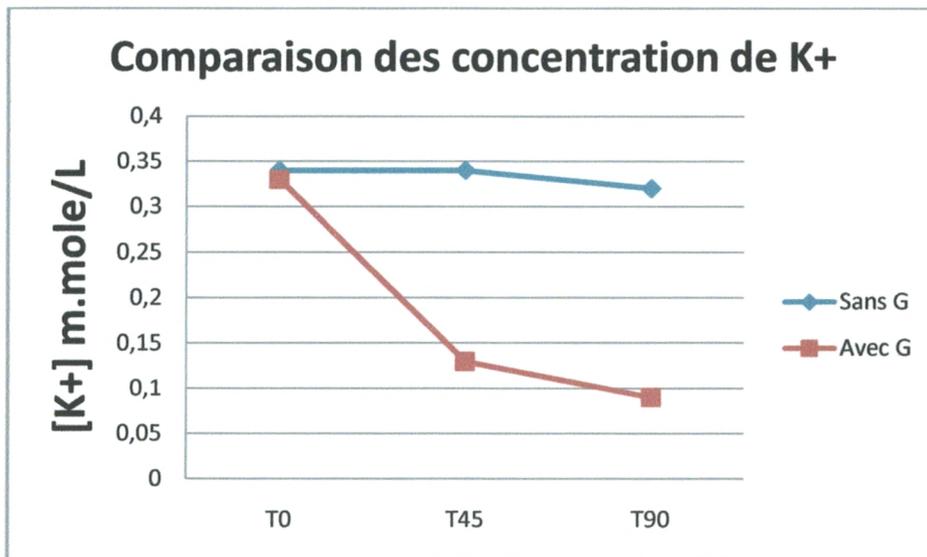


Figure 49 : Test 06 [K+]

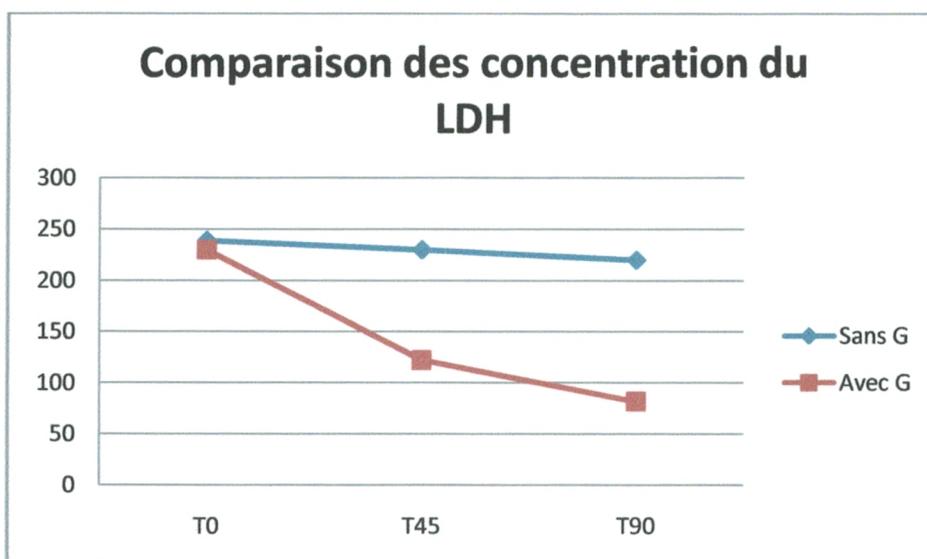


Figure 50 : Test 06 [LDH]

Test 07 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....	84	83
GR.....Cell/l	$5.33 \cdot 10^{12}$	$5.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	46.6	44.6

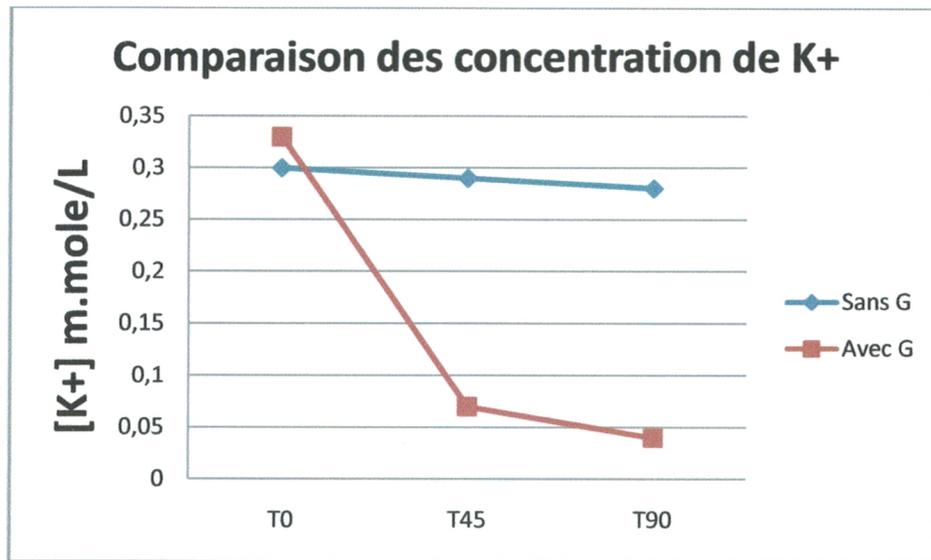


Figure 51 : Test 07 [K+]

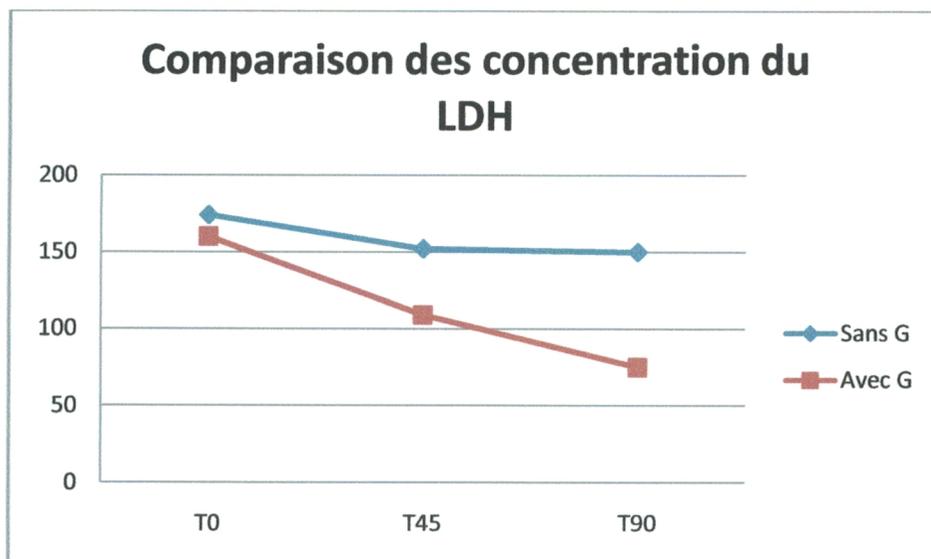


Figure 52 : Test 07 [LDH]

Test 08 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	87	87
GR.....Cell/l	$5.08 \cdot 10^{12}$	$5.01 \cdot 10^{12}$
HC.....%	43.6	40.6

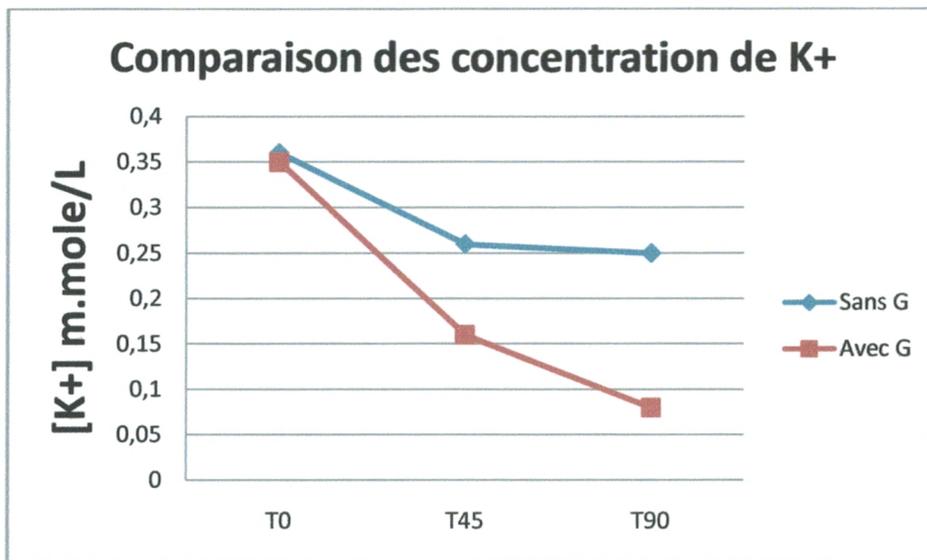


Figure 53 : Test 08 [K+]

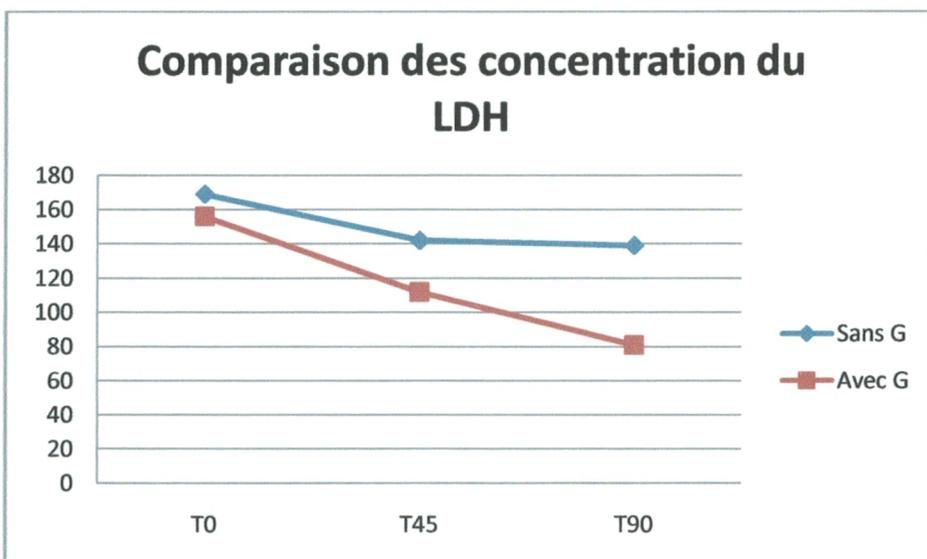


Figure 54 : Test 08 [LDH]

Test 09 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84.9	83
GR.....Cell/l	$6.33 \cdot 10^{12}$	$6.08 \cdot 10^{12}$
HC.....%	61.65	61.6

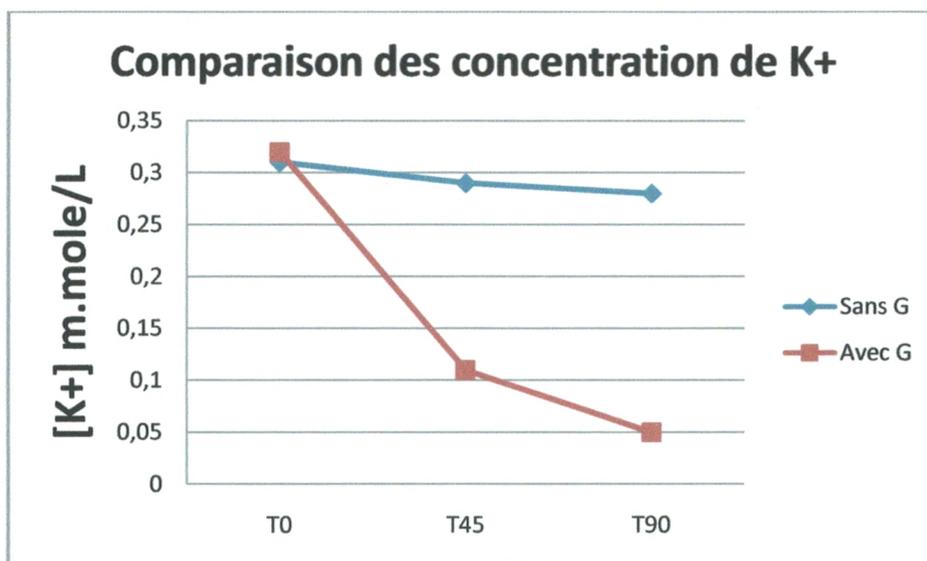


Figure 55 : Test 09 [K+]

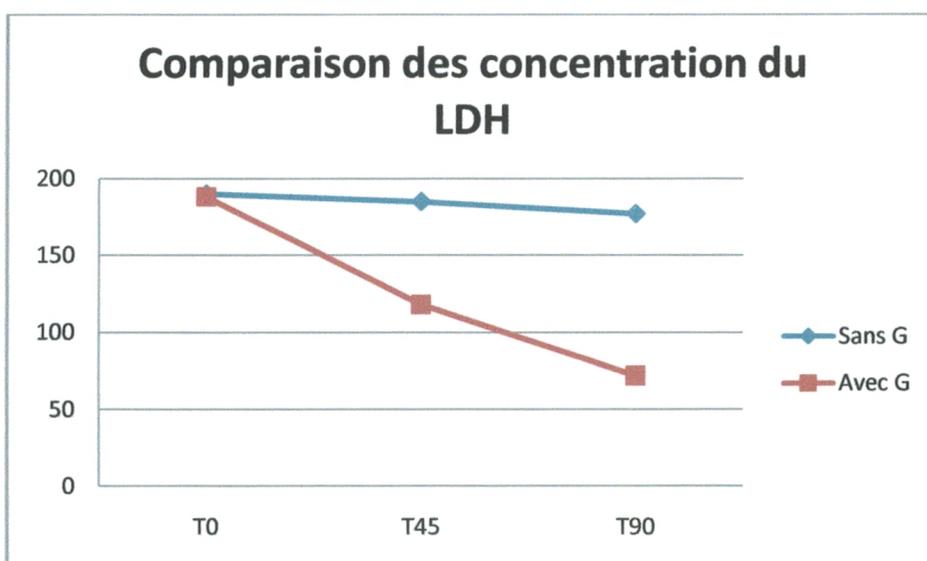


Figure 56 : Test 09 [LDH]

Test 10 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	87	87
GR.....Cell/l	$5.07 \cdot 10^{12}$	$5.02 \cdot 10^{12}$
HC.....%	44.45	44.3

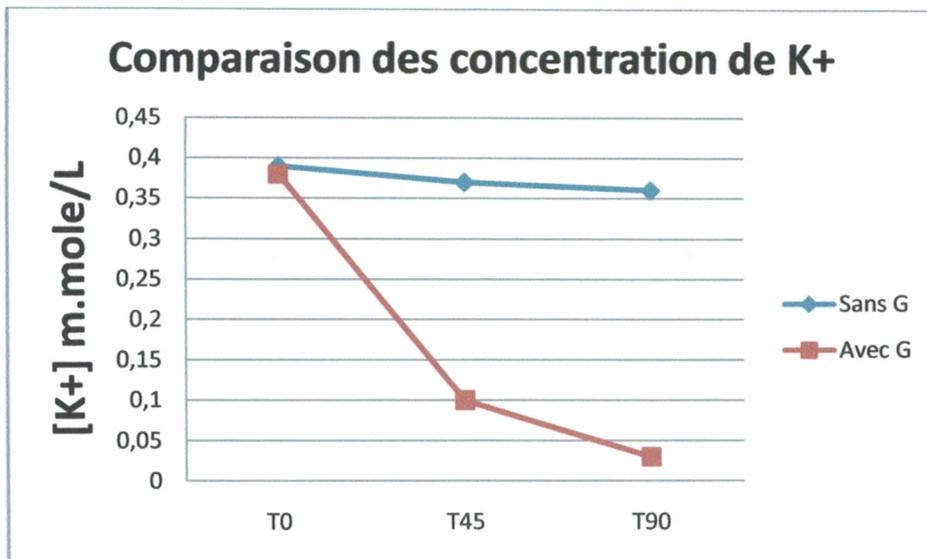


Figure 57 : Test 10 [K+]

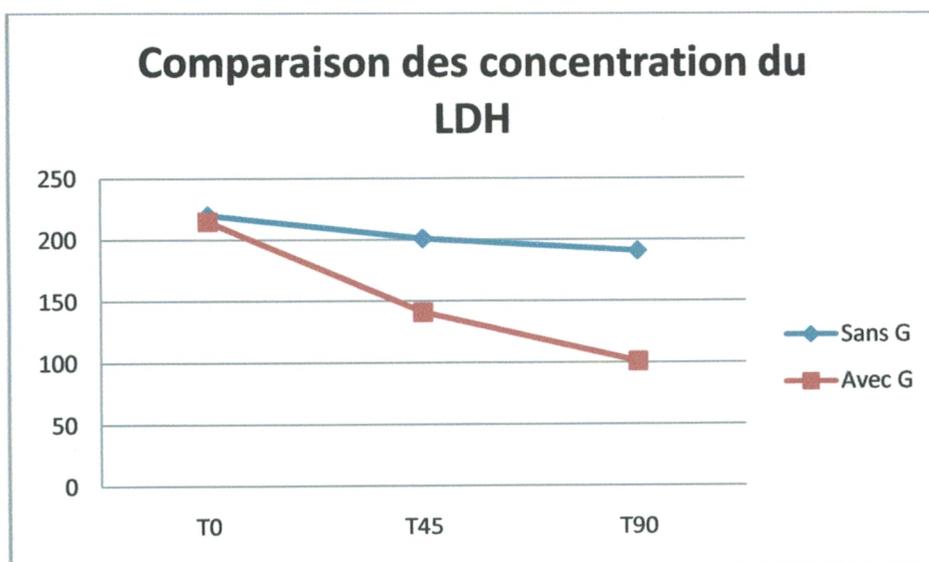


Figure 58 : Test 10 [LDH]

Test 11:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	87	87
GR.....Cell/l	$5.07 \cdot 10^{12}$	$5.02 \cdot 10^{12}$
HC.....%	44.45	44.3

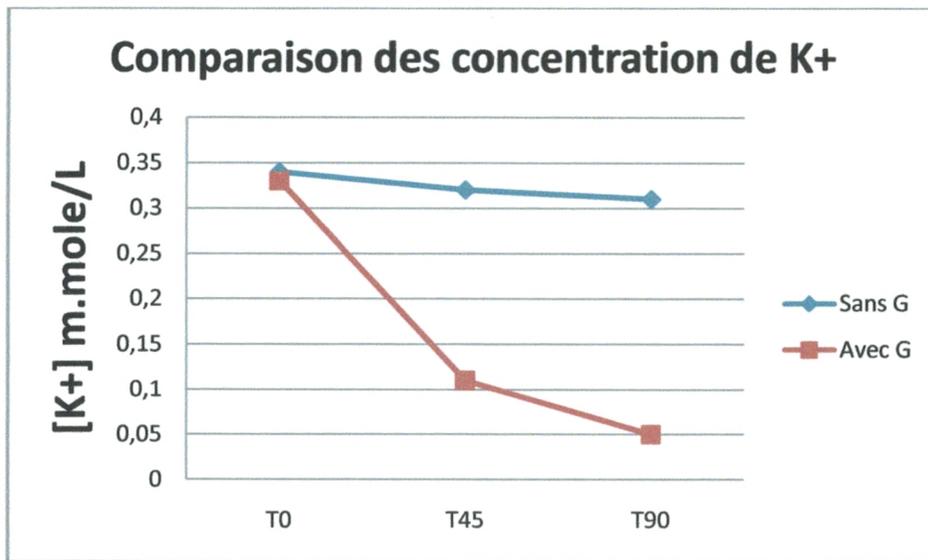


Figure 59 : Test 11 [K+]

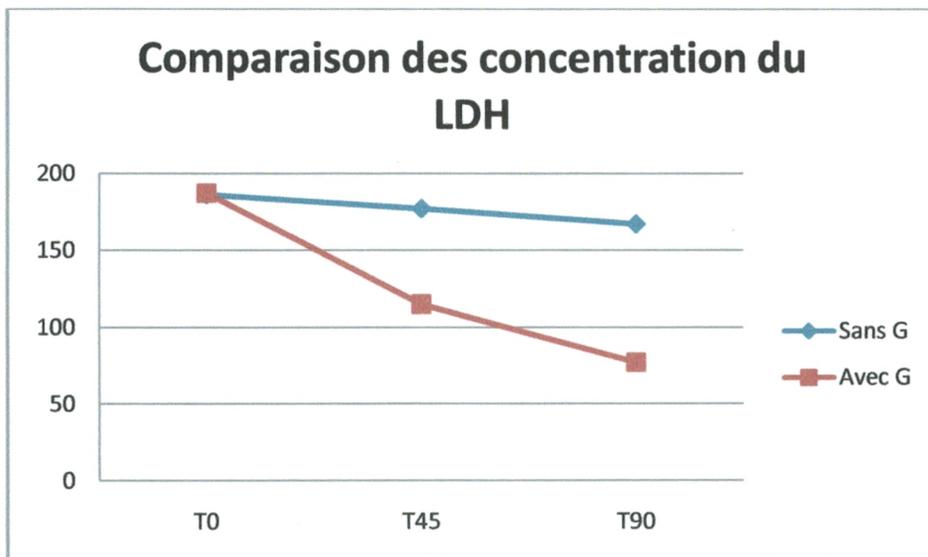


Figure 60 : Test 11 [LDH]

Test 12:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	82	80
GR.....Cell/l	$6.16 \cdot 10^{12}$	$6.06 \cdot 10^{12}$
HC.....%	51.67	51.56

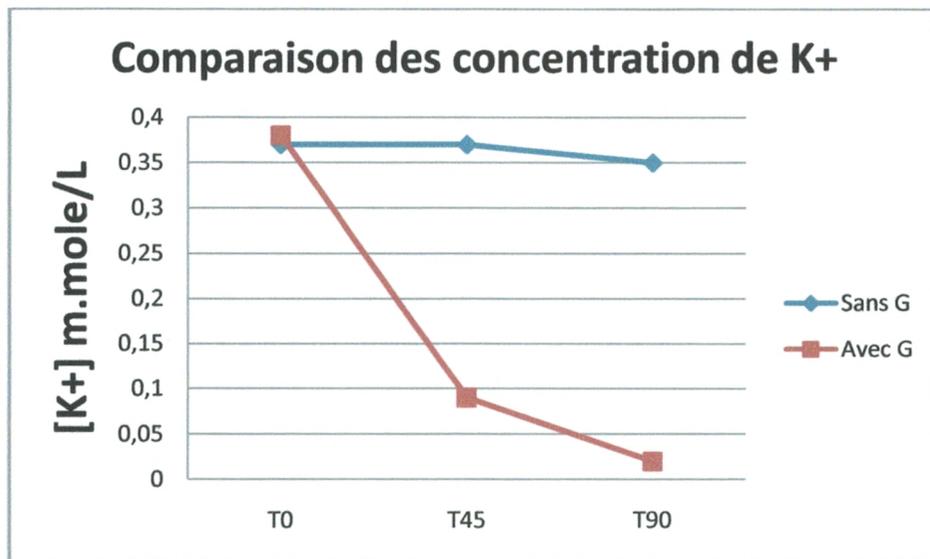


Figure 61 : Test 12 [K+]

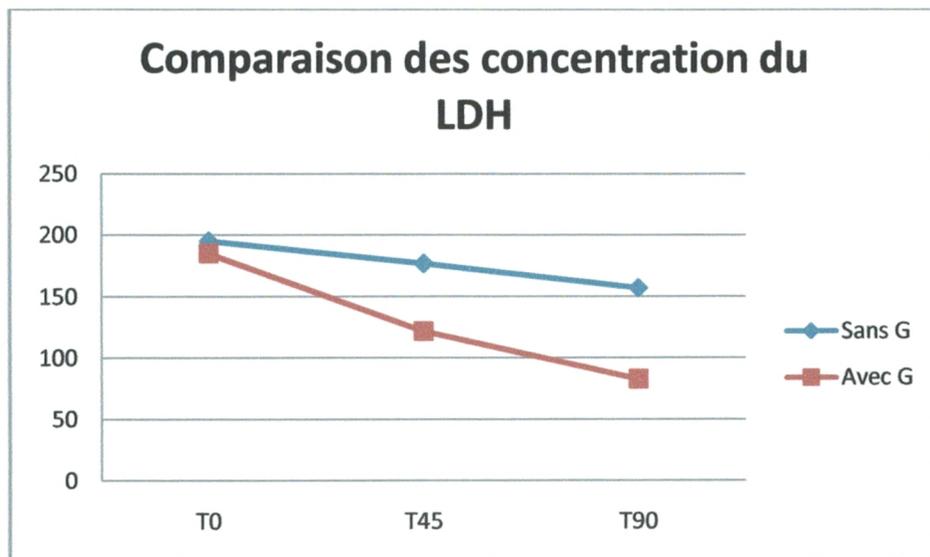


Figure 62 : Test 12 [LDH]

Test 13:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84	83
GR.....Cell/l	$6.33 \cdot 10^{12}$	$6.32 \cdot 10^{12}$
HC.....%	74.6	72.8

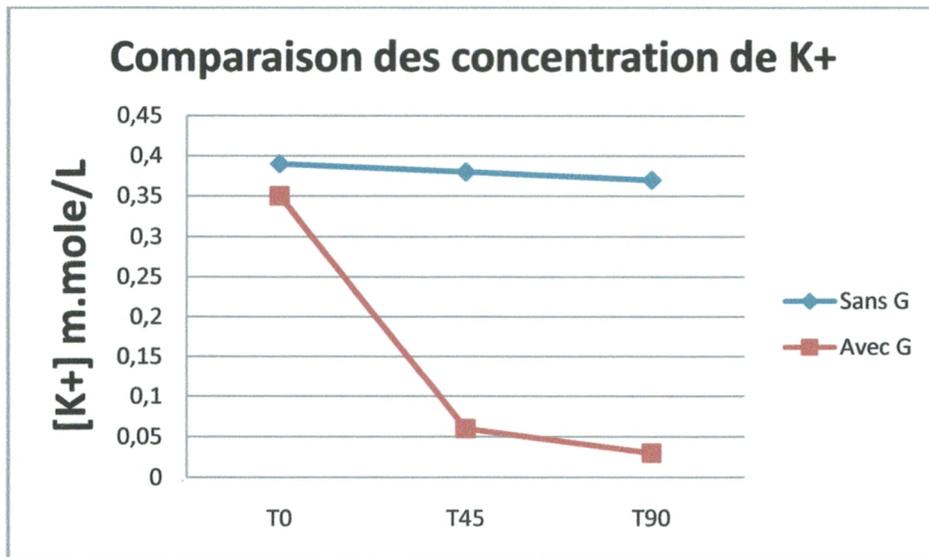


Figure 63 : Test 13 [K+]

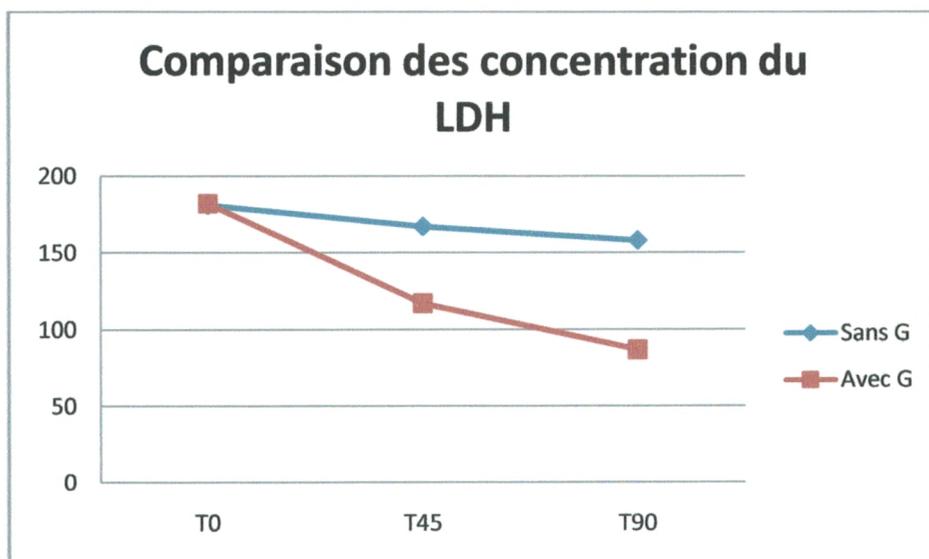


Figure 64 : Test 13 [LDH]

Test 14:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	87	87
GR.....Cell/l	$6.32 \cdot 10^{12}$	$6.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	52.98	51.6

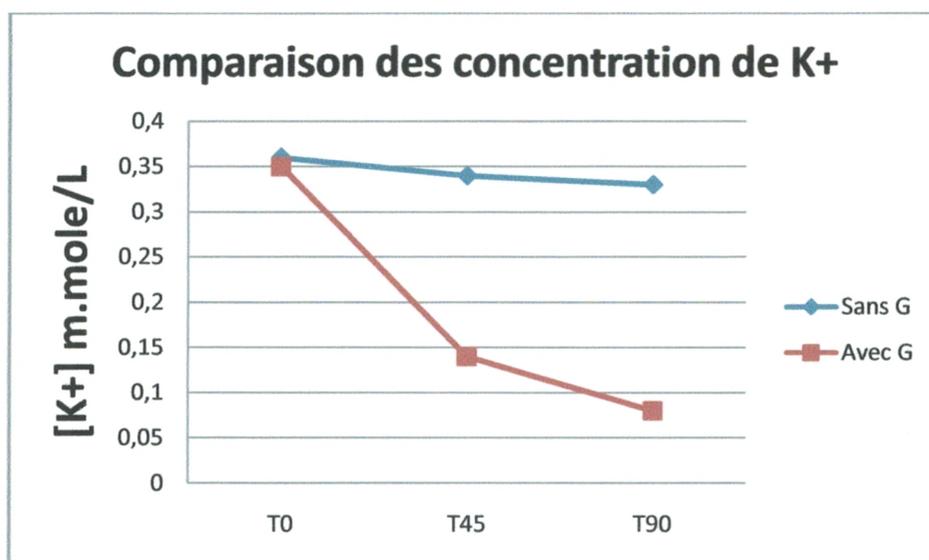


Figure 65 : Test 14 [K+]

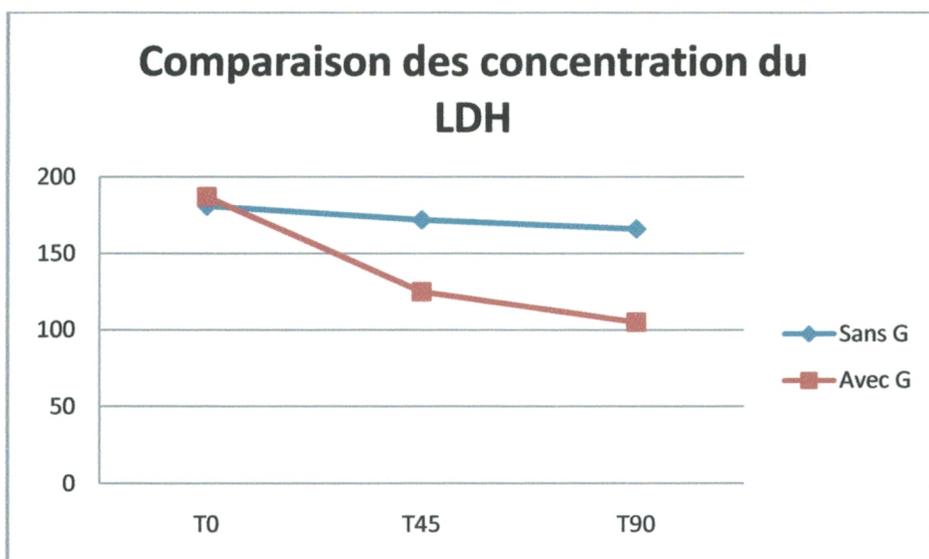


Figure 66 : Test 14 [LDH]

Test 15:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84.9	83
VGM.....fl	82	80
GR.....Cell/l	$5.22 \cdot 10^{12}$	$5.18 \cdot 10^{12}$

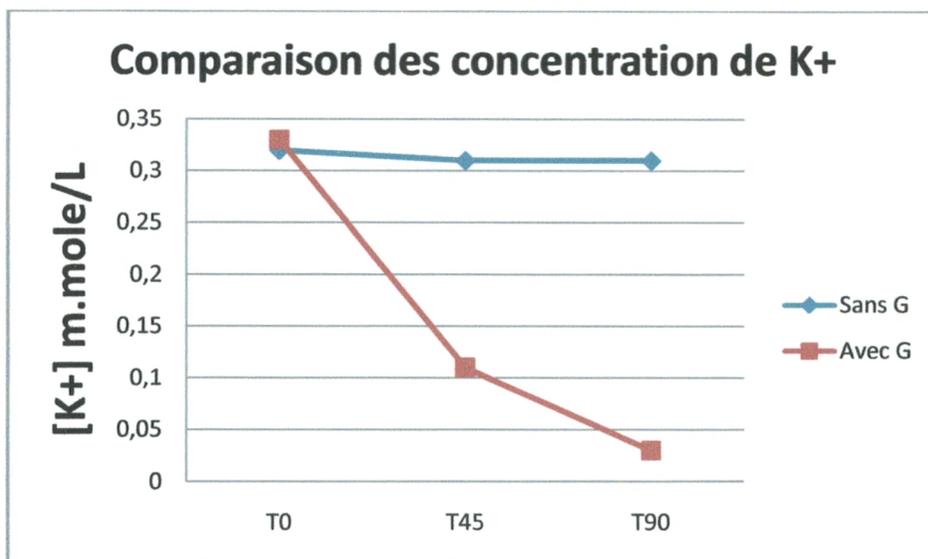


Figure 68 : Test 15 [K+]

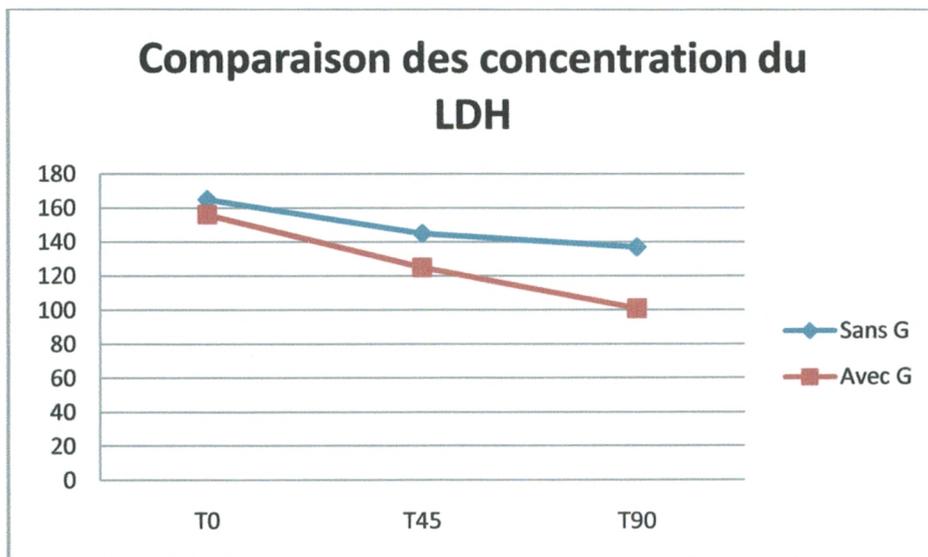


Figure 68 : Test 15 [LDH]

Test 16:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84.9	83
GR.....Cell/l	$5.32 \cdot 10^{12}$	$5.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	45.4	44.6

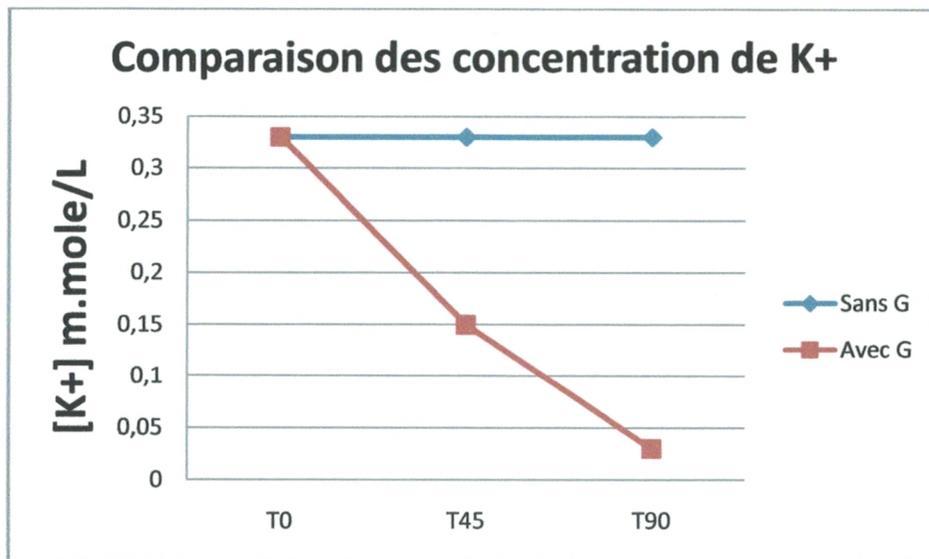


Figure 69 : Test 16 [K+]

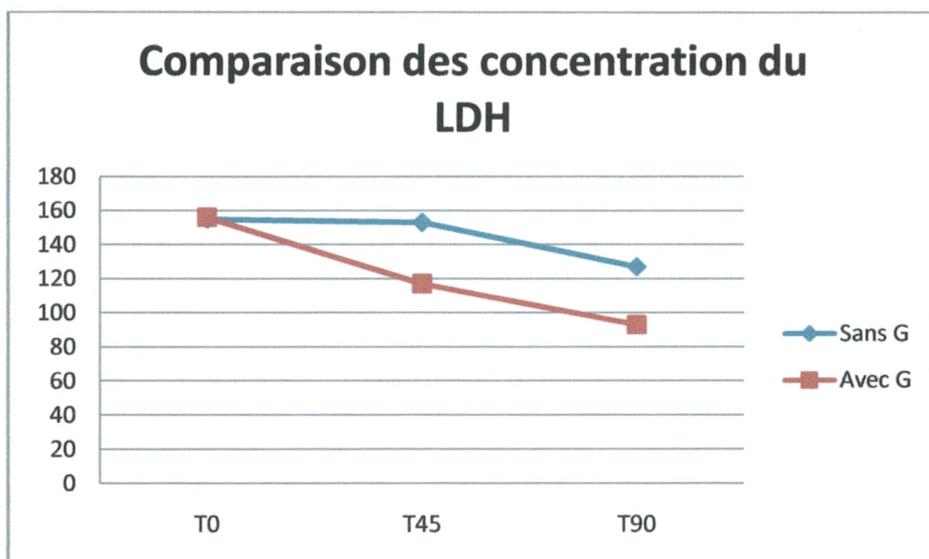


Figure 70 : Test 16 [LDH]

Test 17:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	81	80
GR.....Cell/l	$5.08 \cdot 10^{12}$	$5.00 \cdot 10^{12}$
HC.....%	51.67	51.6

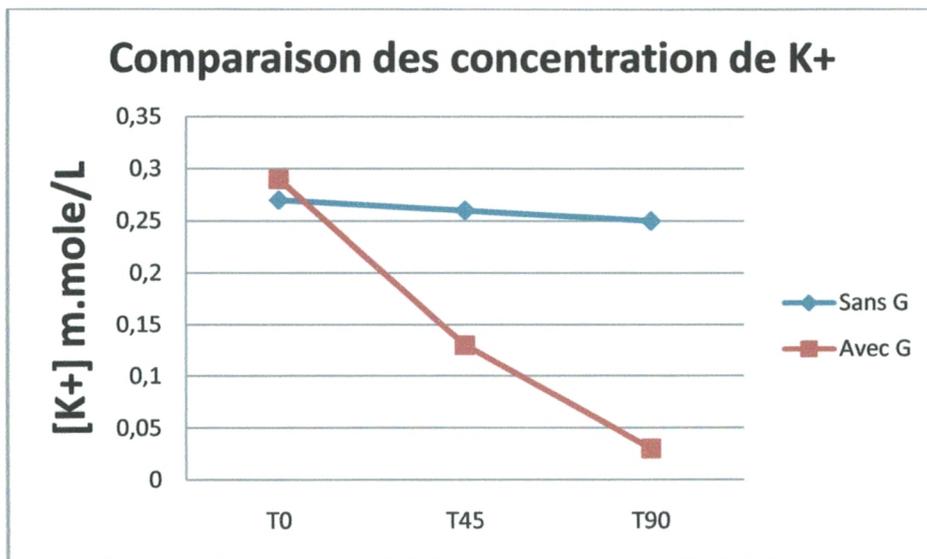


Figure 71 : Test 17 [K+]

Test 18:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	82	80
GR.....Cell/l	$6.33 \cdot 10^{12}$	$6.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	74.6	76.6

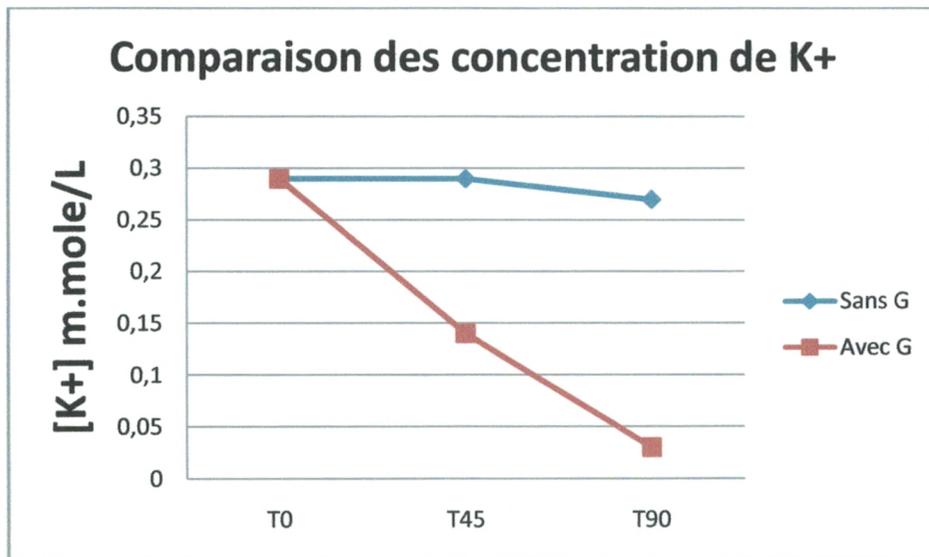


Figure 72 : Test 18 [K+]

Test 19:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	82	80
TGMH.....pg	27	26.3
CGMH.....g/dl	32.9	32.8

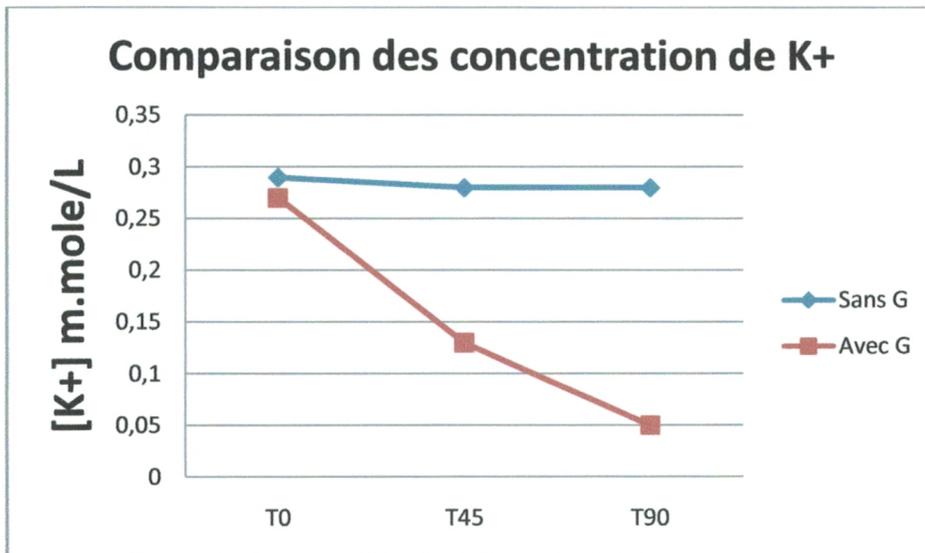


Figure 73 : Test 19 [K⁺]

Test 20:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	86	85
GR.....Cell/l	$5.33 \cdot 10^{12}$	$5.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	46.6	44.6

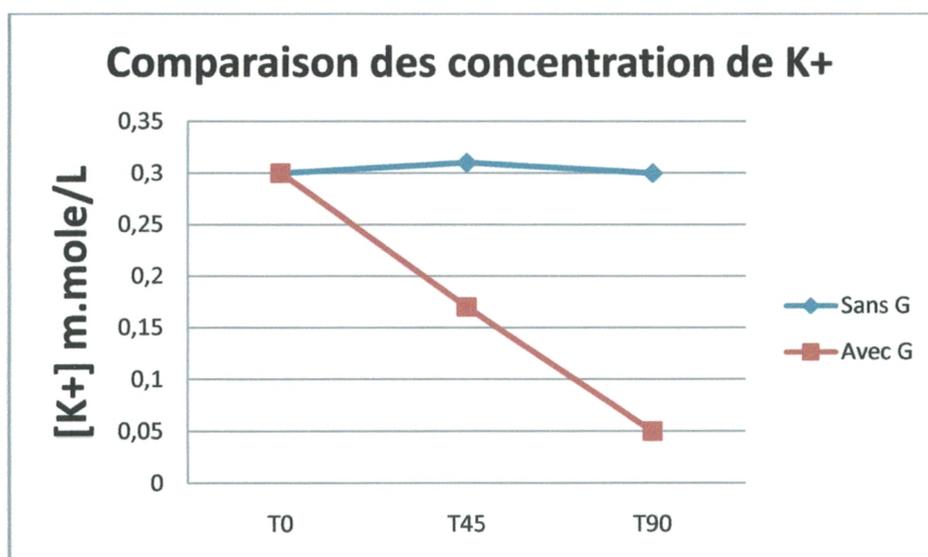


Figure 74 : Test 20 [K⁺]

Interprétation des graphes :

À T0 : On a remarqué que la concentration intracellulaire du potassium et du LDH n'a pas changé dans les deux suspensions cellulaires.

A T45 : On remarque qu'il y a une baisse de concentration des deux paramètres (K⁺, LDH) et qui est plus remarquable pour la suspension cellulaire qui contient la molécule.

Après 90 minutes, les concentrations ont encore diminué dans les deux suspensions cellulaires et beaucoup plus dans celle qui contient la molécule.

En doublant la dose, la diminution de la concentration en potassium et en LDH intracellulaire en fonction du temps est plus remarquable dans la suspension qui contient la molécule. Donc:

La sortie du potassium peut être due soit à l'inhibition de la pompe K⁺/Na⁺ ATPase, soit à une lyse de la membrane cellulaire soit les deux actions à la fois.

La diminution du taux du LDH peut être expliquée par une lyse de la membrane du globule rouge.

Pour la suspension sans G, la même explication que la précédente : la diminution de la concentration s'explique par l'hémolyse mécanique au cours de la manipulation et au cours de l'agitation mécanique.

2. Les protéines:

On a pratiqué 12 tests dont on a éliminé les tests erronés :

Test 01 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	88	87
GR.....Cell/l	$5.33 \cdot 10^{12}$	$5.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	46.6	44.6

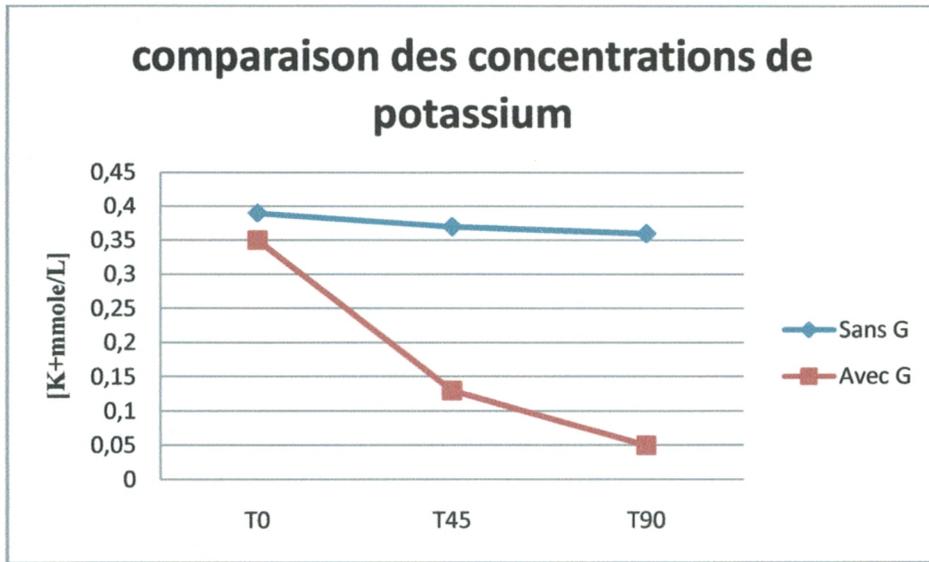


Figure 75 : Test 01 [K+]

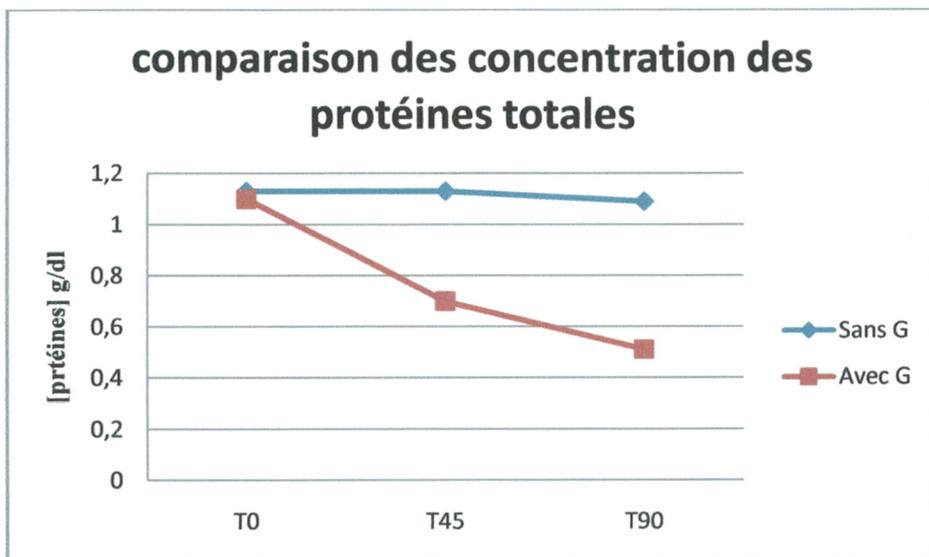


Figure 76 : Test 01 [Protéines]

Test 02 :

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	81	80
GR.....Cell/l	$6.33 \cdot 10^{12}$	$6.22 \cdot 10^{12}$
HC.....%	74.6	76.6

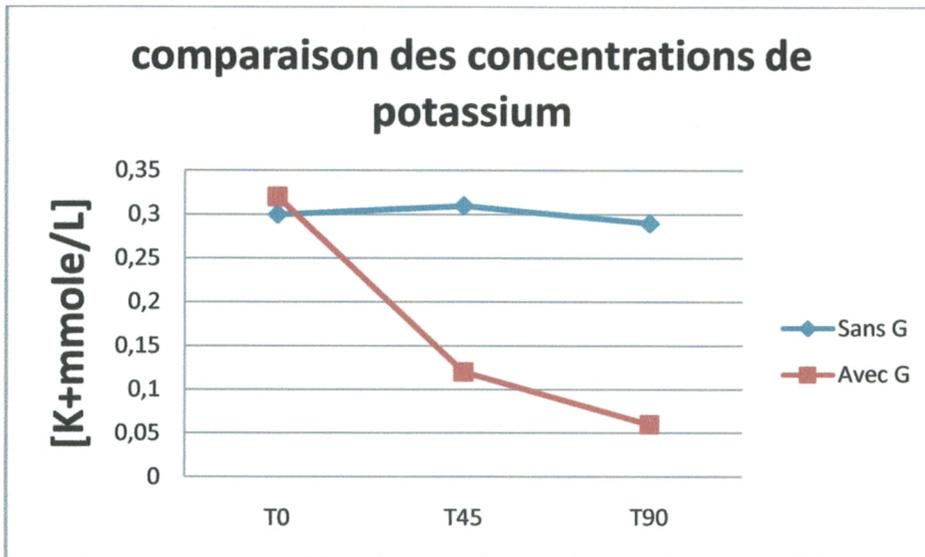


Figure 77 : Test 02 [K+]

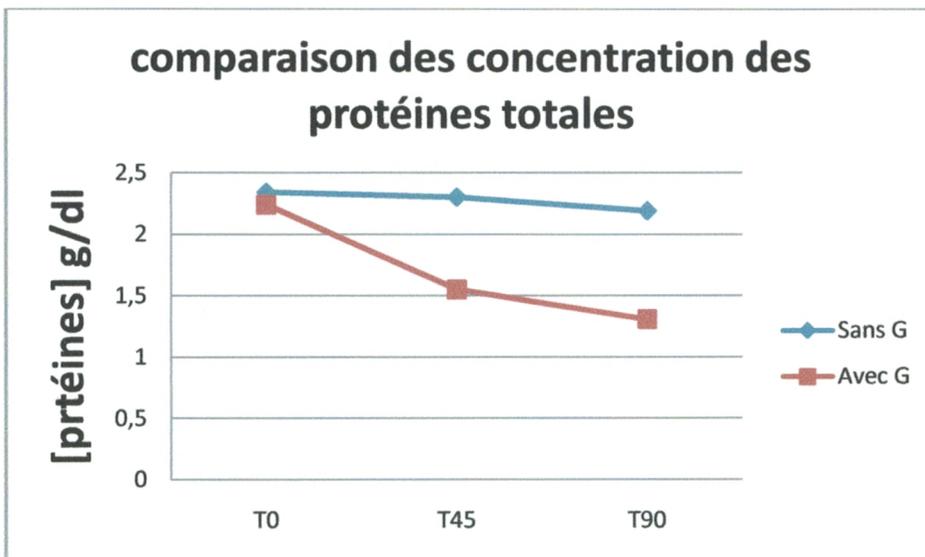


Figure 78 : Test 02 [Protéines]

Test 03:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	87	87
GR.....Cell/l	$6.33 \cdot 10^{12}$	$6.28 \cdot 10^{12}$
HC.....%	51.45	49.6

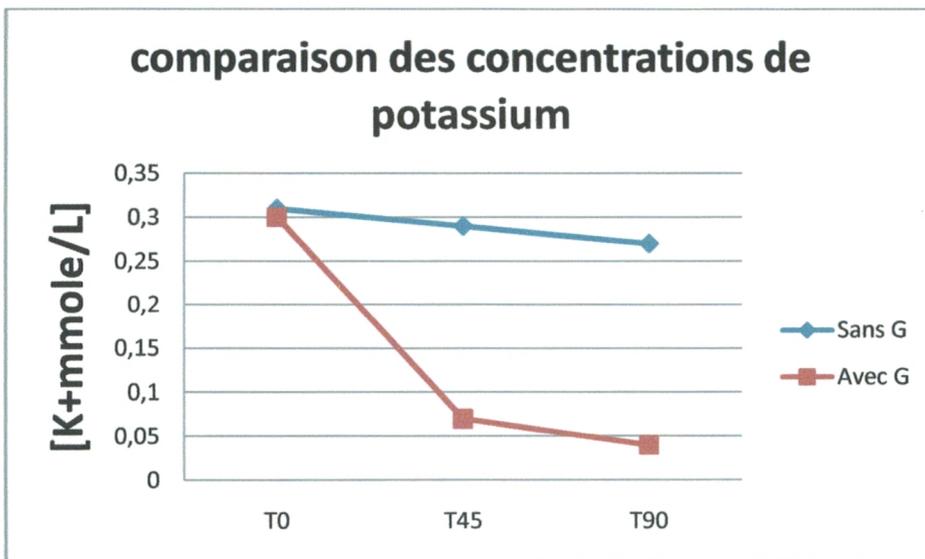


Figure 79 : Test 03 [K+]

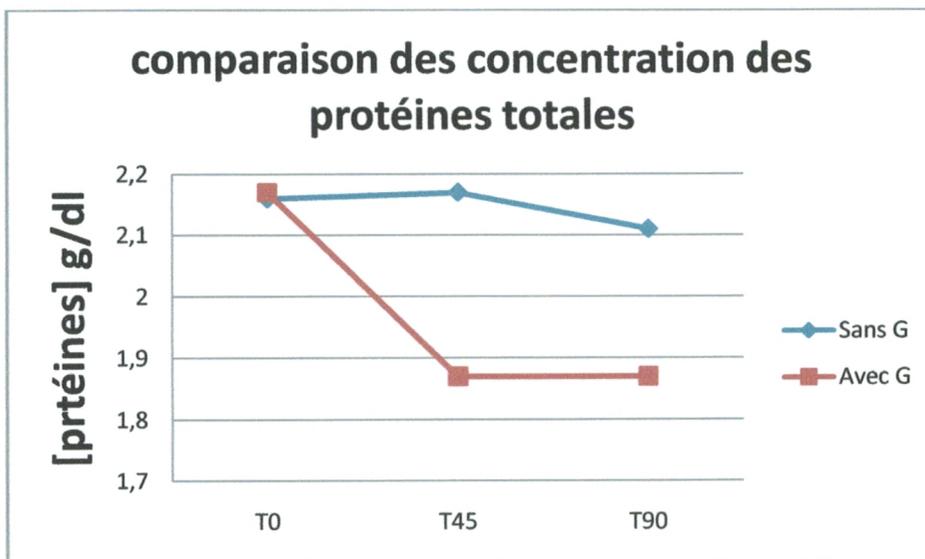


Figure 80 : Test 03 [Protéines]

Test 04:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84	83
GR.....Cell/l	$5.41 \cdot 10^{12}$	$5.35 \cdot 10^{12}$
HC.....%	45.6	43.6

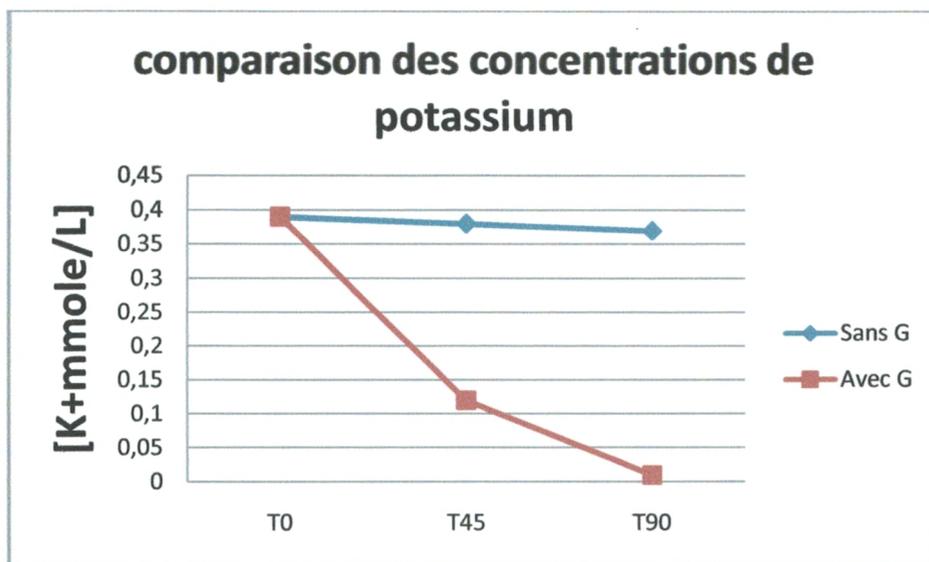


Figure 81 : Test 04 [K+]

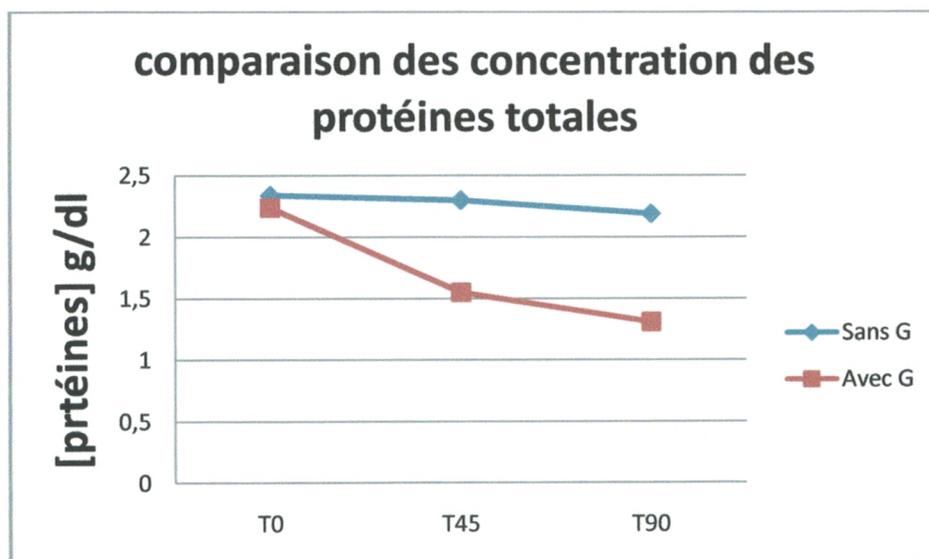


Figure 82 : Test 04 [Protéines]

Test 05:

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	87	87
GR.....Cell/l	$5.08 \cdot 10^{12}$	$5.01 \cdot 10^{12}$
HC.....%	43.6	40.6

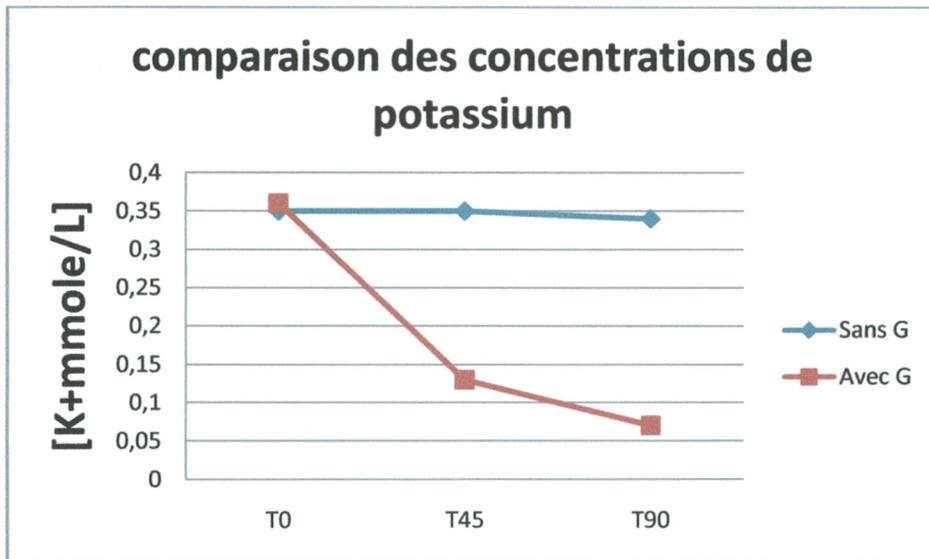


Figure 83 : Test 05 [K+]

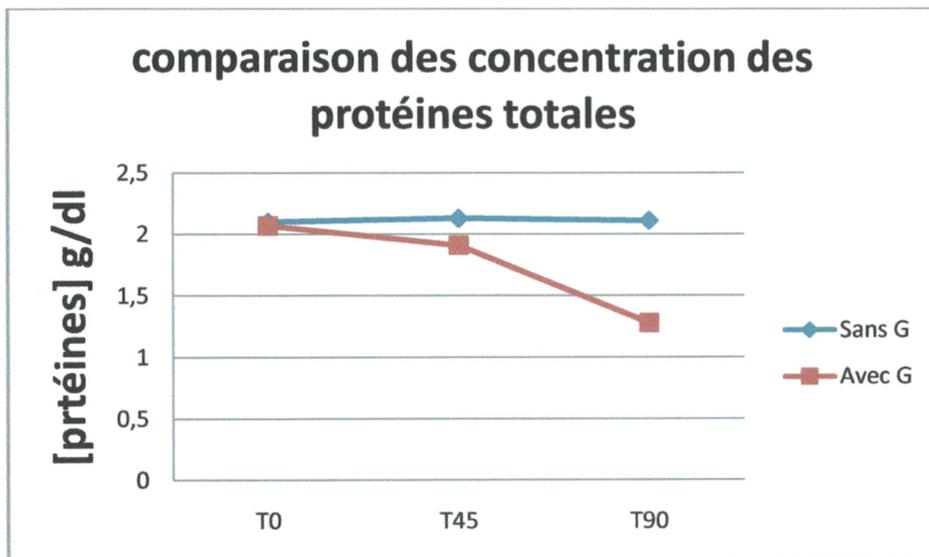


Figure 84 : Test 05 [Protéines]

Test 06:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84.9	83
GR.....Cell/l	$5.12 \cdot 10^{12}$	$5.02 \cdot 10^{12}$
HC.....%	74.6	73.6

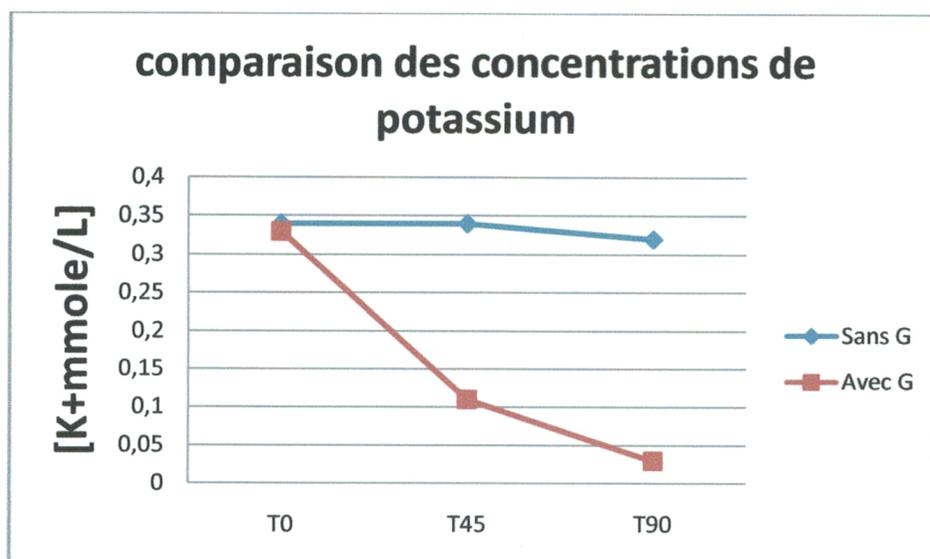


Figure 85 : Test 06 [K+]

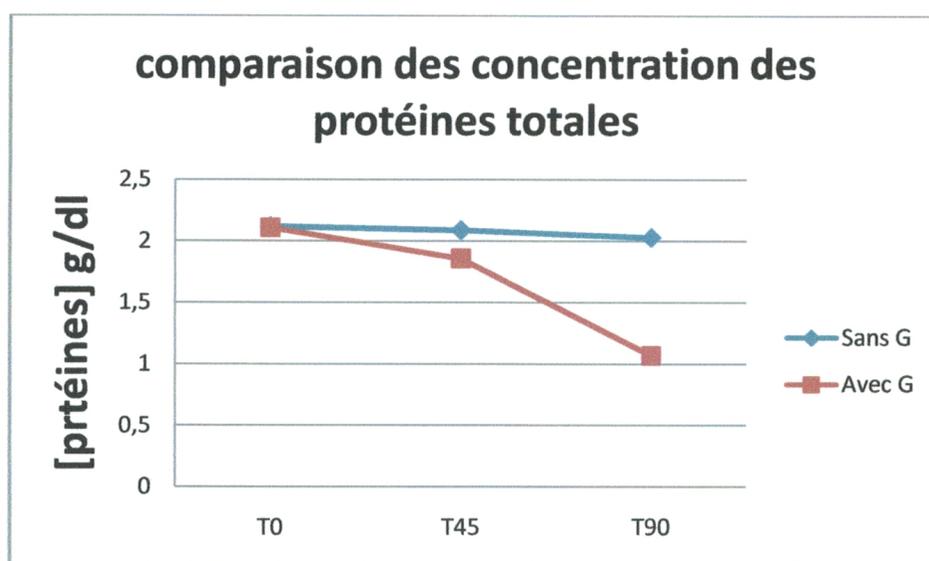


Figure 86 : Test 06 [Protéines]

Test 07:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	84	83
GR.....Cell/l	5.33 10 ¹²	5.22 10 ¹²
HC.....%	46.6	44.6

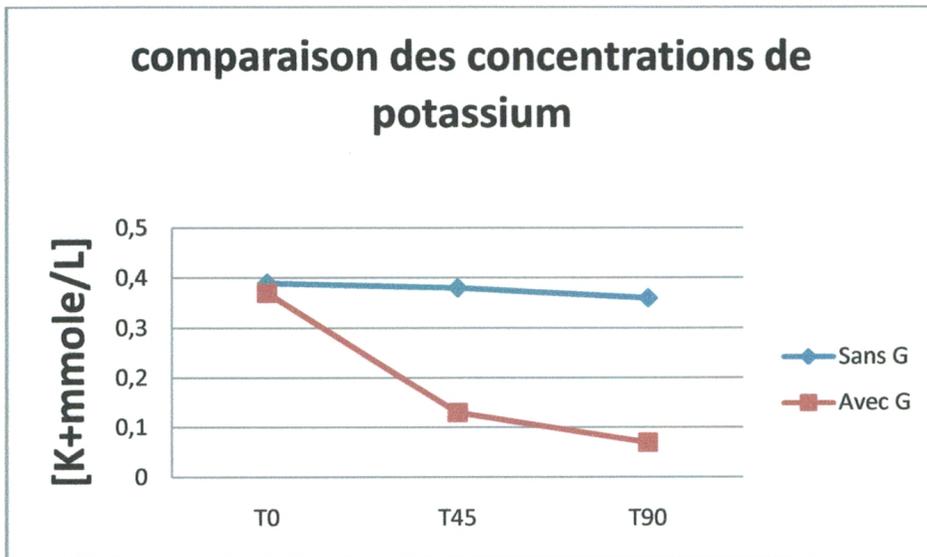


Figure 87 : Test 07 [K+]

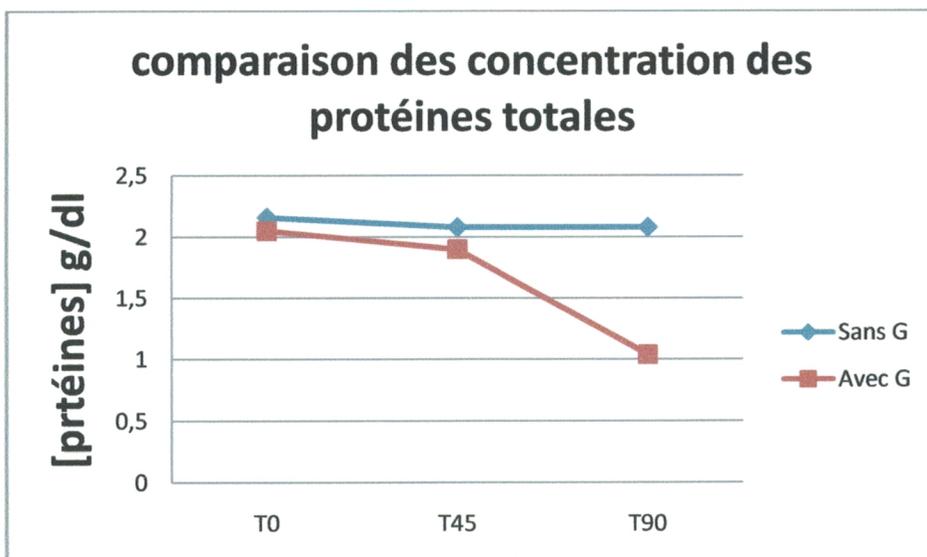


Figure 88 : Test 07 [Protéines]

Test 08:

FNS :

FNS	Taux avant lavage	Taux après lavage
VGM.....fl	87	87
GR.....Cell/l	$5.08 \cdot 10^{12}$	$5.01 \cdot 10^{12}$
HC.....%	43.6	40.6

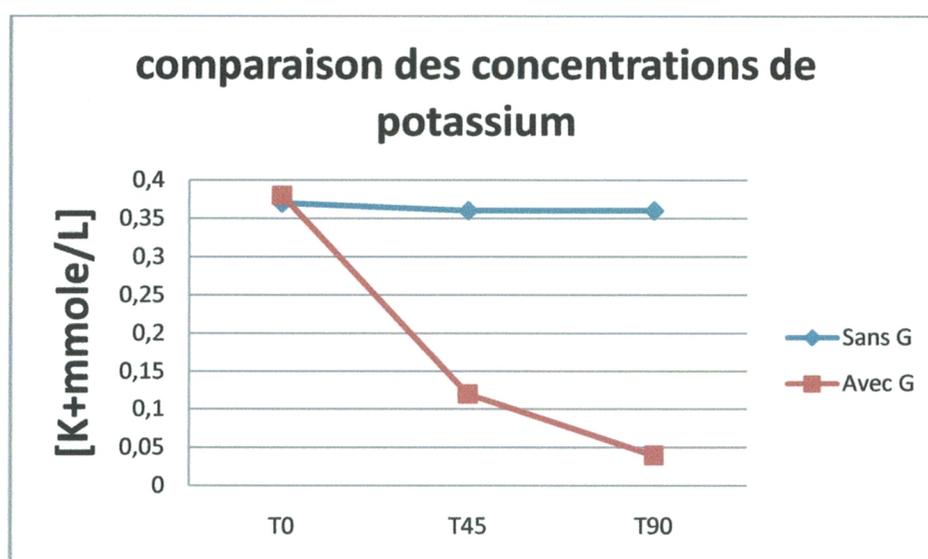


Figure 89 : Test 08 [K+]

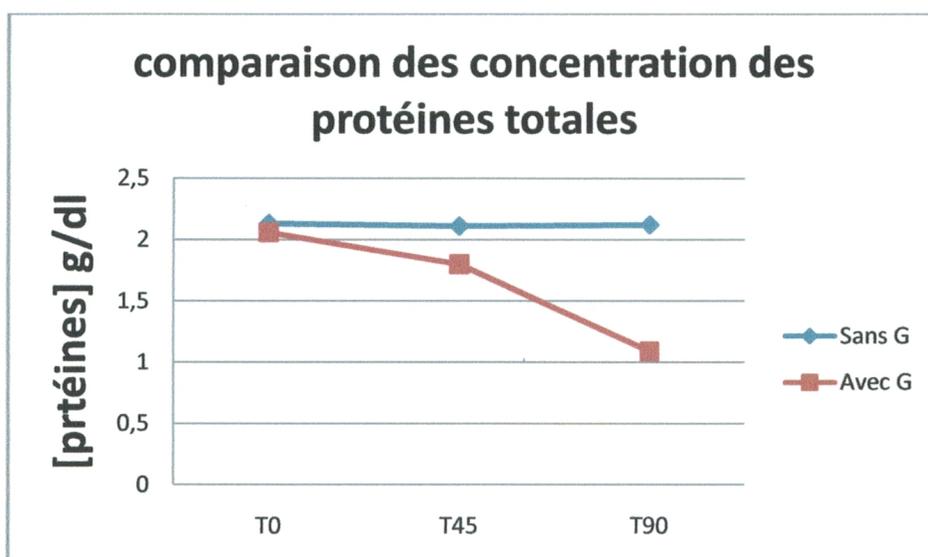


Figure 90 : Test 08 [Protéines]

$$\text{Le rapport} = \frac{[K^+]}{[\text{protéine}]} :$$

Test 01 :

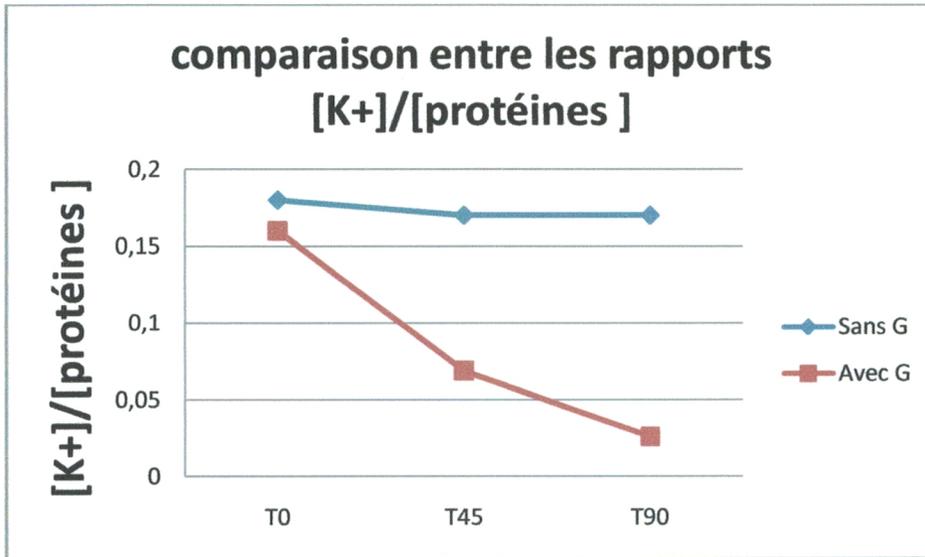


Figure 91 : Rapport 01

Test 02:

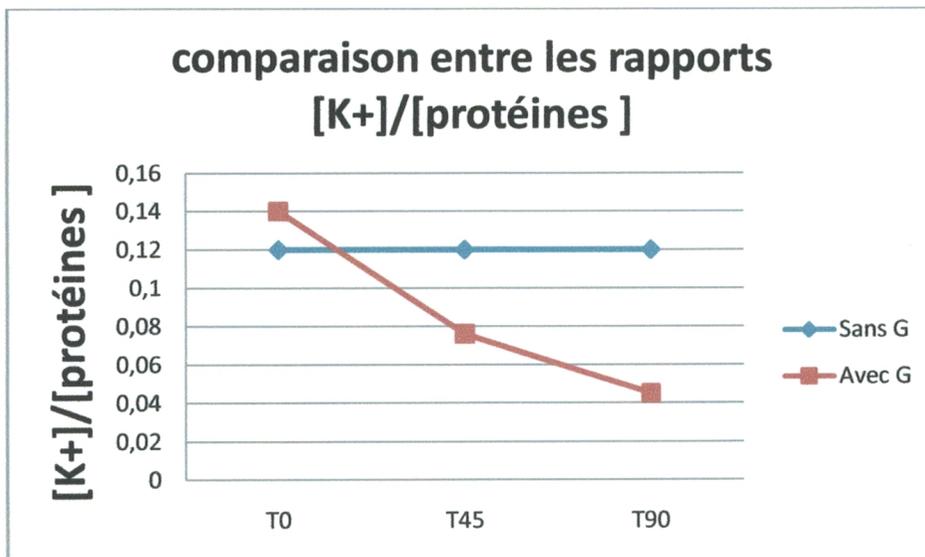


Figure 92 : Rapport 02

Test 03:

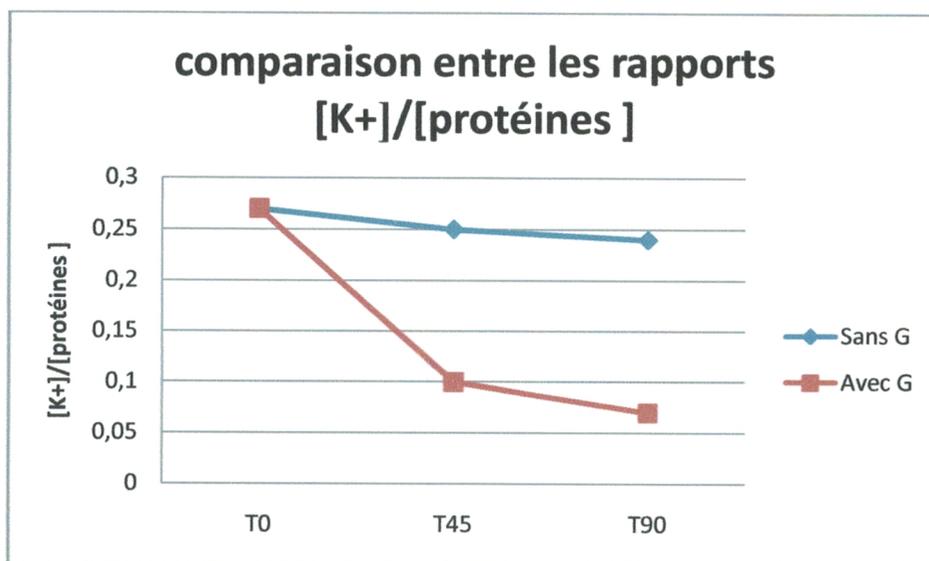


Figure 93 : Rapport 03

Test 04:

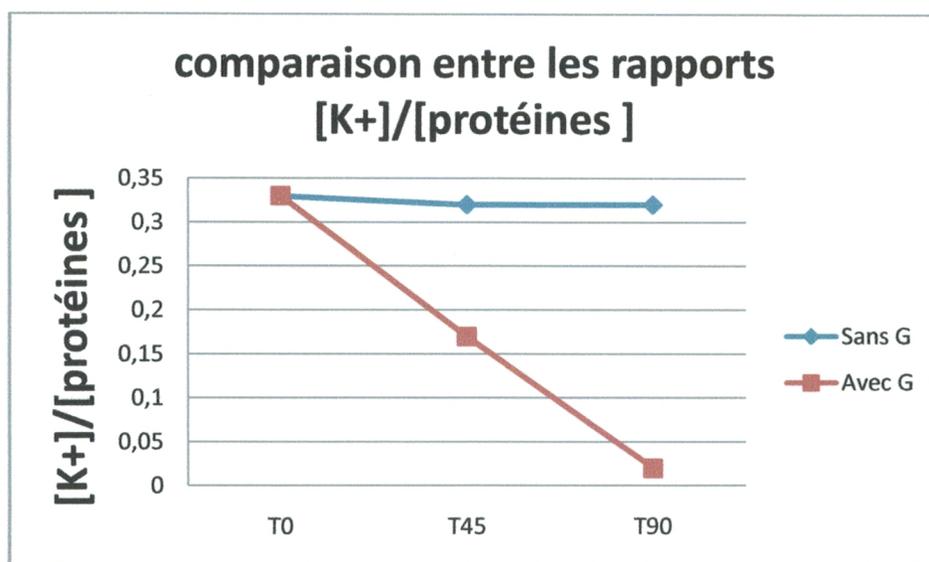


Figure 94 : Rapport 04

Test 05:

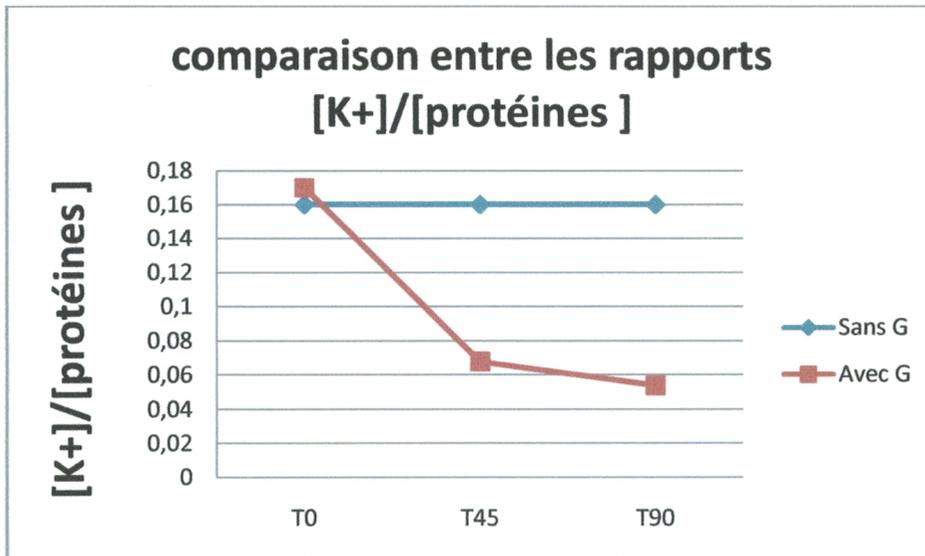


Figure 95 : Rapport 05

Test 06:

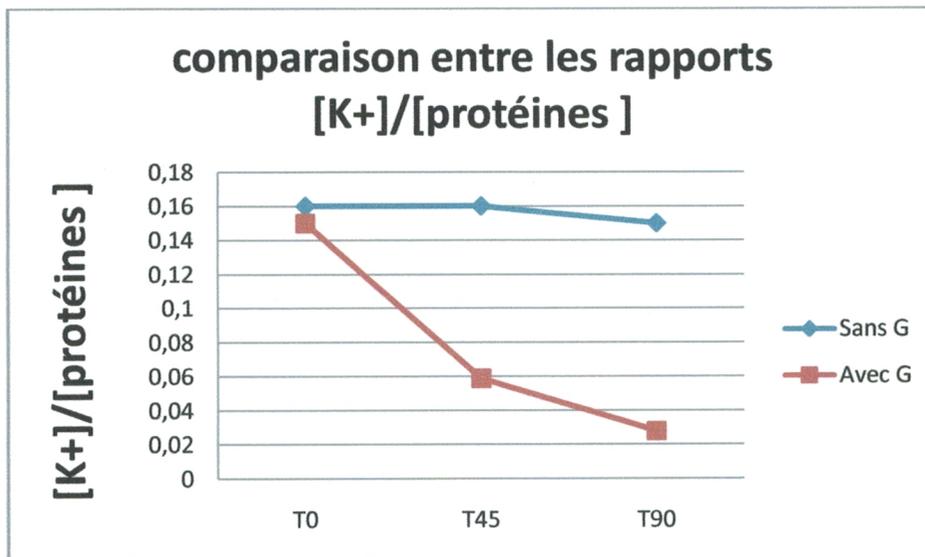


Figure 96 : Rapport 06

Test 07:

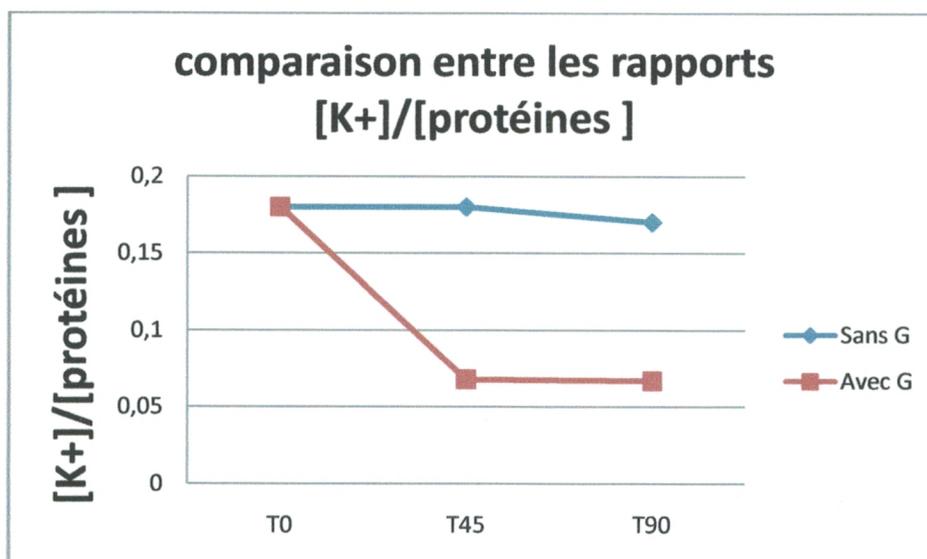


Figure 97 : Rapport 07

Test 08:

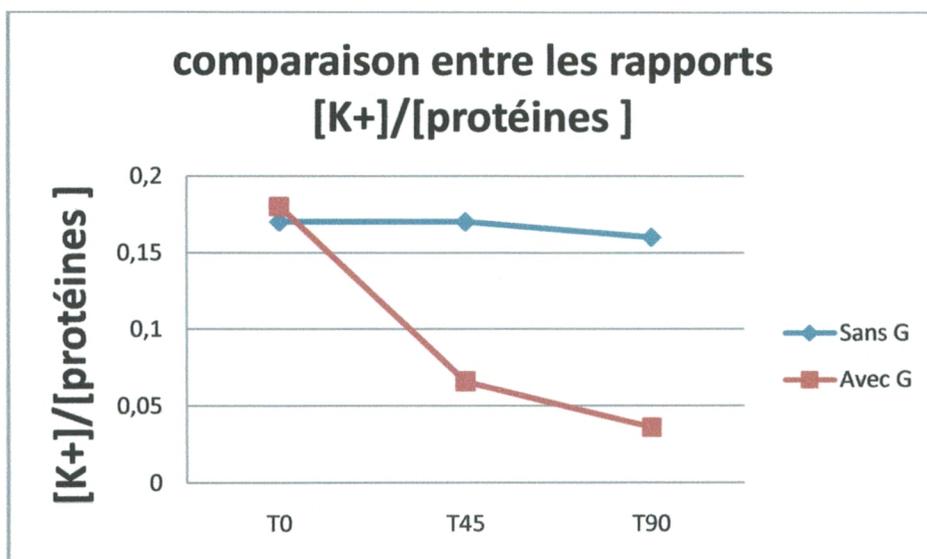


Figure 98 : Rapport 08

Interprétation:

On a remarqué que même pour les protéines cellulaires la concentration diminue au cours du temps, cette baisse du taux de protéines cellulaires est toujours plus nette pour la suspension cellulaire qui contient la molécule.

Cette diminution du taux des protéines cellulaires au cours du temps s'explique par la lyse membranaire d'érythrocyte ce qui a favorisé la sortie des protéines.

Pour renforcer les résultats, on a calculé le rapport $[K^+]/[Protéines]$.

Donc d'après ces résultats, on constate qu'il y avait une lyse de la membrane cellulaire.(la perte en protéines cellulaire en même temps que la diminution en concentration du potassium intracellulaire)

3. Hémoglobine:

On a pratiqué 4 tests dont les résultats sont démontrés des les graphes suivants :

Calcul du taux d'hémoglobine dans 1 ml de suspension cellulaire :

Echantillon 1 : [Hg]= 0.29 g/dl

Echantillon 2 : [Hg]= 0.26 g/dl

Les résultats des tests en fonction du temps :

Test 01 :

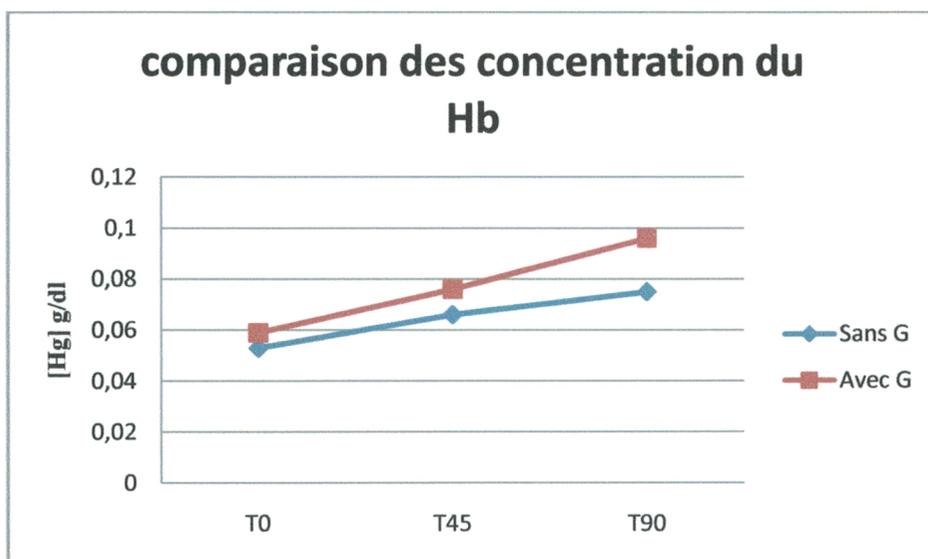


Figure 91 : Test 01 [Hb]

Test 02 :

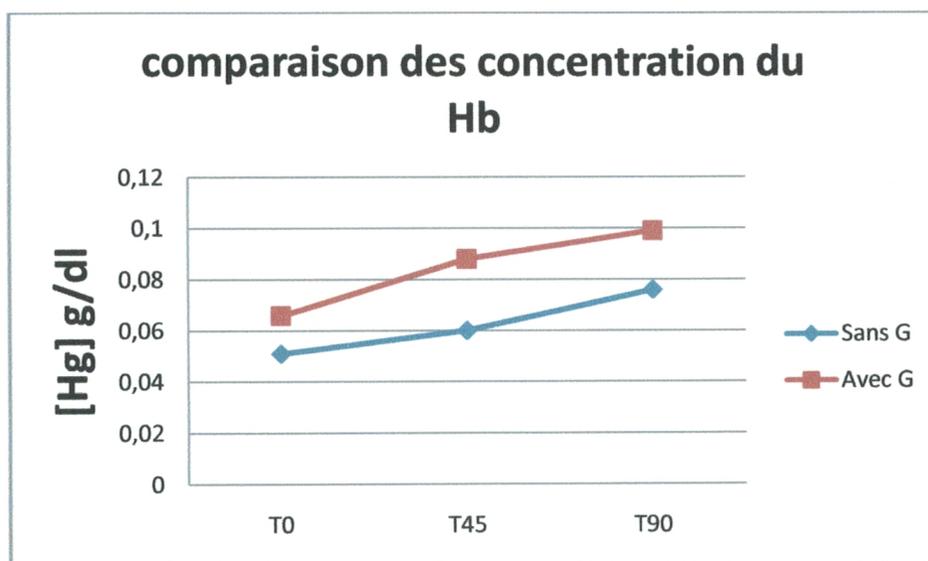


Figure 92 : Test 02 [Hb]

Test 03 :

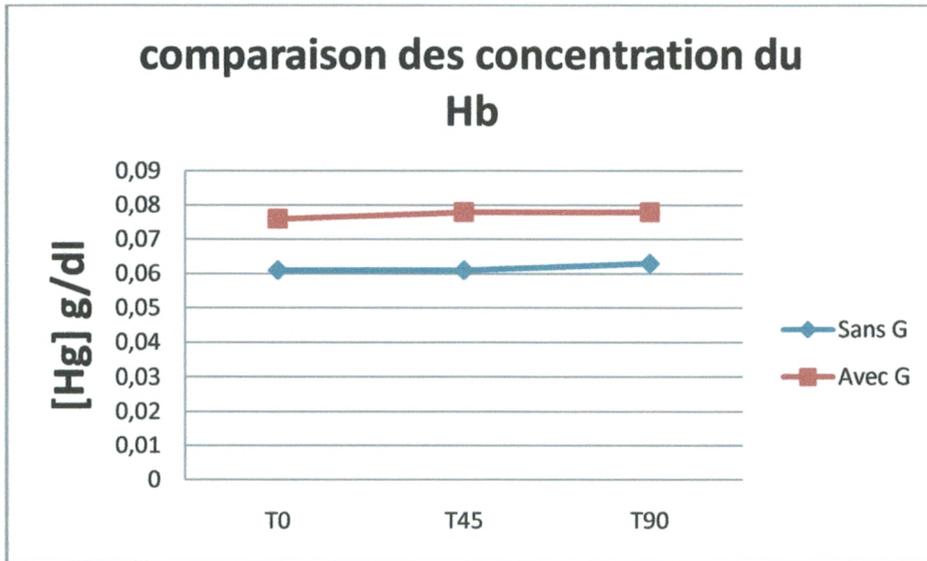


Figure 93 : Test 03 [Hb]

Test 04 :

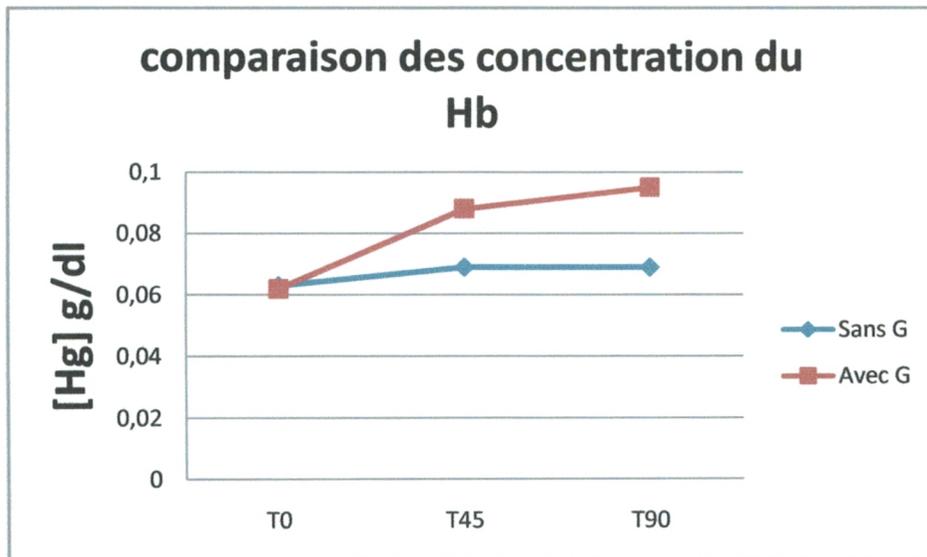


Figure 94 : Test 04 [Hb]

Calcule du pourcentage d'hémolyse :

0.275 g/dl \longrightarrow 100% Hb

[Hg] test1 \longrightarrow X %

Tableau VIII : pourcentages d'hémolyse des tests:

test	% d'hémolyse témoin à 45 min	% d'hémolyse suspension + G à 45 min	% d'hémolyse témoin à 90 min	% d'hémolyse suspension + G à 90 min
01	22	27	27	34
02	21	31	25	35
03	21	28	21	36
04	24	31	21	35

Interprétation :

A T0 on a remarqué que la concentration d'hémoglobine extracellulaire n'a pas changé dans les deux suspensions avec et sans G.

A T45 on a remarqué que la concentration d'hémoglobine extracellulaire a augmenté par rapport à T0, cette augmentation est plus remarquable pour la suspension qui contient la molécule.

A T90, les concentrations ont beaucoup plus augmenté pour la suspension cellulaire qui contient la molécule.

Cette augmentation de la concentration d'hémoglobine extracellulaire au cours du temps peut être expliquée par une lyse au niveau de la membrane du globule rouge.

On a calculé le pourcentage d'hémolyse en fonction du temps pour montrer est-que cette hémolyse est totale ou partielle.

D'après les résultats, on remarque que le taux d'hémolyse dans les suspensions cellulaires qui contient la molécule est plus augmenté par rapport à la suspension cellulaire témoin, après 45 minutes le taux moyen d'hémolyse été 30%, et il a continué d'augmenter après 90 minutes (35% des cellules sont hémolysées)

V. DISCUSSION :

Potassium :

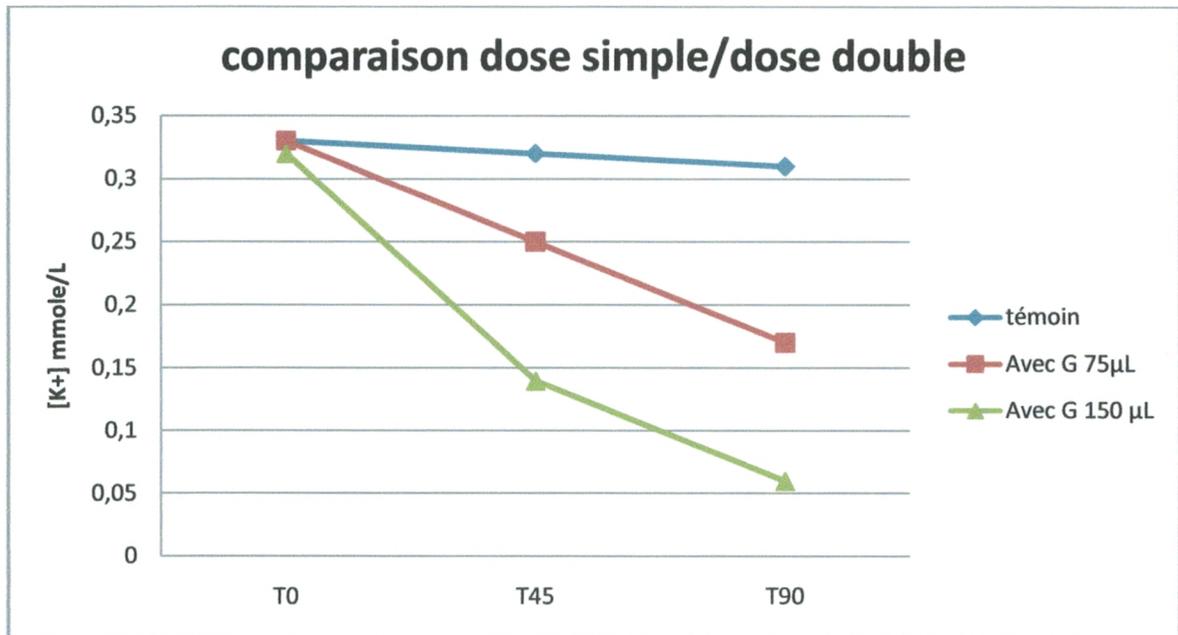


Figure 95 : comparaison 1^{ère} dose/2eme dose

LDH :

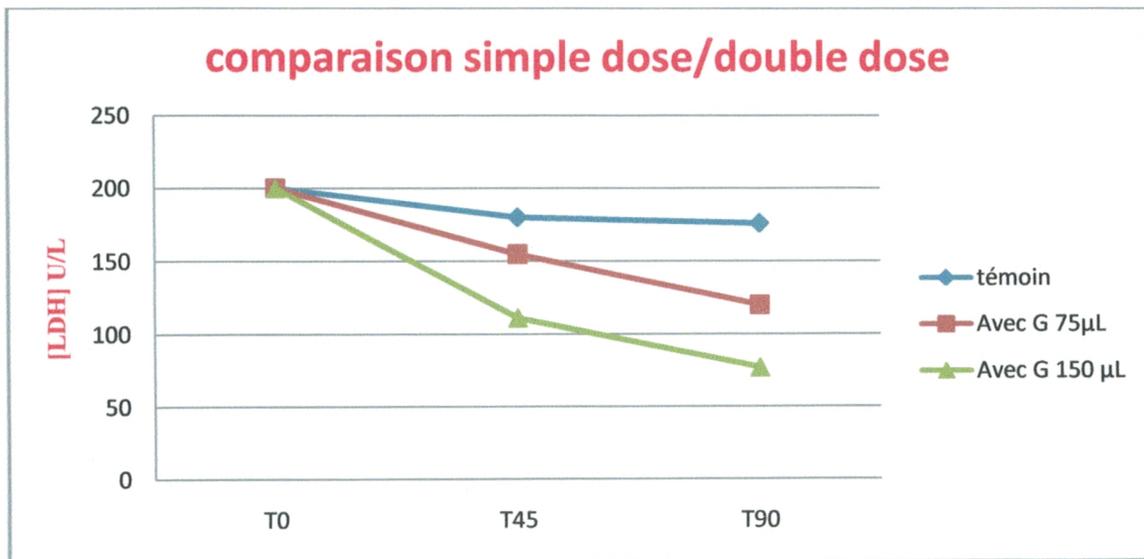


Figure 96 : comparaison 1^{ère} dose/2eme dose

La comparaison entre la première dose (75µl) et la deuxième dose (double dose 150µl) nous a montré qu'il y a une grande différence pour la concentration intracellulaire en K^+ et LDH.

Au moment d'administration de la molécule, la concentration intracellulaire en potassium et en LDH était presque la même pour les deux suspensions cellulaires (témoin et avec la molécule) et pour les deux doses (75 et 150 µl). Alors on constate que le Glucantime n'a pas une action directe dès son contact avec la suspension cellulaire.

A T45 et à T 90, la diminution de la concentration intracellulaire en potassium et en LDH est presque 2 fois plus pour la double dose par rapport à la première dose.

Donc en doublant la dose la toxicité de la molécule augmente, on peut dire que la toxicité est proportionnelle à la dose.

D'après les résultats trouvés on peut dire que le Glucantime a un effet toxique sur le globule rouge :

✓ Soit en agissant sur la pompe Na^+/K^+ ATPase, en inhibant la synthèse d'ATP. Pas d'énergie donc la pompe ne fonctionne plus. le potassium intracellulaire va sortir par diffusion suivit par l'entrée du sodium et de l'eau à travers les pores ioniques
Par conséquent l'entrée progressive du sodium et H^+ provoque une turgescence, puis une lyse de la membrane érythrocytaire et la perte du contenu cellulaire.

✓ Soit en agissant directement sur la membrane provoquant une lyse de celle-ci.

✓ Soit les deux (la pompe et la lyse).

L'hémolyse n'était pas total puisque le taux d'hémolyse moyen est de 34% c-à-d que le Glucantime après presque 1h :30 de son contact avec la suspension cellulaire va détruire presque 34% de la population érythrocytaire.

CONCLUSION

La leishmaniose cutanée constitue la 24^{ème} maladie à déclaration obligatoire dans les années.

D'après notre étude faite sur plus de 55 tests *in vitro* réalisés sur plus de 60 prélèvements, montre que le Glucantime® est à l'origine de réels problèmes hémolytiques, cette hémolyse était remarquable surtout en doublant la dose par la diminution des concentrations intracellulaires des différents paramètres (K⁺, LDH, protéines, Hg).

Malgré les effets toxiques de la molécule, le Glucantime® reste le traitement de choix et conserve une place essentielle dans la majorité des régions endémiques pour les leishmanioses (Algérie, Tunisie, Maroc). Mais La toxicité hémolytique sévère de cette molécule fait discuter son indication thérapeutique de première intention dans le traitement de la leishmaniose en Algérie. Les imidazoles méritent d'être reconsidérés dans notre protocole thérapeutique national.

Vue la toxicité du Glucantime l'OMS a abandonné l'utilisation des antimoniés en première intention dans certains pays (USA) à la faveur d'autre molécule comme l'amphotéricine B,

Toute fois nos résultats ne peuvent être comparés avec ceux des autres études, en raison des conditions expérimentales différents : différents matériels, méthodes, et population étudié, en effet, ce qui fait de cette étude une initiation dans la recherche pour l'évaluation *in vitro* des autres effets toxiques de la molécule.

Pour enrichir notre étude on pouvait compléter ce travail par l'étude des autres paramètres : le dosage du lactate et pyruvate pour voir si la molécule effectivement inhibe la glycolyse anaérobie et à quelle niveau.

Il est recommandé alors de servir de cette étude comme une ébauche de travail, d'élargir les prochaines recherches : sur le la leishmanie et sur les malades atteints de leishmaniose en espérant de trouver une dose moins toxique toute en gardant la sensibilité de la molécule.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIES

- [1]. Dedet J.P. Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. *Encycl. Med. Chir., Maladies infectieuses*, 8-506-A-10, 2001, 11 p.
- [2]. Professeur, Unité de Parasitologie, École Nationale Vétérinaire de Lyon, B.P. 83, 1, avenue Bourgelat, F-69280 Marcy l'Étoile.
- [3]. Pralong F, Lambert M, Bastien P, Dedet JP. Leishmanioses et immunodépression : aspects biochimiques actuels. *Rev Fr Lab* 1997;291:161-8. Schnur LF, Arivah Z. Leishmania excreted factor (E.F) serotypes in Sudan, Kenya and Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol* 1977;71(3):273-94. Dumon H, Piarroux R.
- [4]. Guerrini F. Génétique des populations et phylogénie des Leishmania du Nouveau Monde. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat en sciences biologiques, 1993. Belazzoug S. The sandflies of Algeria. *Parasitology* 1991;33(suppl.1):85-7.
- [5]. Belazzoug S, Bendali-Braham S, Lakhal Z, Abdennebi H. Hémagglutination indirecte dans le sérodiagnostic de la Leishmaniose viscérale, comparaison avec l'immunofluorescence indirecte. *Arch Inst Pasteur Alger* 1986;55:107
- [6]. [Bañuls, A. L., Hide, M., Prugnolle, F., 2007. Leishmania and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology* 64: 2-109.]
- [7]. Laboratoire de parasitologie-mycologie Centre hospitalier universitaire Mustapha : houria.zait article reçu le 22 octobre 2008, accepté le 7 mars 2009.
- [8]. Arias, J. R., Monteiro, P. S. , Zicker, F., 1996. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 2 (2): 145-146.
- [9]. Belkaid M, Harrat Z. La leishmaniose en Algérie. Mise au point. *Rev Med Phar* 1997:43-6.
- [10]. Bañuls, A. L., Hide, M., Prugnolle, F., 2007. Leishmania and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology* 64: 2-109.
- [11]. Mishra, B. B., Kale, R. R. , Singh, R. K. , Tiwari, V. K., 2009. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* 80 (2): 81-90.
- [12]. Vidal 2011
- [13]. Masamori E, Benitez A, Lim P. Assay of sodium stibogluconate (Pentostam). Report no. 552; contract no. DAMD17-85-C-5141. Washington, D.C: United States Army Medical Research and Development Command, Office of the Surgeon General; 1986.]
- [14]. [Médecine et maladies infectieuses 2005 ; 35 : 42-5].
- [15]. Service dermatologie CHU Tlemcen
- [16]. [C. RAPP, F. SIMON, M- L. DORDAIN (C. R., F. S. , Assistants du SSA ; M-L.D., Spécialiste du SSA) : *Médecine Tropicale* • 2000 • 60 • 4 • 343].
- [17]. [Sierra Romero GA, Flores EMM, Noronha EF. High frequency of skin reaction in patients with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate contaminated with heavy metals. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 2003; 98:145-9.].

- [18]. [Giroud, Mathe (1978) Pharmacologie Clinique, Tome 1 Ed. 1978, pp 113-114.].
- [19]. [Masmoudi A, Maalej N, Mseddi M et al. Glucantime® par voie parentérale, bénéfique versus toxicité.].
- [20]. (J. Delgado et Coll. Am. J.Trop. Med. Hyg. 1999 ; 61 : 766-769.).
- [21]. [De Wolff FA (1995). Antimony and health. Br Med J ; 310: 1216-7.].
- [22]. [Goodman and Gilman's (1980) The pharmacological basis of therapeutics, 7ème édition Mac Millan Publishing Co pp 1062-1063].
- [23]. [Blanc P, Sardin F, Wilner C (1980) Un cas probable d'intoxication aigue par l'antimoine. Med Leg Toxicologie, 23, 7: 637-642.].
- [24]. [Casals, J.B. (1972). Pharmacokinetic and toxicological studies of antimony dextran glycoside (RL-712).].
- [25]. [Donovan KL, White AD et Coll (1990) Pancreatitis and palindromic arthropathy with effusions associated with sodium stibogluconate J Infect, 21 (1):107-110.].
- [26]. [Belyaeva, A.P. (1967).The effect of antimony on reproduction. Gig. Tr. Prof. Zabol., 11: 32].
- [27]. (D. Torrus et Coll. Am. J.Gastroenterol. 1996; 91 : 820- 821).
- [28]. [Ranque J et Quirlici M (1986) EMC Maladies infectieuses, 8094A10, 4.Ranque J et Quirlici M (1983) Kala-Azar. EMC Maladies infectieuses, 8993 A10, 2.Rees PH & Kager PA (1980) Renal clearance of pentavalent antimony. Lancet, 2, 226-229].
- [29]. [Chulay JD, Fleckenstein L, Smith DH. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. Trans R SocTrop Med Hyg 1988; 82:69-72.].
- [30]. [Le globule rouge. A.NAJMAN chapitre V Edition flammarion.].
- [31]. [Klinken, S.P. (2002) Red blood cells. Int J Biochem Cell Biol, 34, 1513-1518.].
- [32]. [L'Hématologie page 76 a 83, b.DREYFUS 1ere partie édition Flammarion.].
- [33]. [S.A.,Jefferson, D.M., Robson, S.C., Thakar, J.H., Lorico, A., Rappa, G., Sartorelli, A.C. and Okunieff, P.(2001) 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, 27, 165-180.].
- [34]. [Diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux : thèse du Dr Julie-Anne DO-ROUVIERE.].

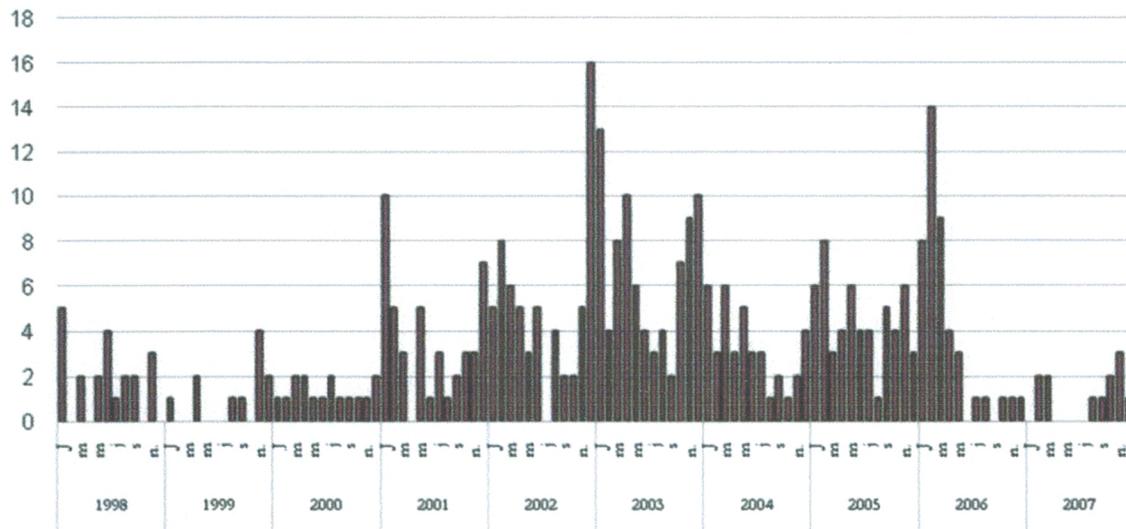
- [35]. [Physiologie du GR /par B. Dalle et Coll/ 1997. Cahier bioforma /.Pr Christian Janot/2001.]
- [36]. [L'Hématologie page 76 a 83, b.DREYFUS 1ere partie édition Flammarion. Diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux : thèse du Dr Julie-Anne DO-ROUVIERE. Le globule rouge. A.NAJMAN chapitre V Edition flammarion.].
- [37]. [Cabantchik, Z.I. (1999) Erythrocyte membrane transport. Novartis Found Symp, 226, 6-16.]
- [38]. [Tosteson, D.C. and Hoffman, J.F. (1960) Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. J Gen Physiol, 44, 169-194.]
- [39]. [Pulaski, L., Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U. and Keppler, D. (1996) Identification of the multidrug-resistance protein (MRP) as the glutathione-S-conjugate export pump of erythrocytes. Eur J Biochem, 241, 644-648.]
- [40]. [Kaestner, L. and Bernhardt, I. (2002) Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. Bioelectrochemistry, 55, 71-74.]
- [41]. cours du Professeur D. Seigneurin, réactualisé avec des données de l'Analyse clinique biologique Vol. 63, n°3, mai-juin 2005. Cellules du sang – Normal et pathologique – Marcel Bessis – Edition Masson].
- [42]. Wilmotte R, Harper SL, Ursitti J, Maréchal J, Delaunay J, Speicher DM. The exon 46-encoded sequence is essential for stability of human erythroid α -spectrin and heterodimer formation. Blood 1997 ; 90 : 4188-4196.
- [43]. www.unilim.fr/medecine/fmc/hemato/index.html : les anémies hémolytiques par D. Bordessoule 2002/2003.
- [44]. www.gs-im3.fr/G6PD/G6pd.Menu1.html: les tests biologiques de diagnostic (revue générale pour le compte rendu de l'académie des Sciences) 2003.
- [45]. Brooks GA, Wolfel EE, Butterfield GE, Cymerman A, Roberts AC, Mazzeo RS, et al. Poor relationship between arterial [lactate] and leg net release during exercise at 4,300 m altitude. Am J Physiol 1998; 275: R1192-201. 2 Cohen RD, Woods HF. Lactic acidosis revisited. Diabetes 1983; 32: 181-91
- [46]. Noordaly O, Vincent J. Evaluation of a new, rapid lactate analyzer in critical care. Intensive Care Med 1999 ; 25 : 508-13.

[47]. Brinkert W, Rommes JH, Bakker J. Lactate measurements in critically ill patients with a hand-held analyser. *Intensive Care Med* 1999 ; 25 : 966.

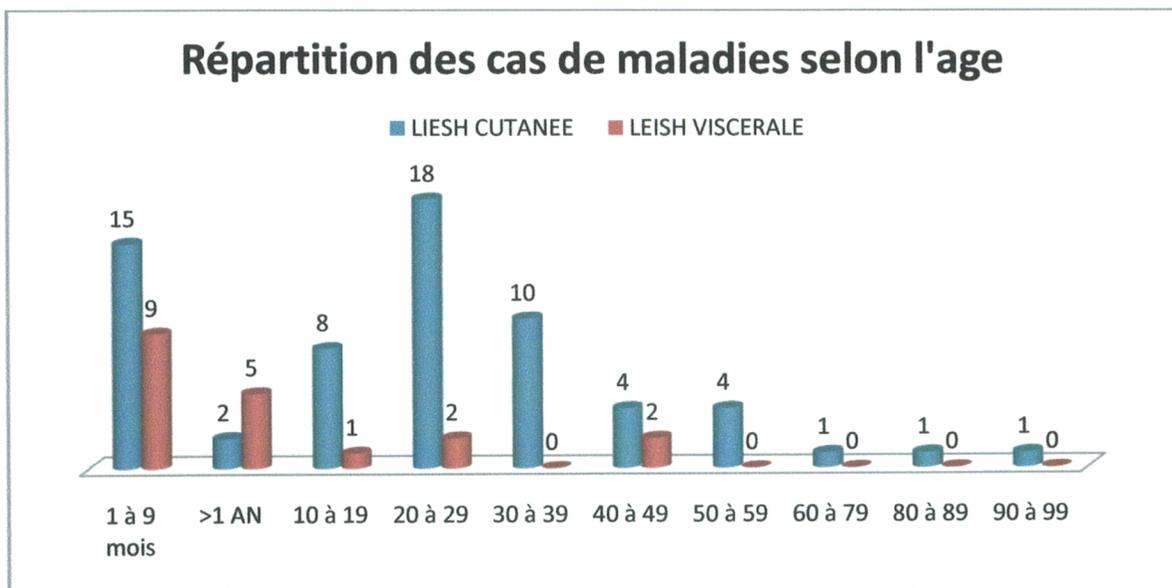
[48]. Goodman JC, Valadka AB, Gopinath SP, Uzura M, Robertson CS. Extracellular lactate and glucose alterations in the brain after head injury measured by microdialysis. *Crit Care Med* 1999 ; 27 : 1965-73.

[49]. Hainque B., Baudin B. et Lefebvre P., *Appareils et Méthodes en Biochimie et Biologie Moléculaire*, Ed. Médecine-Science Flammarion, 2008, (ISBN 978-2-2571-6545-9), p.304-306.

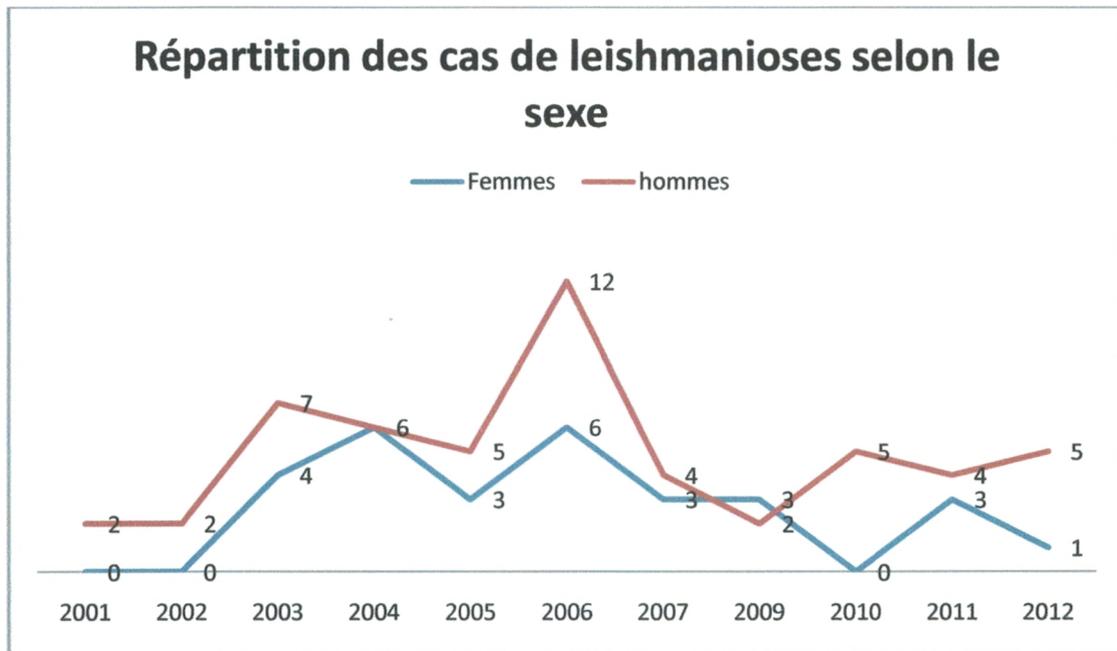
ANNEXES

Annexe N°1 : Nombre de cas mensuel de LC recensées de 1998-2007 :

Source : service d'épidémiologie CHU-T

Annexe N°2 : Répartition des cas de maladies selon l'âge

Source : service d'épidémiologie CHU-T

Annexe N°3: Répartition des cas de leishmanioses selon le sexe

Source : service d'épidémiologie CHU-T

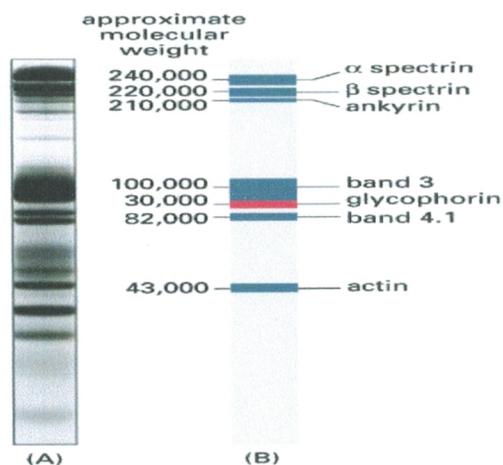
Annexe N°4: Analyse des protéines de la membrane des globules rouges :

Figure 10-29. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

**Annexe N°5: AUTRES TESTS COURANTS EN RAPPORT AVEC LES ÉRYTHROCYTES CHEZ
LES ADULTES NORMAUX :**

MESURE	UNITÉ S.I.
Bilirubinémie totale	4 - 19 µmol/L
Bilirubinémie directe	< 4 µmol/L
Fer sérique	10 - 35 µmol/L
Capacité totale sérique de fixation du fer	41 - 75 µmol/L
Saturation en fer de la transferrine (%)	0,20 - 0,50
Ferritine sérique Hommes:	19 - 204 µg/L
Femmes:	11 - 111 µg/L
Haptoglobine plasmatique	0,36 - 1,70 g/L
Hémoglobine plasmatique	0 - 50 mg/L
LD (LDH) (Déshydrogénase lactique)	167 - 334 U/L
Vitamine B ₁₂ sérique	> 150 pmol/L zone douteuse: 120 - 150 pmol/L
Folates sériques	4 - 32 nmol/L
Folates érythrocytaires	272 - 1527 nmol/L
Mensurations de la rate (<u>poids (g):</u>	150 - 250 g
<u>diamètre longitudinal à l'échographie (cm):</u>	≤ 10
Vitesse de sédimentation érythrocytaire Hommes:	1 - 10 mm/hre
Femmes:	2 - 20 mm/hre

Résumé :

Les leishmanioses sont des infections parasitaires communes à l'homme et à certains animaux, engendrées par un protozoaire flagellé du genre leishmania. Il s'agit d'un groupe de maladies extrêmement divers tant sur le plan clinique qu'épidémiologique

L'antimoniote de méglumine ou Glucantime® reste le traitement de première intention de la leishmaniose en Algérie, administré par voie locale ou parentérale (IM IV). Les effets toxiques due à cette molécule sont très fréquents même à des doses thérapeutique en raison de sa marge thérapeutique étroite (si on augmente la dose la toxicité augmente, et si on diminue la dose la sensibilité n'est pas atteint).L'hospitalisation du malade est obligatoire au cours du traitement, pour le suivit biologique (LDH, hémoglobine...) et clinique.

Ce travail est effectué au niveau du service de BIOCHIMIE CHU Tlemcen pendant une période de 9 mois, qui représente une étude analytique prospective concernant l'évaluation de la toxicité hématologique du Glucantime® : l'hémolyse, en basant sur des tests *in vitro* porté sur le sang d'un sujet sain.

Ces tests sont réalisés sur des préparations cellulaires : globule rouge, en les mettant au contact avec la molécule en mesurant les concentrations des différent paramètres du globule rouge (K⁺, LDH, protéines, hémoglobine)

Mots clés :

Globule rouge, hémolyse, pompe Na⁺/K⁺ ATPase, K⁺, LDH, protéines, hémoglobine, toxicité du Glucantime®.

Summary:

Leishmaniasis is a parasitic infection caused by a flagellate protozoan of the genus Leishmania and is common in both humans and animals. This disease is an extremely diverse in both clinical and epidemiological.

Meglumine antimoniate or Glucantime® remains the first-line treatment of leishmaniasis in Algeria, it is administered by injection. Toxic effects due to this drug are very common even at therapeutic doses because of its narrow therapeutic range (if the dose is increased toxicity increases, and if the dose is not reached sensitivity is reduced). The hospitalization of the patient is required during treatment, followed by biological (LDH, hemoglobin ...) and clinic.

This work is performed at the Biochemistry Service at Tlemcen University Hospital for a period of 9 months, which is a prospective analytical study on the evaluation of hematologic toxicity Glucantime ®: hemolysis, based on *in vitro* tests carried out on the blood of a healthy subject.

These tests are performed on cell preparations: red blood cells, putting them in contact with the molecule by measuring the concentrations of the different parameters of the red blood cell (K, LDH, protein, hemoglobin)

Keywords:

Red blood cell, hemolysis, pump Na / K ATPase, K, LDH, protein, hemoglobin, toxicity Glucantime ®.