

*République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'enseignement  
supérieur et de la recherche scientifique.*

**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID-TLEMCEM**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la  
Terre et de l'Univers  
Département de Biologie**



*Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master En Biologie  
Option : Toxicologie industrielle et environnementale*

**THEME :**

**Etude in vitro de la toxicité du Glucantime sur le  
globule rouge.**

**Présenté par :**

Mlle ABED Naima

Mlle KHOUANI Fatna

**LE JURY:**

**ENCADREUR:**

Dr. N. BRIKCI NIGASSA

Maitre assistante en Biophysique

**CO ENCADREUR :**

Dr. K. BENCHACHOU

Assistante en Hydrologie et Bromatologie Médicale

**PRESIDENT :**

Dr. N. HADDAM

Maitre de conférences

**MEMBRES:**

Dr. D. BENYAHIA

Maitre Assistante en Parasitologie et Mycologie

Dr. A. HELALI.

Assistante en Pharmacognosie

**Année universitaire : 2016-2017.**

## **Résumé :**

Les leishmanioses sont des parasitoses aux conséquences sociaux économiques lourdes en effet les traitements disponibles (Amphotéricine B) requièrent pour la plus part des administrations parentérales sont couteux.

Pour contribuer à l'effort de recherche d'altérative thérapeutique nous nous sommes intéressés au mécanisme d'actions toxique du Glucantime encore très mal connue à l'heure actuelle qui est-couteux et encore très utilisé dans notre pays afin d'amélioré l'index thérapeutique autre mot dit diminuer la toxicité toute en préservant son activité.

**Mots clés :** leishmaniose , glucantime , globule rouge , K<sup>+</sup> , LDH , Protéines , HB.

## **Abstract :**

Leishmanioses are consider parasitose diseases in the heavy economic social consequences indeed the avaible treatments (Amphotéricine require for the most part of the parenteral administration sare expensive.

The contribution of the efforts in search for alterative therapeutics we were interested in the mechanism of toxic actions of Glucantime still very badly known at the moment which are expensive and still very used in our country to improve the therapeutic in other word to decrease the toxicity for protecting its activity.

**Key words:** Leishmanise, Glucantime, Red blood cell, k<sup>+</sup>, HDL, proteins, Haemoglobin.

## **ملخص**

يعتبر داء ليشمانيا مرض طفيلي ذو عواقب اجتماعية و اقتصادية وخيمة . في الواقع العلاجات المتاحة ( أمفوتيريسين ب) حقن وريدية باهظة الثمن للمساهمة في جهود البحث للعلاجات المترتبة كنا مهتمين في آلية الإجراءات السامة التي لا تزال معروفة للغاية في هذه اللحظة و هي مكلفة ولا تزال تستخدم جدا في بلادنا لتحسين مؤشر علاجي لتقليل السمية

## **كلمات مفتاحية**

ليشمانيا, جلوكونتيم, الكريات الدموية الحمراء, بوتاسيوم,, البروتينات,خضاب الدم .

## **REMERCIEMENTS :**

*D'abord nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné courage, santé, souffle et patience pour accomplir ce travail.*

### **A Mon Encadreur :**

**Le Docteur N. BRIKCI NIGASSA**

**Maitre assistante en Biophysique**

*Votre compétence, votre encadrement ont toujours suscité mon profond respect.*

*Nous vous remercions pour votre accueil et vos conseils et pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu nous guider dans notre travail.*

*Veillez trouver ici, l'expression de nos gratitude et de nos grandes estimés.*

### **A mon coencadreur :**

**Le docteur K. BENCHACHOU**

**Assistante en hydrologie et bromatologie médicale**

*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.*

*Nous vous prions, chère professeur, d'accepter à travers ce travail le témoignage de nos hautes considérations, de nos profondes reconnaissances et nos sincères respects.*

***A Notre maître et présidente du jury :***

***Le professeur N.HADDEM***

***Professeur de Toxicologie***

*Nous avons eu l'honneur d'être parmi vos élèves et de bénéficier de votre riche enseignement.*

*Vos qualités pédagogiques et humaines sont pour nous un modèle.*

*Votre gentillesse, et votre disponibilité permanente ont toujours suscité mon admiration.*

*Vous nous avez accordée un immense honneur et un grand privilège en acceptant la présidence du jury de thèse.*

*Toute mes sollicitées et mes respect pour vous.*

***Aux membres du jury :***

***\*Le Docteur D.BENYAHIA***

***Maître assistante en Parasitologie et mycologie médicale.***

***\*Le Docteur A.HELALI***

***Assistante en pharmacognosie.***

*Mesdames les jurys, Nous vous remercions vivement de l'honneur que Vous nous faites en siégeant dans ce jury.*

*Nous vous sommes très reconnaissantes de la spontanéité et de l'amabilité avec les quelles vous avez accepté de juger notre travail.*

*Veuillez croire, Mesdames, à l'expression de nos sentiments les plus distingués.*

*Nous devons un remerciement **à tout le personnel du service de biochimie au CHU Tlemcen**, maîtres, résidents, biologistes.....ayant eu la gentillesse de consacrer de leur temps pour répondre à nos questions. Nous tenons à remercier chaleureusement, tous nos proches et tous ceux qui, de près ou de loin, nous ont apporté leurs sollicitudes pour accomplir ce travail.*

## Dédicace :

*\*A mon cher père, MILOUDE KHOUANI.*

*\*A ma chère mère, FATIMA BOUZIANE.*

*Vous avez été pour moi au long de mes études le plus Grand symbole d'amour, de dévouement qui ont ni cessés ni diminués. En témoignage de tant d'années de sacrifices, d'encouragement et de prières.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur, l'ampleur de l'affection et de l'admiration que j'éprouve pour vous.*

*Veillez trouvez dans ce travail, le fruit de vos peines et Vos efforts, ainsi que le témoignage de ma grande reconnaissance. Puisse dieu vous procurer bonheur, santé, longue vie Et vous garder à mes côtés le plus longtemps possible.*

*A mes sœurs et mon frère :*

*HOUCINE, KHADIDJA, SAKINA, NAWEL*

*Je ne saurais exprimer ma reconnaissance et ma Gratitude envers vous pour vos soutiens et vos patiences. Je vous dédie ce travail avec la plus grande reconnaissance et la profonde affection.*

*Que dieu vous protège et vous assure bonheur, santé et succès  
dans vos vie.*

***\*A ma très chères amie: IMEN KHATER***

*En témoignage de notre belle amitié, de ma profonde et sincère  
affection pour vous, pour tous les souvenirs qui nous lient, toutes  
nos joies et nos douleurs, tous les moments qu'on a partagé, je te  
dédie ce travail.*

*Que notre amitié soit sans fin. Que dieu te comble de bonheur, de  
santé et de succès.*

***\*A toute ma famille : KHOUANI.***

***\*A mon binôme : NAIMA ABED.***

***\*A tous ceux qui m'aiment.***

***\*A tous ceux que j'aime.***

***Je dédie ce travail.***

***Khouani Fatna***

## Dédicace :

*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.*

*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 durant*

*Toutes les années des études, à*

*Mon père Allah yerhimou.*

*A ma mère Latifa école de mon enfance, 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 ma sœur Fatíha et mes frères Othman et*

*Abd elkader.*

*Je vous dédie ce travail avec la plus grande reconnaissance et la  
profonde affection.*

*Que dieu vous protège et vous assure bonheur, santé et succès  
dans vos vie.*

*A ma grand-mère.*

*A ma belle famille BENIECHOU.*

*A tous les membres de ma famille.*

*A mon binôme fatna.*

*À tous les étudiants de la promotion 2015/2016*

*Option : toxicologie I et E.*

*A mes très chères amies.*

*A tous ceux qui m'aiment.*

*A tous ceux que j'aime.*

*Je dédie ce travail.*

*Náima Abed.*

# Tables des matières :

---

## *Introduction*

## *Synthèse Bibliographique*

## *Chapitre 1*

### *Leishmaniose*

1. Définition.....	5
2. Historique.....	5
3. Épidémiologie.....	6
3.1. Agent pathogène.....	6
3.1.1. Classification.....	6
3.1.2.1. Le Stade Promastigote.....	9
3.1.2.2. Le Stade Amastigote.....	9
3.2. Le Vecteur.....	10
3.3. Les Réservoirs.....	11
3.4. Cycle Du Parasite Et Transmission.....	12
3.5. Répartition géographique.....	14
3.5.1. Dans le monde.....	14
3.5.2. En Algérie.....	15
4. Physiopathologie.....	17
5. Clinique.....	18
5.1. Les Différents Aspects De Leishmaniose.....	18
5.1.1. La Leishmaniose Viscérale: (LV).....	18
5.1.1.1. La Leishmaniose Viscérale Infantile (LVI).....	19
5.1.2. La Leishmaniose Cutanée (LC).....	19
5.1.2.1. La Leishmaniose Cutanée Zoonotique.....	19
5.1.2.2. La Leishmaniose Cutanée Du Nord.....	20
5.1.3. La Leishmaniose Cutané-Muqueuse.....	20
6. Diagnostic.....	21
6.1. Diagnostic Parasitologique (en frottis).....	22
6.2. Diagnostic Moléculaire.....	23
6.3. Diagnostic Immunologique.....	23
7. Traitements.....	23
7.1. Les Traitements Physiques.....	23
7.2. Les Traitements Médicamenteux.....	23

7.2.1. Antimoniés Pentavalents.....	24
7.2.2. Amphotéricine B.....	24
7.2.3. Amphotéricine B Complexée Avec Des Lipides .....	25
7.2.4. Pentamidine .....	25
7.2.5. Miltéfosine.....	25
8. Principaux Facteurs De Risque .....	26
8.1. Conditions Socioéconomiques .....	26
8.2. Malnutrition .....	26
8.3. Mobilité de la population .....	26
8.4. Changements Environnementaux .....	26
8.5. Changement Climatique.....	27

## *Chapitre 2*

### *Glucantime*

1. Présentation .....	29
1.1. Classe Thérapeutique .....	30
1.2. La Substance Active Est.....	30
1.3. Mode Et Voie(s) D'administration .....	30
2. Structure Chimique .....	30
2.1. Formule Brute.....	31
2.2. Propriétés Physiques .....	31
3. POSOLOGIE .....	31
4. Indication.....	32
5. Contre Indication.....	34
6. Mode Et Precautions D'administration .....	34
6.1. Les Injections Intraveineuses .....	34
6.2. Precautions D'emploi .....	35
7. Tolerance Du Produit.....	36
8. Interactions Médicamenteuses .....	36
9. Effets Indésirables .....	36
10. Caractéristiques Pharmacologiques .....	37
10.1. Absorption .....	37
10.2. Distribution.....	37
10.3. Métabolisme.....	37
10.4. Demi- Vie Et Elimination.....	38
10.5. Mode D'action .....	38
11. Toxicité .....	38

11.1.	Effets Cliniques .....	38
11.1.1.	Intoxications Aigues .....	38
11.1.2.	Intoxications Chroniques.....	39
12.	Traitements .....	39
13.	Resistance Aux Dérivés De L'antimoine .....	39

### *Chapitre 3*

#### *Globule rouge*

1.	Les Globules Rouges .....	41
2.	Particularité Du Globule Rouge .....	41
3.	Le Métabolisme Energétique Du GR a Pour Rôle De.....	42
4.	Composition De La Membrane Du Globule Rouge.....	42
4.1.	Les Lipides.....	43
4.2.	Phospholipides .....	43
4.3.	Cholestérol .....	43
4.4.	Les Proteines Membranaires.....	43
4.5.	Les Protéines Extrinsèques.....	43
4.6.	Les Protéines Transmembranaires .....	44
5.	Les Propriétés Physiques De La Membrane .....	45
5.1.	La Déformabilité .....	45
5.1.1.	Les Moyens D'études Sont Nombreux .....	45
5.1.2.	Les Facteurs De La Déformabilité .....	45
6.	Les Echanges Transmembranaires .....	45
6.1.	Transport Actifs .....	45
6.2.	Transport Passifs .....	46
7.	Méthodes D'étude Des Globules Rouges .....	47
7.1.	Examen Des Hématies Sur frottis .....	47
7.2.	Les Constantes Érythrocytaires .....	47
7.2.1.	Le Volume Globulaire Moyen.....	48
7.2.2.	CGMH et TCMH .....	48

#### *Partie pratique*

1.	Problématique.....	50
2.	Objectif.....	50

### *Chapitre 1*

#### *Matériels Et Méthodes*

1.	Type, Lieu Et Calendrier De L'étude .....	52
----	-------------------------------------------	----

2.	Population .....	52
3.	Critères De Recrutement.....	52
4.	Critères D'extention .....	52
5.	Critères de jugement.....	52
6.	Collecte Des Données.....	52
7.	Analyse des données .....	53
8.	Matériels du laboratoire .....	53
8.1.	Autres matériels .....	55
9.	Réactifs et solutions de travaux.....	56
10.	Préparation De L'échantillon .....	56

## *Chapitre 2*

### *Résultats*

1.	Les tests à dose = 75µl .....	62
2.	Les tests à dose = 100µl .....	82
3.	Comparaison Entre La Dose 75µl Et La Dose 100µl.....	97

## *Chapitre 3*

<i>Discussion</i> .....	99
-------------------------	----

<i>Conclusion</i> .....	99
-------------------------	----

### *Références Bibliographiques*

## Liste des abréviations :

---

ABC : ATP Binding Cassette.

ADN : acide désoxyribonucléique.

AMM : Autorisation de mise sur le marché.

ARN : acide ribonucléique.

ATP : Adénosine triphosphate.

CGMH : Concentration Globulaire Moyenne en Hémoglobine.

DDV: durée de vie.

dl: décilitre.

DPA: dérivés pentavalents de l'antimoine.

ECG : électrocardiogramme.

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique.

Er: Erythrocytes.

fl : femto litre.

Fig : figure.

FNS : Formule numération sanguine.

G : Glucantime.

GR : globules rouge.

Hb: Hémoglobine.

IM : intra musculaire.

INSP : institue national de santé publique.

IV : intra vineuse.

j/jr : jour.

K+: Potassium.

Kg: kilo gramme.

L : litre.

L : leishmaniose.

LC : leishmaniose cutané

LCD: leishmaniose cutanée diffuse.

LCL: leishmanioses cutanées localisées.

LCM: leishmaniose cutané-muqueuse.

LDH : lactate déshydrogènes.

LPG: lipophosphoglycane.

LV: leishmaniose viscérale.

LVI : leishmaniose viscérale infantum.

MCT: transporteur de monocarboxylate.

mm : milli mole.

mg : milligramme.

MgCl<sub>2</sub> : Chlorure de magnésium.

ml : milli litre.

MRP-1 : Multidrug Resistance Protein 1.

Na<sup>+</sup>: Sodium.

NaCl : Chlorure de sodium.

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide.

NADPH ; Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

nm : nano mètre

NO: monoxyde d'azote.

NTI : transporteur de nucléoside.

OMS : organisation mondiale de santé.

PCR : polymérisation en chaîne.

PGE2 : prostaglandine.

P-GPA : Phosphatidylglycérophosphate A.

PH ; potentiel hydrogène.

PKa : Constante d'acidité.

PPI : pour préparation injectable.

QT : segment QT.

Sb: stibium.

Sbv: stibium 5.

SH: groupement thiol.

Spp: espèce.

TDR : Tropical Diseases Research.

TGMH : Teneur Globulaire Moyenne en hémoglobine.

TGO: Aspartate aminotransférase.

TGP : glutamate pyruvate transaminase.

TPBS : tampon phosphate salin.

VGM : volume globulaire moyen

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.

1N : une fois normal .

µl : micro litre

## Liste des figures :

---

Figure 1: Promastigotes de leishmanies en culture.....	9
Figure 2: Amastigotes de leishmanies dans des macrophages.....	9
Figure 3: Phlébotome de <i>Lutzomyia</i> (à gauche) et <i>Phlébotomus</i> (à droite). ....	10
Figure 4: les trois espèces de phlébotomes qui existent en Algérie.....	11
Figure 5: réservoirs de l'espèce parasite Leishmania. ....	12
Figure 6: le cycle évolutif de leishmania. ....	13
Figure 7: Répartition mondiale des zones d'endémies des leishmanioses cutanées, .....	15
Figure 8: Cas de leishmaniose cutanée en Algérie. ....	16
Figure 9: Cas de leishmaniose viscéral en Algérie. ....	16
Figure 10: les trois formes cliniques de Leishmaniose.....	20
Figure 11: modèle d'une boîte du Glucantime. ....	29
Figure 12: La Structure chimique. ....	30
Figure 13: la morphologie du globule rouge.....	41
Figure 14 : la structure de la membrane du globule rouge. ....	42
Figure 15: les protéines transmembranaires. ....	44
Figure 16: les échanges transmembranaires. ....	47
Figure 17: Centrifugation.....	53
Figure 18: Ionomètre. ....	53
Figure 19: Agitateur magnétique. ....	54
Figure 20: Vortex.....	54
Figure 21: Spectrophotomètre.....	55
Figure 22: Automate SIMENS Dimension Rx1 Max®.....	55
Figure 23: Test 01 [LDH].....	62
Figure 24: Test 02 [LDH].....	63
Figure 25: Test 03 [LDH].....	63
Figure 26: Test 04 [LDH].....	64
Figure 27: Test 05 [LDH].....	64
Figure 28: Test 06 [LDH].....	65
Figure 29: Test 07 [LDH].....	65
Figure 30: Test 08 [LDH].....	66
Figure 31: Test 09 [LDH].....	66
Figure 32: Test 10 [LDH].....	67
Figure 33: Test 01 [protéines].....	69
Figure 34: Test 02 [protéines].....	69
Figure 35: Test 03 [protéines].....	70
Figure 36: Test 04 [protéines].....	70
Figure 37: Test 05 [protéines].....	71
Figure 38: Test 01 [K+].....	73
Figure 39: Test 02 [K+].....	73
Figure 40: Test 03 [K+].....	74
Figure 41: Test 04 [K+].....	74
Figure 42: Test 05 [K+].....	75
Figure 43: Test 06 [K+].....	75
Figure 44: Test 01 [HB].....	78

Figure 45: Test 02 [HB].....	78
Figure 46: Test 03 [HB].....	79
Figure 47: Test 04 [HB].....	79
Figure 48: Test 05 [HB].....	80
Figure 49: Test 01 [LDH].....	82
Figure 50: Test 02 [LDH].....	82
Figure 51: Test 03 [LDH].....	83
Figure 52: Test 04[LDH].....	83
Figure 53: Test 05 [LDH].....	84
Figure 54: Test 06 [LDH].....	84
Figure 55: Test 01 [protéines].....	86
Figure 56: Test 02 [protéines].....	86
Figure 57 : Test 03 [protéines].....	87
Figure 58: Test 04 [protéines].....	87
Figure 59: Test 01 [K+].....	89
Figure 60: Test 02 [K+].....	89
Figure 61: Test 03 [K+].....	90
Figure 62: Test 04 [K+].....	90
Figure 63: Test 05 [K+].....	91
Figure 64: Test 01 [HB].....	93
Figure 65: Test 02 [HB].....	93
Figure 66: Test 03 [HB].....	94
Figure 67: Test 04 [HB].....	94
Figure 68: Test 05 [HB].....	95
Figure 69: comparaison 1ere dose / 2eme dose.....	97
Figure 70: comparaison 1ere dose / 2eme dose.....	97
Figure 71: comparaison 1ere dose / 2eme dose.....	98
Figure 72: comparaison 1ere dose / 2eme dose.....	98

## Liste des tableaux :

---

Tableau 1: Rapport simplifié entre les syndromes, la distribution et les principales espèces de Leishmania. ....	7
Tableau 2: principaux complexe de genre leishmania repartis selon le nom de genre, le grand domaine géographique et l'expression Clinique principale. ....	8
Tableau 3: possibilités diagnostique selon la forme de leishmania. ....	21
Tableau 4: Pourcentage D'hémolyse Des Testes. ....	77

# *Introduction*

Les leishmanioses sont un groupe d'affections parasitaires dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania* et transmises par un insecte vecteur : le phlébotome à des espèces et situations épidémiologiques variées correspondent des formes cliniques polymorphes.

On trouve ainsi des formes cutanées localisées et diffuses, des formes cutanéomuqueuses et des formes viscérales. [1]

Cette multiplicité de tableaux cliniques résulte à la fois d'un large éventail d'espèces et de la variation de la réponse immunitaire de l'hôte infecté [2]

Les leishmanioses sont endémiques dans les zones tropicales et subtropicales de 88 pays et quatre continents : Afrique du nord et de l'est, Amérique centrale et du Sud, Asie du sud et Europe du sud. [3]

Les leishmanioses se révèlent aujourd'hui beaucoup plus répandues qu'on ne le croyait entre 1,5 à 2 millions de nouveaux cas par année. C'est pourquoi, elles font partie des six maladies prioritaires du programme *Tropical Diseases Research*(TDR) de l'organisation mondiale de la santé (OMS). [1]

L'Algérie compte parmi les pays les plus touchés dans le monde.

Les dérivés pentavalents de l'antimoine (DPA) qui est commercialisé sous le nom de Glucantime®, ils constituent le traitement de première intention de la majorité des formes cliniques en raison de leur disponibilité et de leur moindre coût. [1]

L'objectif de ce travail est l'étude in vitro des effets toxiques du Glucantime® sur le globule rouge (modèle universel des cellules humaines) par le dosage des différents paramètres biologiques (potassium, LDH, protéines cellulaires, hémoglobine).

*Synthèse  
Bibliographique*

# *Chapitre 1 :* *Leishmaniose*

## 1. Définition:

Les leishmanioses constituent un groupe de maladies infectieuses dues au parasitisme de l'homme et de divers mammifères par un protozoaire flagellé appartenant à la famille kinetoplastida Et le genre *Leishmania*, transmis par un insecte vecteur le phlébotome. Elles comprennent des formes tégumentaires et une forme généralisée, la leishmaniose viscérale, qui correspond à la dissémination du parasite aux organes profonds. [4]

## 2. Historique:

- La première description clinique moderne est celle de Mc Naught en 1882 et c'est Cunningham en 1885 qui découvrit les parasites dans un prélèvement de « bouton d'Orient ».
- En 1898, en Ouzbékistan, le médecin militaire Borovsky mentionna un protozoaire dans Des prélèvements d'ulcère, sans en déterminer le statut taxonomique.
- En 1903 ce même parasite fut étudié par Wright chez un enfant arménien vivant à Boston, il fut considéré comme une microsporidie et reçut le nom de *Helcosomatropicum*.

La même année les leishmanies sont également mises en évidence par Marchand dans la rate d'un sujet mort de kala-azar.

- En 1908 La première culture fut obtenue par Nicolle et Sir William LEISHMAN, ils comparèrent les organismes de la peau avec ceux de la rate découverts en 1903, et conclurent : « La presque identité au point de vue morphologique du parasite de Leishman-Donovan est de celui de Wright n'est pas contestable. »

La même année, Nicolle et Comte découvrent les mêmes protozoaires chez le chien, puis chez Le cheval et le chat. Ils font ainsi de cette affection une maladie commune à l'homme et aux autres mammifères et ouvrent la voie aux recherches épidémiologiques.

- En 1921, les frères Sergent et leurs collaborateurs établissent le rôle de vecteurs des phlébotomes en réussissant la transmission du « bouton d'Orient » par application de broyats de ces insectes sur des scarifications cutanées.
- Mais la transmission par la piqûre ne fut prouvée qu'en 1941 par Adler et Ber. Knowles.
- En 1924, l'établit pour le kala-azar, Parrot et Donatien le font enfin pour la leishmaniose canine en 1930. De plus, l'école soviétique, avec Latyshev et Kriukova,

attire l'attention sur le rôle des rongeurs en tant que réservoirs de virus sauvages des leishmanioses.

- Le cycle du parasite ainsi que sa répartition géographique furent étudiés de 1925 à 1928 par Alder, Théoder et Christopher.
- En 1974, Chance, Gardener et Peters reconnaissaient l'appartenance de *Leishmania chagasi* au complexe *donovani-infantum*. La synonymie était établie entre *Leishmania chagasi* et *Leishmania infantum* en 1980.
- La chimiotaxonomie, Mise en place par Maazoom en 1981 s'est révélée performante en matière d'étude écoépidémiologique des foyers leishmaniens et d'un point de vue fondamental, elle a permis des études taxonomiques des leishmanies. [5]

### 3. Épidémiologie:

#### 3.1. Agent pathogène:

- Les Leishmania sont des protozoaires flagellés.

##### 3.1.1. Classification:

- **Règne** : Protista (Heackel 1866)
- **Embranchement** : Sarcomastigophora (infantum et Balamuth 1963)
- **Classe** : Zoomastigophora (Calkins 1909)
- **Ordre** : Kinetoplastida (infantum 1963, EmendVichekrman 1976)
- **Famille**: Trypanosomatidae (Dolffin 1901, Emend Grabben 1905)
- **Genre**: Leishmania (Ross 1903).
- **Sous genre** : - Leishmania
  - Viannia. [6]

Depuis la description de la première espèce de *Leishmania* par Laveran et Mesnil en 1903. [7]

Le nombre d'entités taxonomiques a augmenté pour atteindre une trentaine d'espèces distinctes (Tableau 1). [8]

**Tableau 1: Rapport simplifié entre les syndromes, la distribution et les principales espèces de *Leishmania*.**

Espèce	Distribution géographique
<b>Leishmaniose cutanée</b>	
<i>L. aethiopica</i>	Éthiopie et Kenya
<i>L. major</i>	L'Afrique et l'Asie
<i>L. mexicana</i>	Amérique Centrale et du Sud
<i>L. tropica</i>	Europe, Asie et Afrique du Nord
<b>Leishmaniose mucocutanée</b>	
<i>L. braziliensis</i>	Amérique Centrale et du Sud
<i>L. peruviana</i>	Amérique du Sud
<b>Leishmaniose viscérale</b>	
<i>L. chagasi</i>	Amérique du Sud
<i>L. donovani</i>	Afrique et Asie
<i>L. infantum</i>	Bassin méditerranéen

[9]

- En pratique, le genre *Leishmania* est divisé en 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).

Selon le tropisme des espèces, les leishmanies peuvent être distinguées en espèces à tropisme pour les organes profonds (espèces viscérotropes: *L. donovani* et *L. infantum*) et espèces à tropisme cutané (*L. major* et *L. tropica*). *L. braziliensis* présente un tropisme cutanéomuqueux. (Tableau 2). [2]

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*. [10]

**Tableau 2: principaux complexe de genre leishmania repartis selon le nom de genre, le grand domaine géographique et l'expression Clinique principale.**

Sous-genre <i>Leishmania</i>		Sous-genre <i>Viannia</i>	
Ancien Monde	<i>L. donovani</i>	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. killicki</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. arabica</i>	
	<i>L. infantum</i>		
Nouveau Monde		<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i>	<i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. peruviana</i>
Clinique	Leishmaniose viscérale	Leishmaniose cutanée	Leishmaniose cutanéomuqueuse <i>L. braziliensis</i>

[2]

### 3.1.2. Morphologies du parasite:

Les *Leishmania* se multiplient aux deux stades par division binaire simple. Des échanges génétiques rares semblent participer de façon significative à la structuration des populations parasitaires. [11]

**3.1.2.1. Le Stade Promastigote :** dans le tube digestif du phlébotome est un organisme allongé, d'environ 10 à 25  $\mu\text{m}$  de longueur. Le noyau est approximativement central, le kinétoplaste situé en position antérieure et le flagelle libre s'échappe à l'extrémité antérieure (Fig. 1). [2]

**3.1.2.2. Le Stade Amastigote :** intracellulaire chez l'hôte vertébré est un petit corpuscule ovalaire ou arrondi de 2 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre, présentant un noyau, un kinétoplaste, et une ébauche de flagelle ne faisant pas saillie à l'extérieur (Fig. 2).[2]



Figure 1: Promastigotes de leishmanies en culture.

[12]

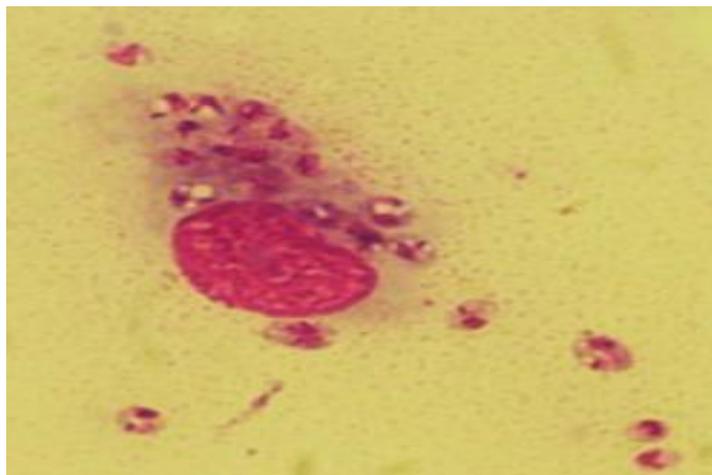


Figure 2: Amastigotes de leishmanies dans des macrophages.

[12]

### 3.2. Le Vecteur:

•C'est un insecte qui appartient à la sous-famille de Phlebotominae avec deux genres, *Phlébotomus* dans l'Ancien Monde et *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde (Fig. 3). [13]

Le phlébotome est de petite taille (2à5mm) possédant un corps grêle et allongée et des ailes dressées en V, il s'appelle aussi la mouche des sables. Il est velue de couleur jaune pâle d'aspect bossu avec de longues pattes, son vol est silencieux, sa pique est douloureuse mais ne laisse pas de trace. [4]

La femelle hématophage pique aussi bien l'homme que les animaux. Elle a besoin de sang pour le développement de ses œufs. Les phlébotomes se mettent le jour à l'abri de la lumière et du vent et deviennent actifs la nuit. [14]

Comme elle est Présente toute l'année en zone intertropicale, les phlébotomes apparaissent seulement l'été en région tempérée, où ils confèrent à la maladie un caractère saisonnier. [2]



Figure 3: Phlébotome de *Lutzomyia* (à gauche) et *Phlébotomus* (à droite).

[15]

En Algérie il existe trois espèces de phlébotomes qui sont : *Phlébotomus perniciosus* est le principal vecteur de la leishmaniose viscérale, *Phlébotomus papatasi* responsable de la transmission de la leishmaniose cutanée zoonotique et *Phlébotomus perfiliewi* la Leishmaniose cutanée du nord, ces deux espèces sont très anthropophiles (Fig. 4). [16]



Phlébotomus *Perniciosus*(LV) Phlébotomus *Perfiliewi* (LCN) Phlébotomus *papatasi* (LCZ)

**Figure 4: les trois espèces de phlébotomes qui existent en Algérie.**

[17]; [18]

### 3.3. Les Réservoirs:

Il y a 2 entités épidémiologiques:

- ✓ Zoonotique, où l'animal est le réservoir et est impliqué dans le cycle de la transmission.
- ✓ Anthroponotique, où l'homme constitue le réservoir de l'infection.

Les réservoirs naturels des *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages, chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononucléés. Les mammifères réservoirs appartiennent à divers ordres, selon les espèces de *Leishmania*: carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés, primates ou périssodactyles. Dans certains cas, l'homme est l'unique réservoir du parasite (Fig. 5). [19]

En Algérie, à la suite de la notification du premier cas de leishmaniose canine à Alger par les frères Sargent en 1910, le chien est admis comme réservoir de la leishmaniose viscérale. Concernant la LC, le chien est admis comme réservoir de la leishmaniose cutanée du Nord due à *Leishmania infantum*, alors que la LCZ, à *Leishmania major* zymodème Mon 25 admet comme réservoir deux rongeurs sauvages, *Psammomysobesus* et *Merionesshawi*. [4]



Figure 5: réservoirs de l'espèce parasite *Leishmania*.

[20]

### 3.4. Cycle Du Parasite Et Transmission:

Le cycle épidémiologique commun à toutes les espèces de *Leishmania* implique le passage alterné d'un hôte mammifère à un autre par l'intermédiaire du phlébotome vecteur. [2]

C'est à l'occasion de la piqûre que le phlébotome s'infecte sur un mammifère parasité, puis ultérieurement transmet le parasite à un mammifère sain. Le mode de piqûre des phlébotomes, avec dilacération des tissus et absorption de l'ecchymose résultante (telmophagie), est particulièrement adapté à la capture d'un parasite intracellulaire dans la peau. [21]

Dans le tube digestif du vecteur, les amastigotes absorbés en même temps que le repas sanguin se transforment en promastigotes dans les heures qui suivent, puis s'échappent de la membrane péritrophique. [21]

Ils subissent un cycle dans la lumière du tube digestif de l'insecte ; ils comportent de nombreuses divisions mitotiques, deux étapes de fixation à l'épithélium de la muqueuse intestinale et une phase de migration vers la partie antérieure du tube digestif, où a lieu la transformation en formes virulentes, ou métacyclogenèse. [21]

Une fois introduit dans la circulation, les promastigotes vont être repris par un macrophage, histiocytes, monocytes de différents organes où ils se multiplieront sous formes amastigotes. La destruction des macrophages bourrés de parasites provoque leur dissémination dans le sang et la lymphe. Les amastigotes seront soit phagocytés par de nouvelles cellules réticuloendothéliales soit repris par l'hôte invertébré, le phlébotome, lors d'un nouveau repas sanguin (Fig. 6). [22]

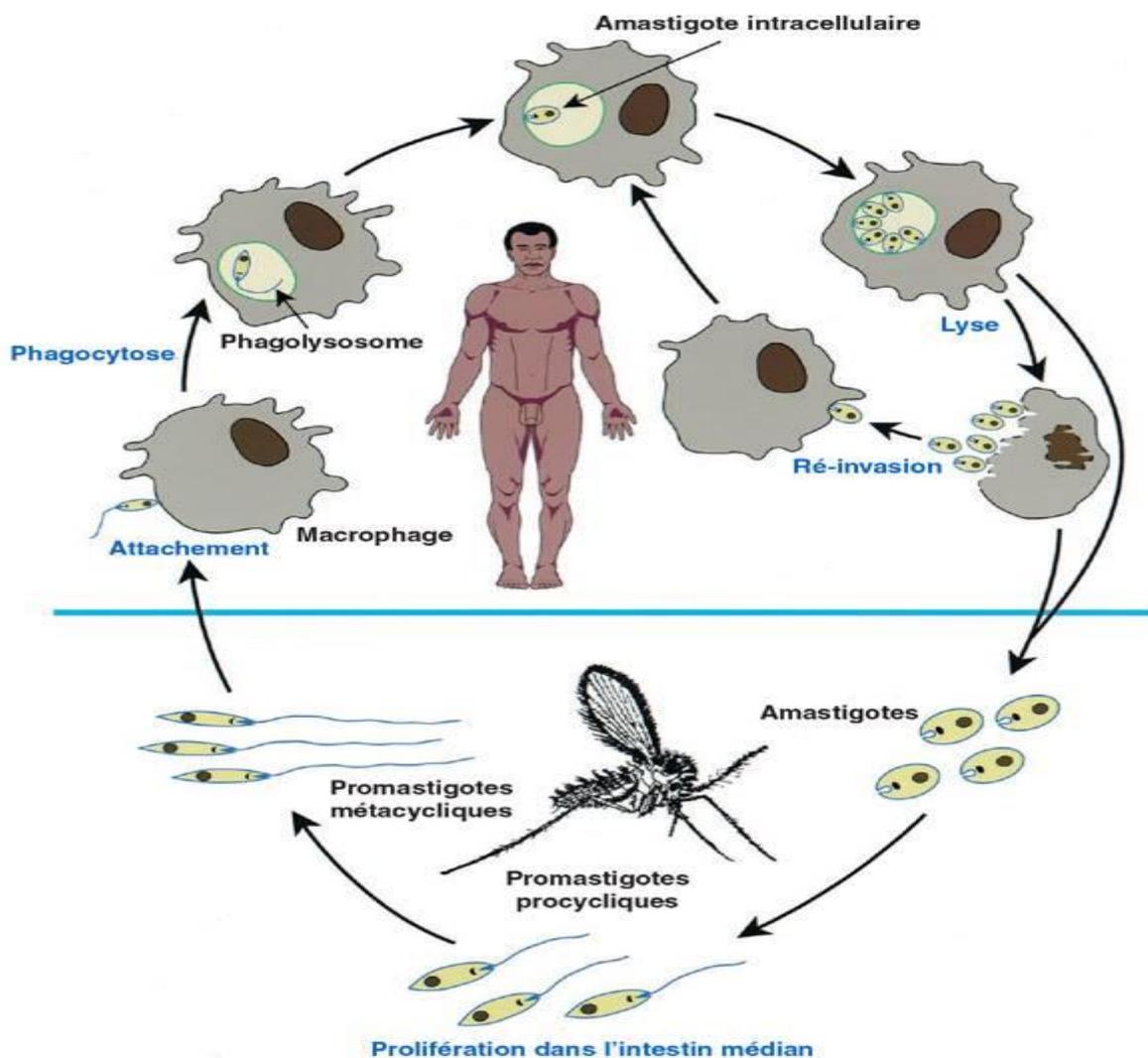


Figure 6: le cycle évolutif de leishmania.

[23]

### 3.5. Répartition géographique :

#### 3.5.1. Dans le monde :

*Leishmania* est un parasite des zones intertropicales et tempérées chaudes, signalée dans 88 pays et répartis en 6 foyers : Méditerranéen, moyen orient, chinois, indien, africain et centre et sud-américain. La prévalence de la maladie est estimée à 12 millions et l'incidence à 2 millions (1.5 millions de leishmanioses cutanées dont 90% en Algérie, Afghanistan, Arabie Saoudite, Brésil, Iran, Pérou, Syrie et 500.000 leishmanioses viscérales dont 90% en Inde, Népal, Bangladesh, Brésil et le Soudan) (Fig. 7). [24]

L'association de la Leishmaniose avec le VIH a été aussi rapportée dans 35 pays, avec la plupart des cas en Europe du sud, où 25-70% des patients adultes atteints de leishmaniose viscérale (LV) sont co-infectés par le VIH. Il a été estimé que 1.5-9% des patients infectés par le VIH vont développer la Leishmaniose. Les interactions des deux maladies aggravent chacune d'elles en accélérant l'apparition du SIDA et en raccourcissant l'espérance de vie des personnes infectées par le VIH. [25]

- Le changement du profil épidémiologique des leishmanioses viscérale et cutanée : augmentation du nombre de cas, extension géographique, émergence de nouveaux foyers, éclosion d'épidémies sont rapportées dans des pays où la co-infection leishmaniose/VIH est rare (Algérie, Tunisie).
- Les leishmanioses sont des maladies émergentes chez les voyageurs. [26]

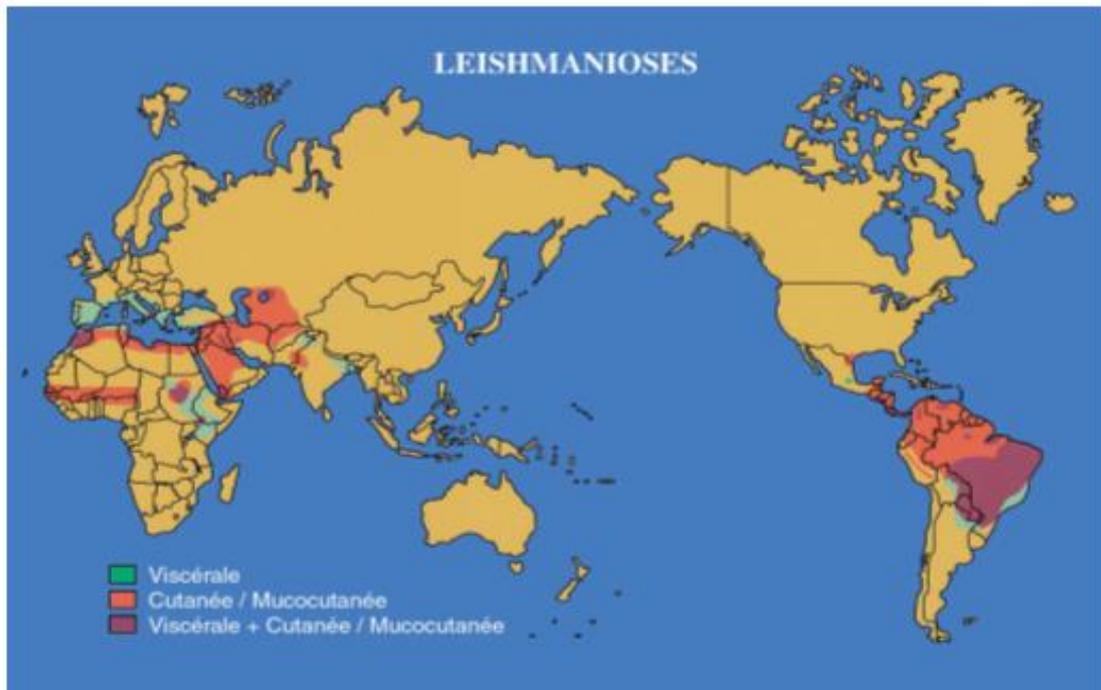


Figure 7: Répartition mondiale des zones d'endémies des leishmanioses cutanées, muco-cutanées et viscérales.

[4]

(Source : Hamdman.2001)

### 3.5.2. En Algérie:

La **LV méditerranéenne** se répartit sur toute la partie nord du pays au niveau des étages bioclimatiques humides et subhumides. Bien que sa fréquence ainsi que celle de la leishmaniose cutanée sporadique (**LCS**), varie d'une région à l'autre. Aussi elle peut survenir dans les régions arides et semi-arides, foyers de la leishmaniose cutanée zoonotique (**LCZ**) (Fig. 8). [4]

La **LCZ** est la forme la plus rencontrée en Algérie. Elle correspond au clou de Biskra ou et s'observe à l'état endémo-épidémique dans les régions arides et semi-arides, principalement au niveau de la frange nord du Sahara (Fig. 9). [27]

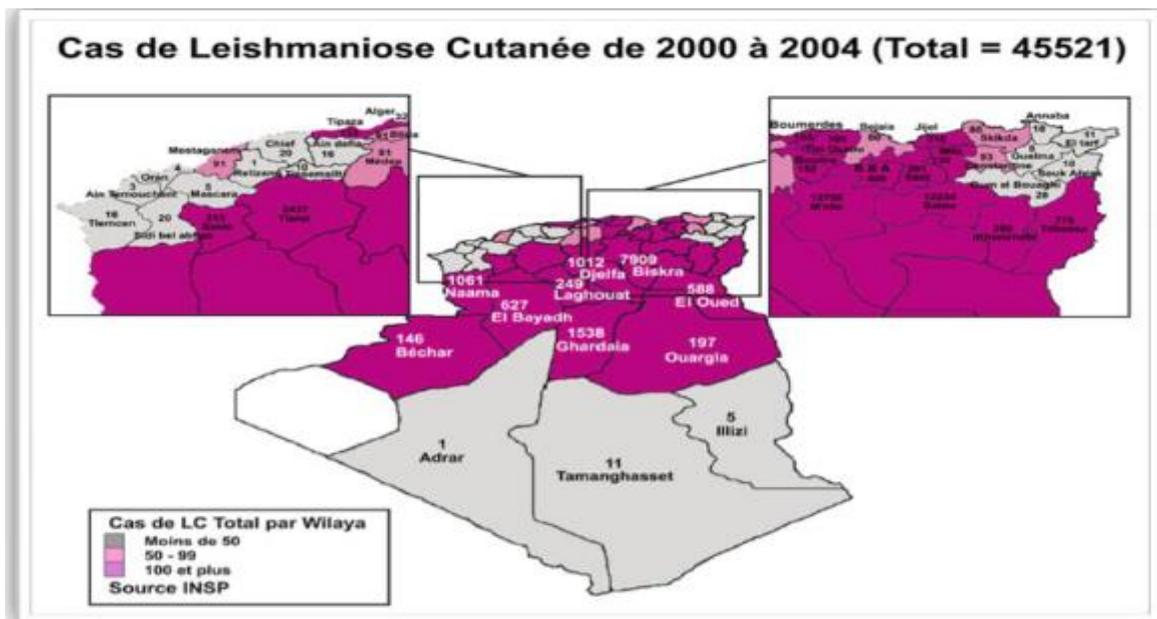


Figure 8: Cas de leishmaniose cutanée en Algérie.

[27]

(Source INSP)

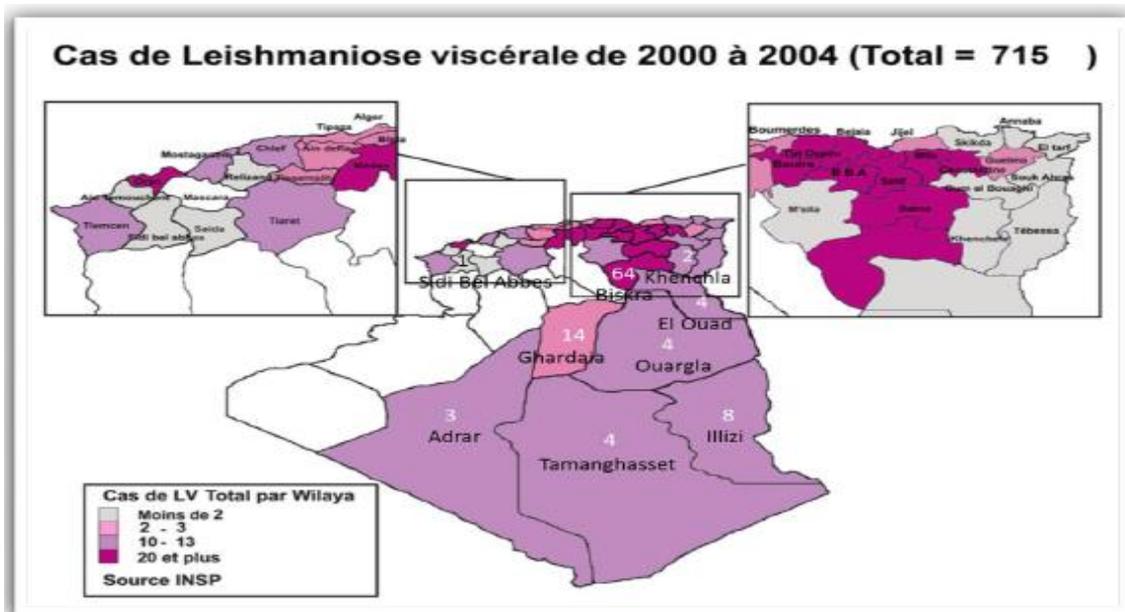


Figure 9: Cas de leishmaniose viscéral en Algérie.

[27]

(Source INSP)

#### 4. Physiopathologie:

Les promastigotes métacycliques inoculés dans la peau au moment de la piqûre infectante sont phagocytés par des cellules hôtes (macrophages, monocytes, neutrophiles, cellules dendritiques). L'interaction des leishmanies et des cellules repose sur la reconnaissance, à la face externe du parasite, de molécules de liaison par divers récepteurs présents sur la membrane cellulaire (récepteurs de type lectine, récepteurs de la fibronectine, de l'intégrine, du CR1 et du CR3). Parmi les molécules de liaison, le lipophosphoglycane apparaît de plus en plus comme la molécule clé de la virulence des *Leishmania*. [28]

À l'intérieur des cellules macrophagiques, les amastigotes sont localisés dans une vacuole parasitophore de pH très acide, dans laquelle ils survivent à la digestion par les hydrolases lysosomales. [28]

Le parasitisme entraîne dans le macrophage une baisse des capacités de production de dérivés oxygénés et nitrogénés, complétant ainsi les mécanismes d'échappement des *Leishmania* à la digestion cellulaire. [28]

Après multiplication intracellulaire et éclatement de la cellule hôte, les amastigotes infectent localement de nouvelles cellules phagocytaires et éventuellement migrent vers d'autres tissus. Les phénomènes inflammatoires et la réponse immunitaire spécifique développés par l'hôte peuvent circonscrire et maîtriser l'infection (porteurs asymptomatiques). Chez les sujets susceptibles, la maladie se déclare après plusieurs semaines, ou quelques mois d'incubation. [28]

La persistance du parasite est probablement prolongée, même après résolution clinique spontanée ou liée au traitement. Cette quiescence intracellulaire explique la possibilité de réactivations tardives, en particulier en cas de déficit immunitaire acquis. [29]

## 5. Clinique:

L'expression clinique dépend à la fois du tropisme des espèces de *Leishmania* et du statut immunitaire de l'hôte, ainsi que des modalités de sa réponse immunitaire.

Selon leur tropisme (Tableau 1), les *Leishmania* peuvent être distinguées en espèces à tropisme pour les organes profonds (espèces viscérotropes : *L. donovani* et *L. infantum*) et espèces à tropisme cutané (toutes les autres). L'espèce *L. braziliensis* présente en plus un tropisme original pour les muqueuses de la face. [2]

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. [30]

### 5.1. Les Différents Aspects De Leishmaniose :

La localisation du parasite dans les divers organes du patient est directement liée au tropisme des espèces de *Leishmania*. On peut globalement distinguer 3 types de leishmaniose:

#### 5.1.1. La Leishmaniose Viscérale: (LV)

Appelée également *kala-azar* (Inde) *méditerranéenne* (Algérie), est la forme la plus grave de la maladie, avec une mortalité de presque 100% en l'absence de traitement. La forme viscérale de la maladie est causée par différents complexes dont *L. donovani* dans le sub-continent indien et en Afrique de l'Est et *L. infantum* dans le bassin méditerranéen et dans le Nouveau Monde (*L. chagasi*).

Cette forme ne se présente pas par un ulcère cutané. En effet, les parasites injectés lors du repas sanguin du phlébotome sont ingérés par les phagocytes du système réticulo-endothélial mais ne restent pas au site de piqûre. Ils migrent plutôt vers les organes lymphoïdes tels le foie, la rate et la moelle osseuse via les systèmes sanguin et lymphatique. La période d'incubation est d'une durée variable mais prend habituellement de 2 à 4 mois. Les symptômes sont la fièvre, les frissons, la nausée, l'œdème facial, le saignement des

muqueuses, la diarrhée et les difficultés respiratoires. La diminution du nombre de phagocytes due à l'infection provoque la surproduction de phagocytes au détriment de la production de globules rouges dans la rate et la moelle, ce qui entraîne l'anémie et l'émaciation. À l'opposé, le foie et la rate augmentent en volume (hépatosplénomégalie). La mort survient chez les patients non-traités de 6 mois à quelques années suivant l'infection. La mort peut également être causée par des infections secondaires que le corps affaibli ne peut contrôler (Fig.10). [31]

#### **5.1.1.1. La Leishmaniose Viscérale Infantile (LVI):**

La LV infantile prédomine dans le pourtour du bassin méditerranéen. Elle touche de préférence le jeune enfant dans les tranches d'âge situées entre 6 mois et 4 ans. L'OMS déclare en 1990 que les enfants les plus touchés sont âgés de 1 à 4 ans. [2]

#### **5.1.2. La Leishmaniose Cutanée (LC):**

« **Bouton d'orient** » C'est la forme la plus fréquente, elle correspond à des atteintes exclusives de la peau, sans extension aux organes profonds ni aux muqueuses (Fig.10).

Les lésions cutanées sont, en général, localisées et siègent le plus souvent au site d'inoculation du parasite par le phlébotome. Une forme cutanée diffuse se développe plus rarement résulte de la conjonction du parasitisme par certaines espèces avec un état d'énergie du sujet hôte (les sujets immunodéficients VIH ; GREFFES a une évolution spontanée fatale).

En général, les caractéristiques cliniques de la leishmaniose cutanée ne sont pas uniformes dans toutes les régions ni même à l'intérieur d'une région donnée, par suite de différences touchant à l'espèce parasitaire ou aux types zoonotiques en cause. En Algérie, la leishmaniose cutanée comprend deux entités nosoépidémiologiques. [32]

#### **5.1.2.1. La Leishmaniose Cutanée Zoonotique :**

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. [33]

### 5.1.2.2. La Leishmaniose Cutanée 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. Dans la Wilaya de Ghardaïa, *Leishmania killicki* appartenant au complexe *tropica*, a été isolée au cours de l'année 2005. [34]

### 5.1.3. La Leishmaniose Cutané-Muqueuse:

La LCM ou « espundia » est une entité nosologique particulière due principalement à l'espèce *L. braziliensis*, largement répandue du sud du Mexique au nord de l'Argentine. Zoonose Selvatique, ses réservoirs sauvages demeurent mal connus. Cette affection évolue en deux temps : une primo-invasion cutanée pouvant être ultérieurement suivie par une atteinte muqueuse secondaire (Fig.10). [2]



LV



LCM



LC

Figure 10: les trois formes cliniques de Leishmaniose.

[11]

## 6. Diagnostic:

La variabilité dans les manifestations cliniques entraîne, en l'absence de moyens technologiques modernes, des difficultés à diagnostiquer de façon simple la pathologie. [35]

Le diagnostic des leishmanioses il repose sur la mise en évidence du parasite, ou de son acide désoxyribonucléique (ADN), et sur la recherche des traces immunologiques de l'infection, anticorps circulants ou hypersensibilité retardée. Les possibilités diagnostiques varient suivant la forme de leishmaniose en cause (Tableau3). [2]

**Tableau 3: possibilités diagnostique selon la forme de leishmania.**

Méthodes diagnostic	Formes cliniques			
		LV	LC	LCM
Prélèvements	Moelle osseuse	Sang	Bordure lésion	Lésion
	Rate			
Diagnostic parasitologique	Frottis	.	Frottis	Frottis
	.	.	Histopathologie	Histopathologie
	Culture	Culture	Culture	Culture
Diagnostic moléculaire	PCR	PCR	PCR	PCR
Diagnostic immunologique		Détection anti corps	Hypersensibilité retardée	Hypersensibilité retardée

[2]

Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence du parasite, ou de son ADN, à partir du matériel récolté de façon variable suivant la forme de leishmaniose en cause. [2]

➤ **Prélèvements:**

○ Dans la LV, c'est la ponction de moelle osseuse, pratiquée au sternum, ou à la crête iliaque chez le jeune enfant, qui est la plus couramment utilisée. Le sang total, ou mieux la couche leucocytaire, sont de plus en plus privilégiés pour la PCR ou la mise en culture chez l'immunodéprimé, en raison du caractère peu invasif du prélèvement. La recherche peut, chez l'immunodéprimé, s'effectuer sur des prélèvements de foie, ganglions lymphatiques, muqueuse digestive, liquide bronchioloalvéolaire. [2]

○ Dans la LC, le prélèvement se fait préférentiellement au niveau de la bordure inflammatoire de la lésion. Il est pratiqué par grattage au vaccinostyle ou à la curette, ou par carottage à l'aide d'un tire-nerf utilisé en chirurgie dentaire, ou encore sur du matériel de biopsie. [2]

○ Dans la LCM, la lésion muqueuse est prélevée à la pince à biopsie. [2]

➤ **Techniques de mise en évidence :**

Le matériel obtenu peut être étalé sur lame (frottis), mis en culture, fixé pour examen histopathologique ou, de plus en plus couramment, soumis à une PCR. L'inoculation au hamster ne se pratique plus qu'exceptionnellement. [2]

### **6.1. Diagnostic Parasitologique (en frottis):**

Le frottis est coloré par la méthode panoptique courante de May-Grünwald-Giemsa. Les parasites apparaissent sous forme amastigote, en général intracellulaires à l'intérieur de monocytes ; mais de nombreux parasites extracellulaires sont vus sur les frottis, en particulier de lésions cutanées. Le matériel de biopsie, après inclusion et coupe, peut être coloré par une technique de coloration classique, révélant la structure histologique du granulome, plus rarement les parasites. Il peut faire l'objet d'un immunomarquage à l'aide d'un sérum de souris anti-*Leishmania* conjugué à la peroxydase, qui facilite la détection du parasite (les sérums ont une immunité croisée avec les diverses espèces de *Leishmania*). [2]

## 6.2. Diagnostic Moléculaire:

Bien que différentes méthodes moléculaires aient été successivement évaluées, ce sont les techniques basées sur la PCR qui sont actuellement les plus utilisées. Leurs avantages en effet résident dans leur très grande sensibilité et leur spécificité théoriquement quasi absolue. En outre, elles permettent de détecter l'ADN parasitaire dans des échantillons ou des cultures contaminées et offrent la possibilité de réaliser l'identification de l'espèce de *Leishmania* en cause. [2]

Le diagnostic moléculaire est appliqué aussi bien à la LV qu'à la LC Dans les deux cas, il est plus sensible que les méthodes classiques de détection. [35] ; [36]

## 6.3. Diagnostic Immunologique:

La LV et la LCD s'accompagnent d'une réponse immunitaire humorale, avec apparition de titres élevés d'anticorps circulants, qui peuvent toutefois faire défaut en cas d'immunodépression.

Dans la LC et la LCM, la réponse immunitaire prépondérante est de type cellulaire, et peut être explorée par un test d'hypersensibilité retardée. [2]

## 7. Traitements:

### 7.1. Les Traitements Physiques:

Ce sont la cryothérapie, la thermothérapie, la chirurgie, l'électrothérapie, ou encore la photothérapie. [33]

### 7.2. Les Traitements Médicamenteux:

Du nombre restreint de produits antileishmaniens disponibles, et qui sont de sur croît anciens, toxiques et coûteux. Enfin, l'existence de produits dont l'efficacité n'est pas prouvée complique encore le problème.

Le traitement des leishmanioses est dominé depuis les années 1920 par les dérivés stibiés qui demeurent encore souvent des médicaments de première intention. Mais depuis l'accroissement des cas de co-infection LV/sida et l'apparition des résistances aux antimoniés,

l'amphotéricine B, surtout sous sa forme liposomale, a tendance à leur disputer cette place. La milatéfosine, premier antileishmanien oral disponible, s'est révélée très efficace dans le traitement de la LV en Inde, où elle est devenue une alternative efficace. La pentamidine n'est plus utilisée que dans certaines formes de LC. [2]

Le choix de traitement idéal dépend de plusieurs facteurs, parmi les quels la forme de la maladie, les affections concomitantes, l'espèce parasitaire et la situation géographique. [24]

### 7.2.1. 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. L'antimoniote de méglumine (Glucantime®), qui contient 85 mg Sbv/ml est disponible en France, dans les pays francophones et en Amérique du sud. Le stibogluconate de sodium (Pentostam®), à 100 mg Sbv/ml, est disponible dans les pays anglophones. Ce dernier sel d'antimoine est produit depuis quelques années en Inde sous une forme générique.

Leur mode de fonctionnement c'est perturbe 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. [37]

### 7.2.2. Amphotéricine B:

Antibiotique polyénique isolé en 1955 d'un *Streptomyces* du sol, l'amphotéricine B est un antifongique puissant utilisé dans le traitement des mycoses systémiques. Il représente un antileishmanien puissant utilisé dans le traitement des leishmanioses graves (viscérales et muqueuses) ou résistantes aux antimoniés.

L'amphotéricine B se fixe sur les stérols membranaires des champignons et des *Leishmania*, provoquant des modifications de la perméabilité de leurs membranes entraînant une perte létale de substances. Elle agirait en outre également sur les macrophages en stimulant leur production et en augmentant leurs capacités phagocytaires. [2]

### 7.2.3. Amphotéricine B Complexée Avec Des Lipides :

Lorsqu'elle est complexée avec des lipides, l'amphotéricine B ne se dissocie pas dans la circulation générale, d'où elle est captée par les cellules du système des phagocytes mononucléés. Elle s'accumule dans les tissus infectés et les cellules, en particulier les macrophages, ce qui revient à une augmentation de l'index thérapeutique du produit. [2]

### 7.2.4. Pentamidine:

La pentamidine est une diamine aromatique synthétisée dès la fin des années 1930. À l'heure actuelle, seul l'iséthionate de pentamidine, commercialisé sous le nom de Pentacarinat®, est disponible. La pentamidine a été employée comme médicament alternatif de la LV infantile, en cures alternées avec l'antimoniote de méglumine. Elle est aujourd'hui seulement utilisée comme drogue de première intention dans le traitement de certaines formes de LC. [2]

La pentamidine inhibe la synthèse de l'ADN parasite par blocage de la thymidine synthétase et par fixation de l'ARN de transfert. [33]

Le coût du traitement, le risque élevé de développer un diabète sucré insulino-dépendant et la faible efficacité de cette substance ont limité son utilisation. [2]

### 7.2.5. Miltéfosine:

La miltéfosine ou hexadecylphosphocholine a dans un premier temps été développée dans le domaine oncologique, et a obtenu une première AMM en France en 1997 pour le traitement curatif des métastases cutanées du cancer du sein par voie locale (Miltex®). Son activité par voie orale contre les leishmanioses est connue depuis les années 1980, et elle a été mise sur le marché pour la première fois en Inde en 2002. [38] ; [39]

La miltéfosine agit sur les leishmanies en perturbant le métabolisme lipidique au niveau de la membrane des parasites.

La miltéfosine est non seulement directement toxique pour les leishmanies, mais elle stimule aussi l'activation des macrophages et des cellules T, et la production des métabolites de l'oxygène et du monoxyde d'azote. [40]

## **8. Principaux Facteurs De Risque:**

### **8.1. Conditions Socioéconomiques:**

La pauvreté accroît le risque de leishmaniose. Les mauvaises conditions de logement et les insuffisances de l'assainissement domestique (par exemple, absence de système de gestion des déchets, égouts à ciel ouvert) favorisent le développement des sites de reproduction et de repos des phlébotomes et augmentent les contacts avec l'homme. Les phlébotomes sont attirés par les repas de sang potentiels que leur offrent les logements surpeuplés. Les comportements humains (par exemple, dormir dehors ou à même le sol) sont également susceptibles d'accroître le risque, que modère l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides. [41]

### **8.2. Malnutrition:**

Les régimes alimentaires pauvres en protéines, en fer, en vitamine A et en zinc augmentent la probabilité de voir l'infection évoluer en kala-azar. [41]

### **8.3. Mobilité de la population:**

Les épidémies des deux principales formes de leishmaniose sont souvent associées aux migrations et à l'arrivée de personnes non immunisées dans des zones où il existe déjà des cycles de transmission. L'exposition professionnelle et l'intensification de la déforestation restent des facteurs importants. Par exemple, les personnes qui s'installent dans des terres autrefois boisées se rapprochent de l'habitat du phlébotome, ce qui peut augmenter rapidement le nombre de cas. [41]

### **8.4. Changements Environnementaux:**

Plusieurs changements environnementaux peuvent influencer l'incidence de la leishmaniose, dont l'urbanisation, l'intégration du cycle de transmission dans l'habitat humain et l'empiétement des exploitations agricoles et des zones de peuplement sur les forêts. [41]

### **8.5. Changement Climatique:**

Les conditions climatiques jouent sur la leishmaniose, et l'évolution des précipitations, des températures et de l'humidité a des répercussions importantes à cet égard. Le réchauffement planétaire et la dégradation des terres modifient de plusieurs manières l'épidémiologie de la leishmaniose. [41]

# *Chapitre 2 :* *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 Méglumine, à reconstituer avec de l'eau pour préparation injectable, à usage parentéral intramusculaire, intraveineux et intra lésionnel. [23]



Figure 11: modèle d'une boîte du Glucantime.

[42]

Nom : Antimoine, sels pentavalents.

Synonymes :

- \* Antimoniate de N-méthylglucamine
- \* Antimoniate de méglumine.
- \* Stibogluconate de sodium. [43]

Excipients:

- Eau ppi,
- Potassium disulfite,
- Sodium sulfite anhydre. [44]

### 1.1. Classe Thérapeutique :

- Antiparasitaire.
- Anti-leishmanies.
- Anti protozoaires.
- Dérivés de l'antimoine. [43]

### 1.2. La Substance Active Est:

- Antimoniote de méglumine ..... 1,5000 g
- Quantité correspondante en antimoine .....0, 4050 g Pour une ampoule de 5 ml.
- Eau pour préparations injectables. [45]

### 1.3. Mode Et Voie(s) D'administration :

- Usage parentéral intra-musculaire.
- Intraveineux.
- Sous cutané (Intra-lésionnel). [31]

## 2. Structure Chimique:

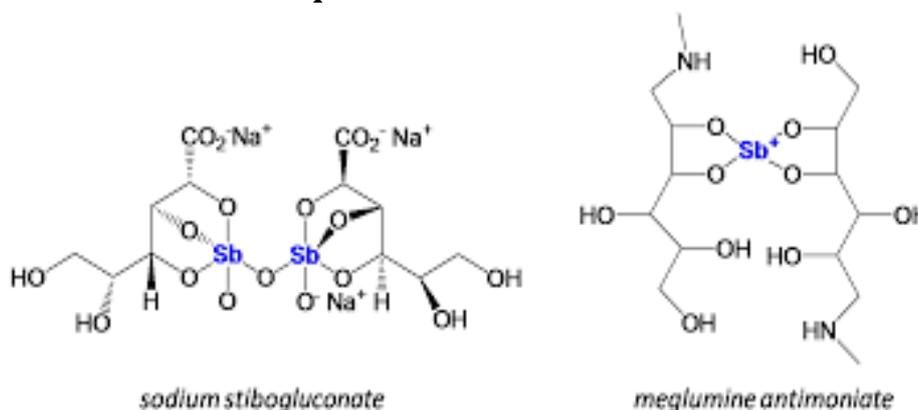


Figure 12: La Structure chimique.

[46]

L'antimoniote de méglumine et le stibogluconate de Sodium ont une structure chimique voisine.

## 2.1. Formule Brute:

- Antimoniote de méglumine:  $C_7H_{18}NO_8Sb$ .
- Stibogluconate de sodium:  $C_6H_9Na_2O_9Sb$ . [43]

## 2.2. Propriétés Physiques:

- Couleur: Antimoniote de méglumine: blanche.
- Forme: Cristaux.
- Poids moléculaire: Antimoniote de méglumine: 366g/mole.
- Aspect : Solution limpide. [43]
- 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. [23]
- **Stibogluconate de sodium**: très soluble dans l'eau; Insoluble dans l'alcool et l'éther. [43]
- Conditions De Stockage:
  - À l'abri de la chaleur & humidité. [23]
  - Le stibogluconate de sodium doit être conservé à 25°C et doit être protégé de la lumière. [43]

## 3. POSOLOGIE :

La posologie actuelle découlant des recommandations de Herwaldt et Berman et adoptée par l'OMS est de 20 mg SbV/kg/j, en cure de 20 jours dans la LC, de 28 jours dans la LV et la LCM. Le produit est administré à doses progressives, pour atteindre la dose

quotidienne complète le troisième jour. La dose quotidienne peut être administrée en une seule injection ou fractionnée en deux. La cure peut être répétée après un temps de repos.

Dans la LCM, une revue systématique de la littérature a montré que l'antimoniote de méglumine avait un taux de guérison d'environ 88 %, nettement supérieur au stibogluconate de sodium. [2]

- 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 30 j.
- Arrêt de 15 jr puis une deuxième cure pendant 30 j. [23]

#### **4. Indication:**

Le Glucantime s'utilise selon des schémas variables d'un pays à l'autre (l'espèce parasitaire), à des doses plus ou moins fortes, mais toujours en cures, espacées de période de repos destinées à assurer l'élimination de l'antimoine. [47]

#### **4.1. Leishmaniose Viscérale:**

Injection intramusculaire de 20 mg/kg/jour d'antimoine (soit 75 mg/kg/jour d'antimoniate 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. [48]

#### **4.2. Leishmaniose Cutanée:**

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% (300 mg/ml) en cas de lésions ou peu nombreuses. [48]

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. [48]

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% des cas de leishmanioses tégumentaires de l'Ancien Monde. [48]

#### **4.3. Les Leishmanioses Cutané- Muqueuses:**

LCM du Nouveau Monde nécessitent un traitement plus prolongé de 28 jours Le taux de guérison obtenu varie de 10 à 75% 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. [48]

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. [48]

## 5. Contre Indication:

Le Glucantime est contre indiqué en cas :

- ✓ D'hypersensibilité à l'un des constituants (antécédent d'allergique)
- ✓ D'insuffisances cardiaque ou hépatique.
- ✓ D'insuffisance rénale sévère.
- ✓ De tares cardiaques ou troubles de conduction.
- ✓ De tuberculose pulmonaire.
- ✓ De syndrome hémorragique.
- ✓ Éviter pendant l'allaitement en raison du passage dans le lait maternel. [43]

- **Grossesse:**

L'innocuité du médicament pendant la grossesse n'est pas démontrée. Le traitement doit être cependant instauré sans délai vu que la leishmaniose viscérale est une maladie pouvant être fatale, mais il faut l'utiliser sous une surveillance permanente. [45]

- **Allaitement:**

Par prudence, éviter l'administration de ce médicament pendant l'allaitement. [45]

## 6. Mode Et Precautions D'administration:

La voie d'administration se fait par voie injectable, le patient doit être hospitalisé durant la période du traitement. [49]

### 6.1. 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. [49]

## 6.2. Précautions D'emploi:

### a. Avant de commencer le traitement :

- Faire un bilan pré-thérapeutique pour s'assurer que le patient ne présente aucune pathologie qui peut s'aggraver par l'administration du Glucantime. [23]

### Les bilans pré-thérapeutiques:

- ❖ Fonction rénale: urémie, créatinémie.
- ❖ Chimie des urines.
- ❖ Fonction hépatique: TGO-TGP, phosphatase alcalines
- ❖ Téléthorax.
- ❖ ECG.
- ❖ FNS.
- ❖ Bilan d'hémostase.[23]

- Les éventuelles carences en fer ou autres doivent être corrigées. [45]

### b. 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. [23]

- 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. [31]

- En cas d'altération des fonctions cardiaque, hépatique ou rénale, les doses devront être diminuées. [47]

## 7. Tolérance Du Produit:

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

**La tolérance** de cette molécule est variable d'un sujet à un autre et on décrit classiquement deux tableaux d'intoxication au Glucantime® :

\* la stibiointolérance.

\* la stibiointoxication. [23]

**La stibiointolérance**, d'apparition précoce et indépendante d'un surdosage, se manifeste par des signes à type de décalage thermique, d'arthralgies, myalgies, de vomissements, de toux quinteuse et de rashes cutanés isolés ou associés.[50]

**La stibiointoxication** survient, quant à elle, plus volontiers en fin de traitement, voire même après l'arrêt de celui-ci. Les signes d'intoxication comportent une atteinte cardiaque, hépatique, rénale, pancréatique et hématologique et la gravité de ces manifestations paraît d'avantage liée à la dose totale administrée. [51]

## 8. Interactions Médicamenteuses:

- Médicaments qui contiennent de l'antimoine.
- Médicaments qui prolongent l'intervalle QT. [47]

## 9. Effets Indésirables:

- Maux de tête, Céphalées, Malaise général
- Hémolyse
- Éruption cutanée
- Rash cutané et œdème du visage.
- Douleur abdominale.

- Augmentation des enzymes hépatiques.
- Insuffisance rénale et hépatique. [52]

## **10. Caractéristiques Pharmacologiques :**

### **10.1. Absorption :**

L'absence d'absorption digestive de l'antimonié de N-méthyl glucamine (L'absorption par l'homme de l'antimoine est faible) impose une injection par voie parentérale. Après administration de 10 mg/Kg d'antimoine pentavalent, un pic sérique de 10 µl /ml est atteint en quinze minutes. [53]

### **10.2. 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. [54]

- Après injection IV l'antimoine est distribué et stocké dans différents compartiments corporels. Il 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 concentrations, 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. [55]

### **10.3. Métabolisme:**

Etant donné que les antimoniés pentavalents n'ont pas d'action parasiticide directe sur les leishmanies, certains auteurs pensent que la différence d'activité in vitro et vivo de ces produits est due à une réduction en forme trivalente. [43]

#### 10.4. 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.

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. [55]

#### 10.5. 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'antimoine pentavalent, mais on pense que beaucoup des enzymes de la Leishmanie sont inhibés sélectivement, inhibant la phosphofructoquinase avec un blocage subséquent de la production de l'adénosine triphosphate. [52]

### 11. Toxicité:

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. [56]

#### 11.1. Effets Cliniques:

##### 11.1.1. Intoxications Aigues:

En cas de dose élevé:

- Atteintes hépatique.
- Rénal (insuffisance rénale aigue).
- Cardiaque (bradycardie, allongement de QT, aplatissement ou inversement de l'onde T)
- Hématopoïétique (anémie, agranulocytose).
- Neurologie (polynévrites). [44] ; [57]

### 11.1.2. Intoxications Chroniques:

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. [58] ; [59]

### 12. Traitements:

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. [60]

### 13. Résistance Aux Dérivés De L'antimoine :

Du fait de leur utilisation courante, avec un respect approximatif des posologies et des recommandations de l'OMS, les souches de *Leishmania* résistantes aux dérivés d'antimoine sont de plus en plus courantes, et peuvent atteindre jusqu'à 70% des patients, notamment en Inde. Les mécanismes de résistances impliqués seraient une diminution de leur réduction en antimoine trivalent, une diminution de la formation de complexes actifs avec des thiols, ou encore une surexpression de deux protéines de membrane de la superfamille des transporteurs ATP-binding cassette (ABC, actifs dans le phénomène de chimiorésistance multiple) : P-GPA et MRP-1, qui provoquent l'évacuation du médicament par les cellules parasitées. [38] ; [61]

*Chapitre 3 :*  
*Globule rouge*

## 1. Les Globules Rouges:

Les globules rouges sont des cellules anucléés dont le constituant essentiel est une hémoprotéine de liaison de l'oxygène : l'hémoglobine (environ 14,5 g / 100 ml). Le rôle principal de ces cellules est d'assurer le transport de l'oxygène et du gaz carbonique entre les alvéoles pulmonaires et les 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. [62]

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 3micro mètres. Cette déformabilité, essentielle à sa survie dépend de la forme de la cellule et du rapport entre la surface et le volume. [63]

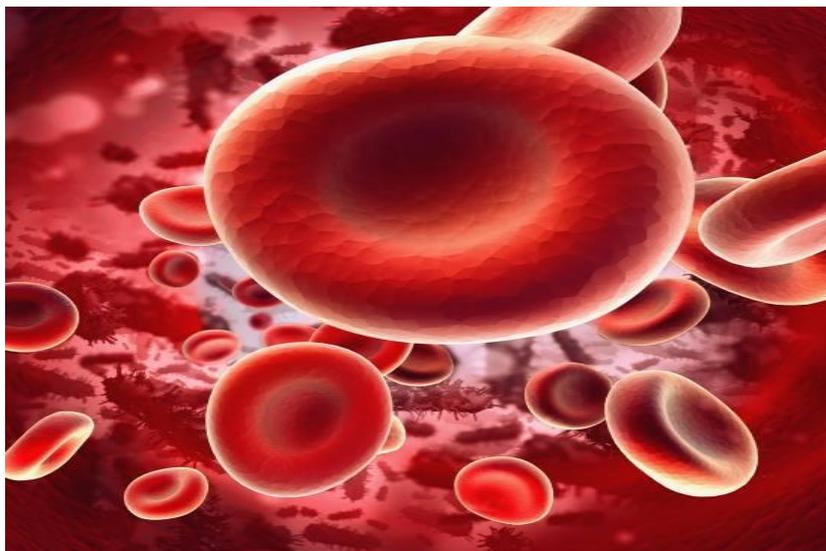


Figure 13: la morphologie du globule rouge.

[64]

## 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. [23]

### 3. Le Métabolisme Energétique 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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  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. [65]

### 4. 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. [66]

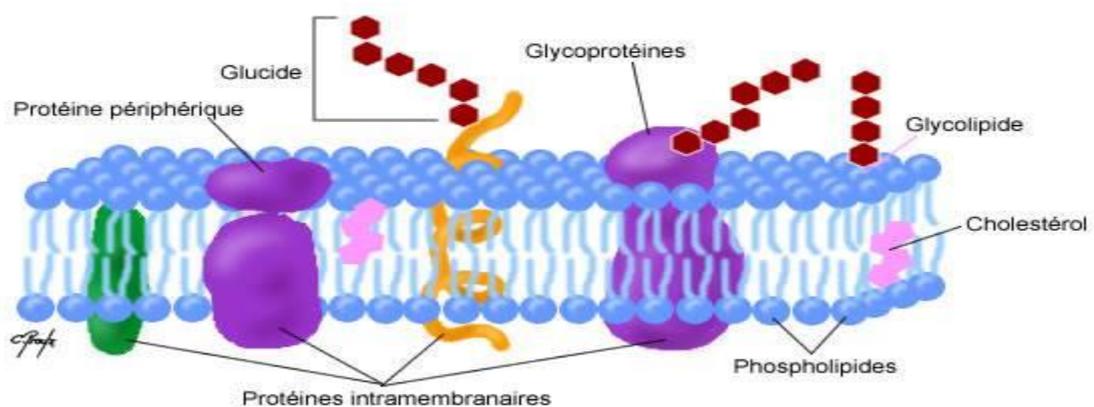


Figure 14 : la structure de la membrane du globule rouge.

[67]

#### 4.1. 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. [68]

#### 4.2. Phospholipides:

Elle est constituée de:

- lécithine (phosphatidylcholine), environ 30 %.
- phosphatidyl-éthanol amine, 27 %.
- sphingomyéline, 22 à 25 %.
- phosphatidyl-sérine et phosphatidylinositol, 13,5 %.
- lysolécithine, 1,2 à 2,5 %.
- Acide phosphatidique et polyglycérol phosphatide, 2 %. [68]

#### 4.3. Cholestérol:

Représente 20 à 25 % des lipides totaux. Ils existent exclusivement sous forme libre répartie régulièrement dans la membrane. (diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux). [23]

#### 4.4. Les Protéines 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. [69]

#### 4.5. Les Protéines Extrinsèques:

Les protéines extrinsèques sont localisées en dehors de la bicouche phospholipidique et sont ainsi soit entièrement intracellulaire, soit entièrement extracellulaire. Elles interagissent avec la membrane, par des liaisons électrostatiques de types liaisons hydrogènes et liaisons de

Van der Wals, au niveau de domaines caractéristiques de protéines transmembranaires ou de lipides. Ces interactions étant faibles, elles sont rompues facilement par des variations de forces ioniques et de pH. [65]

- La spectrine.
- L'ankyrine.
- La protéine 4.1.
- La protéine 4.2.
- L'actine.
- L'adducine.[70]

#### 4.6. Les Protéines Transmembranaires:

Les protéines transmembranaires traversent les deux feuillets de la membrane. Ces protéines sont liées de manière stable à la membrane avec l'environnement hydrophobe de la face interne de la membrane, par les acides aminés apolaires de leurs hélices  $\alpha$ . Elles ne peuvent ainsi être séparées de la double couche phospholipidique (et donc étudiées) que par l'action de détergents. [65]

- La protéine bande 3.
- Les glycophorines:

✚ Glycophorine A.

✚ La glycophorine C. [70]

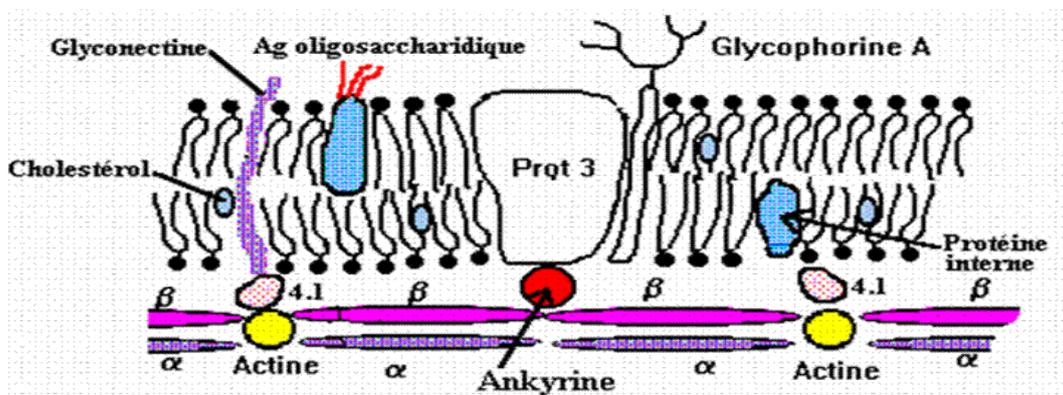


Figure 15: les protéines transmembranaires.

[71]

## **5. Les Propriétés Physiques De La Membrane:**

### **5.1. La Déformabilité:**

Le globule rouge est un discocyte dans les gros vaisseaux, mais dans les capillaires à diamètre inférieur à celui des discocytes (cordons de Billeroth de la rate de 3  $\mu$ ) il doit se déformer ; il y a fragmentation mécanique, puis destruction des hématies, en cas de perte de surface de la membrane ou précipités intra globulaires. [65]

#### **5.1.1. Les Moyens D'études Sont Nombreux:**

- Etude de la filtrabilité (filtres millipores).
- Etude de la viscosité.
- Etude de la déformabilité individuelle à la micropipette de Rand.
- Attaque spécifique d'une protéine de membrane et étude de la déformabilité.
- Observations in vivo au microscope optique en chambre cutanée. [65]

#### **5.1.2. Les Facteurs De La Déformabilité:**

Sont divers : Viscosité du contenu du globule rouge, forme de celui-ci (sphérocytes détruits lors du passage splénique), élasticité et résistance à la rupture de la membrane selon l'état de ses protéines, métabolisme globulaire qui retentit sur ce dernier (la déformabilité diminue avec l'âge de la cellule et sans doute l'épuisement de l'ATP), facteurs extraglobulaires : rhéologiques, contact avec d'autres cellules, hyperosmolarité. [65]

## **6. Les Echanges Transmembranaires:**

### **6.1. Transport Actifs:**

Différents types de transporteurs actifs primaires sont décrits dans la membrane du globule rouge. La pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  permet le maintien d'une forte concentration intracellulaire en potassium (environ 140 mM) et d'une faible concentration en sodium (environ 10 mM). [72].

## 6.2. Transport Passifs:

À Travers des «pores» de la membrane suivant le gradient de concentration des ions. [72]

- **Échange des cations:** Les échanges de cations demandent, pour leur plus grande part, un mécanisme actif.
- Les concentrations en  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  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  $\text{K}^+$  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  $\text{Na}^+$  et le  $\text{K}^+$  vers les deux faces de la membrane, modification s'accompagnant d'un changement d'affinité des sites, tels que trois  $\text{Na}^+$  sont rejetés vers l'extérieur en échange de deux  $\text{K}^+$  maintenus dans l'intérieur. [73]
- Un second système d'échange constitue le cotransport  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ . Ce système est bidirectionnel et transporte  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  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. [74]
- L'hémoglobine au pH cellulaire se comporte comme un anion et sa présence explique la teneur en ions chlore et en ions  $\text{CO}_3^{1-}$  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. [75]

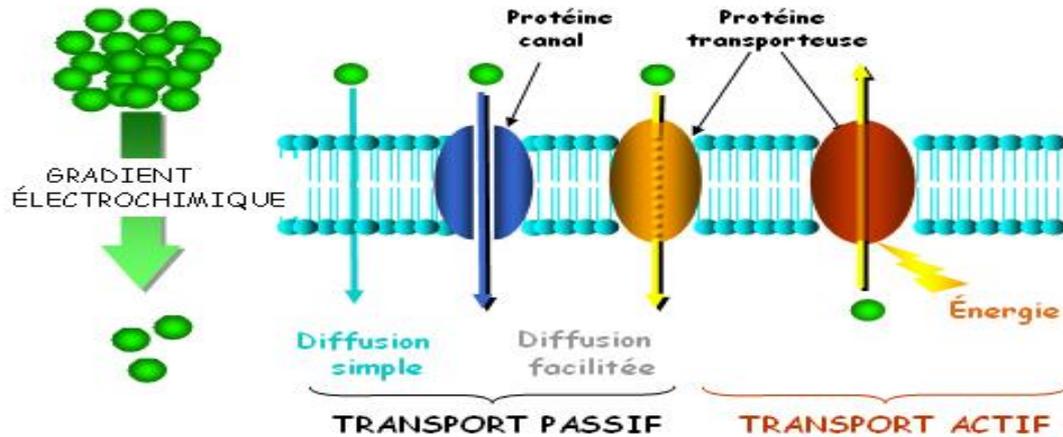


Figure 16: les échanges transmembranaires.

[74]

## 7. 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. [23]

### 7.1. 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. [77]

### 7.2. 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. [77]

**Les constantes érythrocytaires sont:** le volume globulaire moyen (VGM), la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH) et la concentration globulaire moyenne en hémoglobine (CGMH). [77]

### 7.2.1. Le Volume Globulaire Moyen:

Le **VGM** rend compte de la taille moyenne des globules rouges. Il permet notamment le diagnostic d'une anémie. Le taux normal du VGM est compris entre 80 et 95 fl. femto litres. [77]

#### **En Cas D'anomalie:**

- Si le taux est trop bas, on parle d'une microcytose. Cette anomalie est typique d'une anémie chronique causée par une carence en fer.
- Si le taux est trop élevé, on parle cette fois d'une macrocytose. On la retrouve lors d'une carence chronique en vitamine B12, en vitamine B9 ou en cas d'alcoolisme.

### 7.2.2. CGMH et TCMH:

- La CGMH (concentration globulaire moyenne en hémoglobine) correspond à la quantité d'hémoglobine comprise dans 100 ml de globules rouges. Sa valeur normale varie de 280 à 320 g/ ml. [65]
- La TCMH (teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine) correspond à la quantité de moyenne de l'hémoglobine comprise dans 1 globule rouge. [65]

#### **En Cas D'anomalie :**

- Ces deux valeurs n'ont pas grand intérêt en terme de diagnostic. Un CCMH faible va simplement confirmer une hypochromie (manque de fer). [77]

*Partie  
pratique*

## **1. Problématique:**

Les leishmanioses sont des infections parasitaires communes à l'Homme et à certains animaux, engendrées par un protozoaire flagellé, du genre leishmania.

En Algérie l'antimoniote de méglumine reste le traitement de première intention de la leishmaniose. Administré par voie parentérale, les effets toxiques dus à cette molécule sont malheureusement très fréquents en raison de la marge thérapeutique étroite de cette molécule.

## **2. Objectif:**

Dans le cadre restreint de ce présent travail il s'agit d'étudier et d'évaluer une partie de mécanisme de toxicité de l'antimoine de méglumine (Glucantime) in vitro sur le globule rouge comme modèle universel de cellule humaine par :

\*d'une part les perturbations de la perméabilité membranaire notamment au Potassium

\*d'autre part la lyse de globule rouge étape ultime de toxicité.

*Chapitre 1 :*  
*Matériels Et*  
*Méthodes*

## 1. Type, Lieu Et Calendrier De L'étude:

C'est une étude analytique prospective, elle s'est déroulée au niveau du service de biochimie du laboratoire central du C.H.U Tlemcen durant une période de 6 mois depuis Janvier jusqu'au mois de Juin de l'année 2017.

## 2. Population:

L'unité de base de cette étude est définie par un prélèvement (témoin et test).

## 3. Critères De Recrutement:

Un volontaire sain n'ayant pris aucun traitement et ne présentant aucun problème d'ordre hématologique.

## 4. Critères D'extention:

Anémie - VGM allongé - sujet sans traitement.

## 5. Critères de jugement:

[K+] - [HB] - [LDH] - [Protéines].

## 6. Collecte Des Données:

Se fait à l'aide d'un support de formation comprenant trois parties :

- Identification : Le numéro et la date du prélèvement.
- Les paramètres dosés pour l'échantillon témoin (HB, K+, PROT, LDH).
- Les paramètres dosés pour l'échantillon test (HB, K+, PROT, LDH).

## 7. Analyse des données:

La saisie et l'analyse des données collectées ont été effectuées par le logiciel MICROSOFT OFFICE EXCEL 2010. Les graphes ont été également tracés par ce même logiciel.

## 8. Matériels du laboratoire:

- ✓ **Centrifugeuse:** utilisée pour centrifuger les échantillons pour séparer le culot globulaire de surnageant.



Figure 17: Centrifugation.

- ✓ **Ionomètre :** Pour déterminer la concentration ionique du sang: sodium (Na), potassium (K), chlore (Cl).



Figure 18: Ionomètre.

- ✓ **Agitateur:** pour l'homogénéisation des solutions.



Figure 19: Agitateur magnétique.

- ✓ **Vortex :** Utilisé pour mieux mélanger les solutions de travail.



Figure 20: Vortex.

- ✓ **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 :  $A = \epsilon lC$ .

L'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution diluée,



Figure 21: Spectrophotomètre.

✓ **Automate SIMENS Dimension Rxl Max®:**



Figure 22: Automate SIMENS Dimension Rxl Max®.

### 8.1. Autres matériels:

- Les gants.
- Tubes: EDTA, Tubes héparine, Tubes sec.
- Micropipette: 1000,200, 50, 100.
- Seringues 10 ml, coton, sparadrap, alcool, Béchers, pots stériles.
- Étiquettes pour marquer les tubes.
- Chronomètre.

## 9. Réactifs et solutions de travaux:

- ❖ **Glucantime dilué (1/10).**
- ❖ **Folin 1N.**
- ❖ **Biuret.**
- ❖ **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 MgCl<sub>2</sub>. Elle doit être conservée au frigo à 2-5°C, elle est instable à température ambiante.

### ❖ **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<sub>A</sub>= 7,2), qui est par ailleurs un des trois grands mécanismes permettant le maintien du pH sanguin.

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

## 10. Préparation De L'échantillon:

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

➤ On partage ce volume sur 2 tubes:

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

➤ Préparation de suspension de travail:

- 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 travail.
- 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.
- On ajoute le tampon PBS dans le même tube.
- Mélanger doucement  $\implies$  c'est la suspension cellulaire mère de travail.

Préparation des suspensions cellulaires: On prélève à l'aide d'une pipette

- 19.4 ml T.PBS on ajoute 0.6 ml suspension mère.
- Au total on a un volume de 20 ml, c'est la solution fille de travail.
- On prépare 8 tubes (les points testes) correspondants au temps (T0 min, T30min, T45min, T90min) de dosage dont on va faire nos lectures.

- { T0
- { T0+G
  
- { T30
- { T30+G
  
- { T45
- { T45+G
  
- { T90
- { T0+G

➤ On prend deux béchers propres:

Dans le premier : 10 ml de solution fille.

Dans le deuxième : 10 ml de solution fille + 75  $\mu$ L de Glucantime (dilué au 1/10) pour la 1<sup>er</sup> dose et 100 $\mu$ l pour la 2em dose.

- On pose les 2 béchers sur un agitateur magnétique et on lance le chronomètre.
- A chaque point test : on prélève de chaque bécher 2 ml de suspension cellulaire puis on ajoute 3 ml de solution de lavage dans les 8 tubes déjà préparés.
- Centrifugation pendant 5 minutes à vitesse maximale.
- En récupère le surnageant pour faire le dosage d'hémoglobine.
- Après on récupère le culot dans 1 ml de l'eau distillée.
- Vortex.

### **Détermination De La Concentration Du LDH:**

#### **Principe de la méthode :**

En guise de substrat, la méthode LDH utilise un tampon de L-lactate d'un pH de 9.4. La lactate déshydrogénase oxyde le substrat en présence de  $\text{NAD}^+$  afin de produire du pyruvate et du NADH qui absorbe a 340nm. La concentration d'activité de la lactate déshydrogénase est

mesurée en tant que réaction cinétique à 340/700nm, proportionnelle à la quantité de lactate déshydrogénase présente dans l'échantillon.

La méthode de la lactate déshydrogénase (LDH) est un test de diagnostic in vitro pour la mesure quantitative de la lactate déshydrogénase totale dans le plasma et le plasma humains sur le système de chimie clinique Dimension®.

Après avoir vortexer les tubes à l'aide d'une micropipette on prélève 50µl de la suspension cellulaire correspondant au 8 tubes dans la première partie et on ajout 450 µl de l'eau distillée on va faire la lecture dans LDH automate.

### **Détermination De La Concentration Du Potassium:**

Après lyse le culot → lecture par l'ionogramme.

### **Détermination De La Concentration Des Protéines Totales:**

#### **Préparation du blanc:**

#### **Par méthode de Lowry:**

1ml de Biuret+200 µl d'eau distillée en attente 20 min après on ajoute 150 µL de folin (1N) en attente 20 min → lecture à 730 nm.

#### **Préparation des échantillons:**

On procède sur les mêmes échantillons témoins (T0/T30/T45/T90) et échantillons avec Glucantime (T0+G/T30+G/T45+G/T90+G):

1 ml de Biuret+ 200 µl échantillon en attente 20 min après on ajoute 150 µl de folin (1N) en attente 30 min → lecture à 730 nm.

### **+ Détermination De La Concentration D'hémoglobine:**

On répète les mêmes étapes que l'expérience précédente: Après préparation des 2 béchers : suspension témoin et suspension avec Glucantime, on prépare 8 tubes correspondant au 4 temps (T0min, T30min, T45min, T90min) de dosage dont on va faire nos lectures. On récupère le surnageant où on va faire la lecture des concentrations dans le spectrophotomètre a 540 nm.

# *Chapitre 2 :* *Résultats*

Toutes les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions de travail; en milieu tamponné TPBS PH=7.4 et à T° ambiante.

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

## 1. Les tests à dose = 75 $\mu$ l :

### A. LDH:

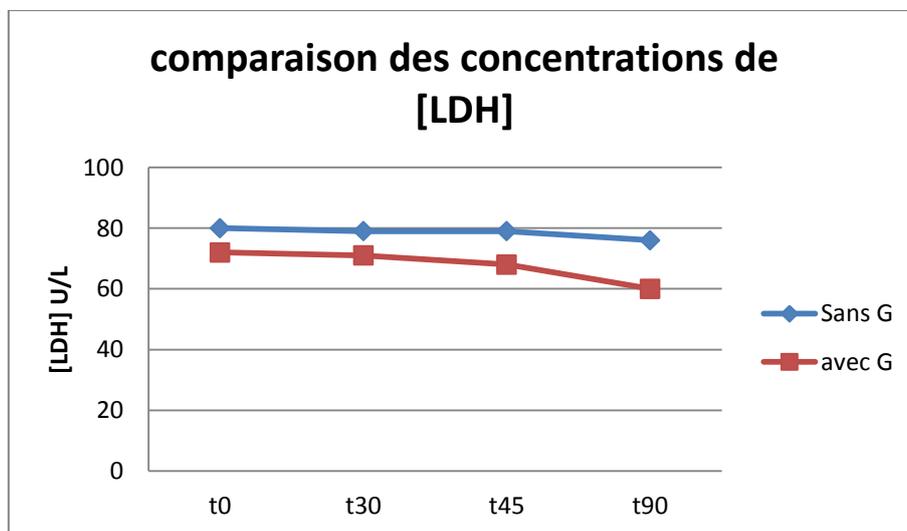


Figure 23: Test 01 [LDH]

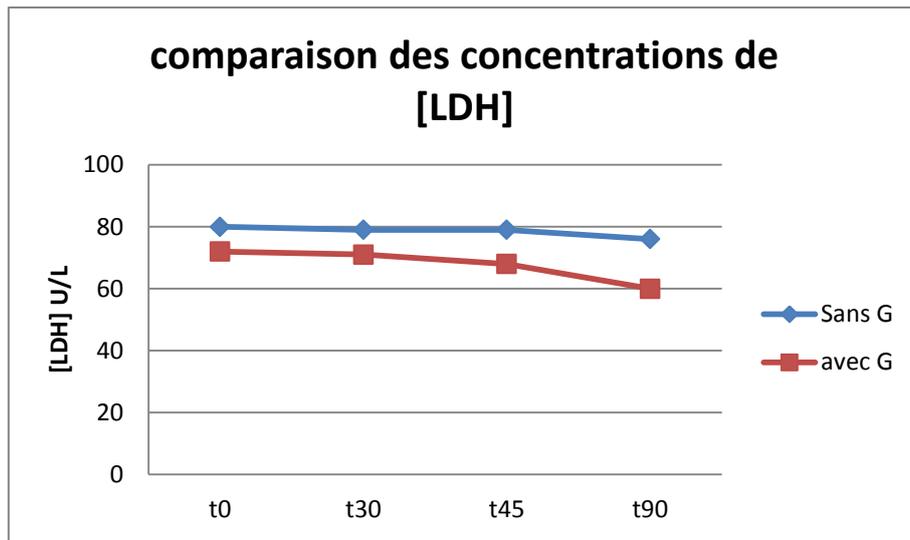


Figure 24: Test 02 [LDH]

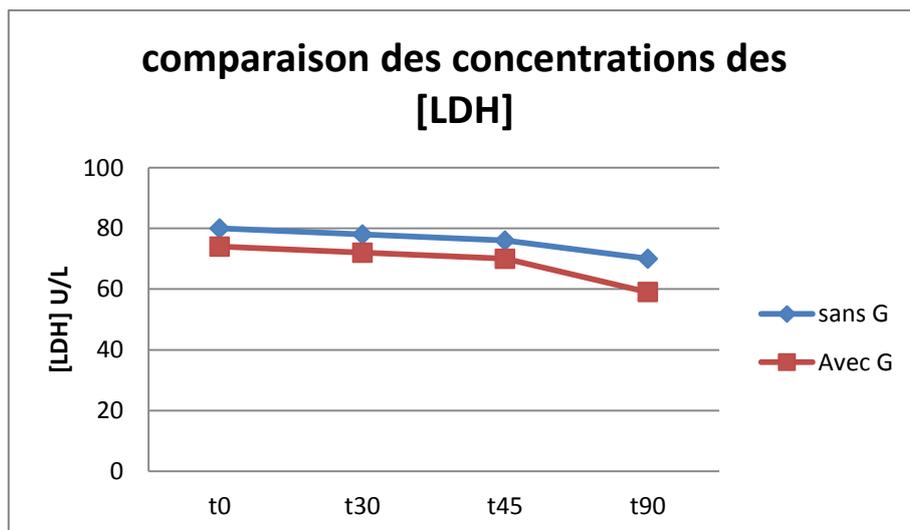


Figure 25: Test 03 [LDH]

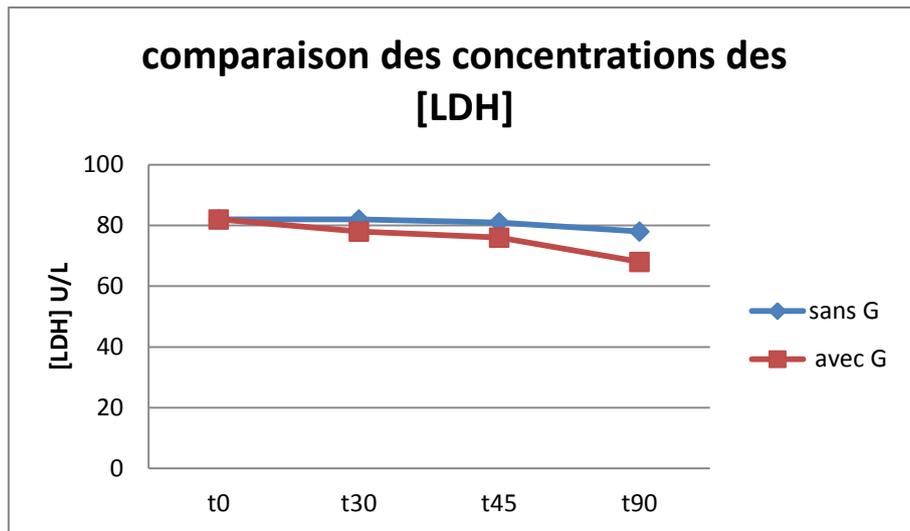


Figure 26: Test 04 [LDH]

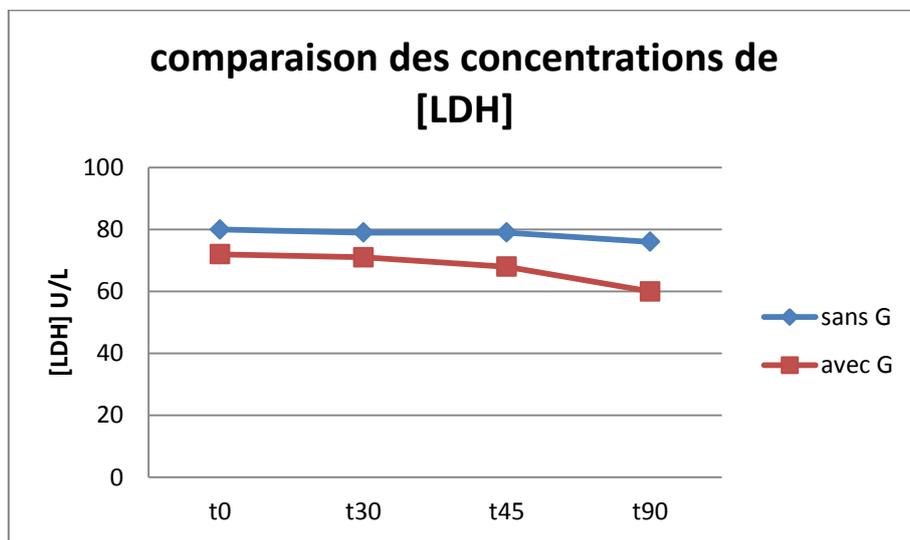


Figure 27: Test 05 [LDH]

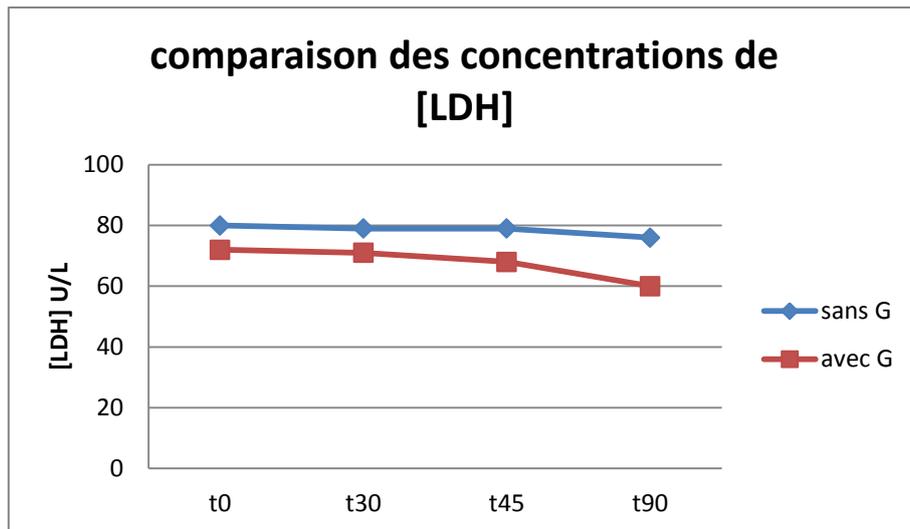


Figure 28: Test 06 [LDH]

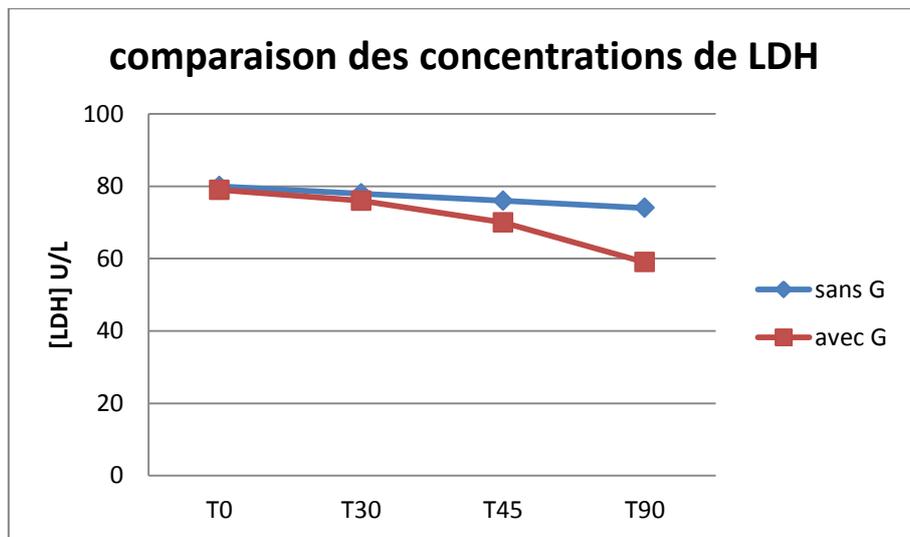


Figure 29: Test 07 [LDH]

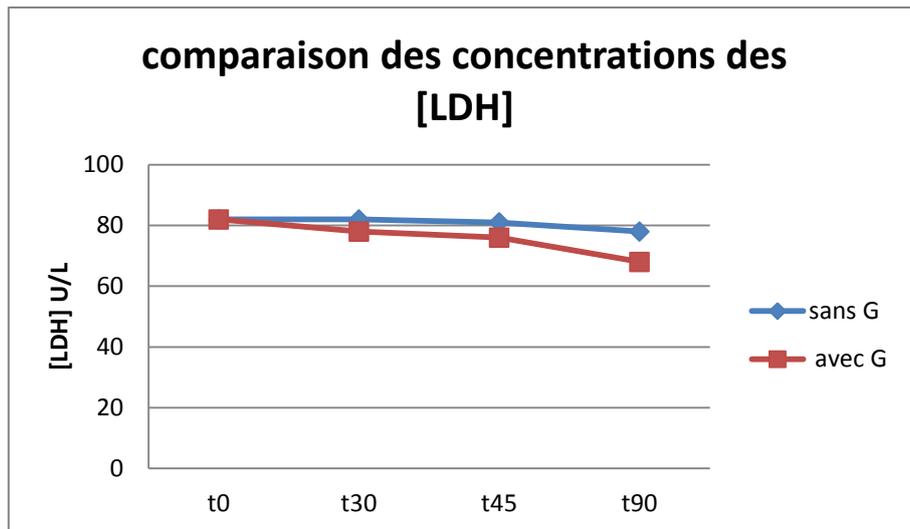


Figure 30: Test 08 [LDH]

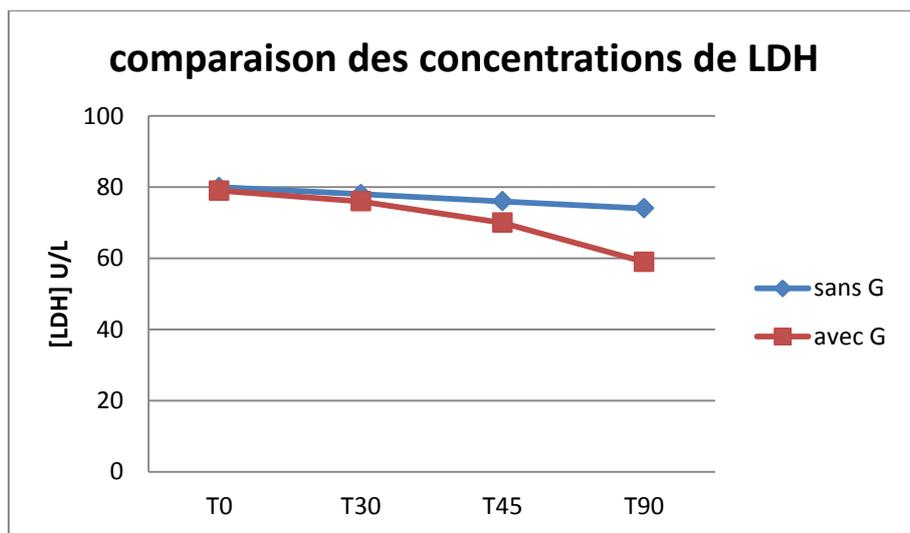


Figure 31: Test 09 [LDH]

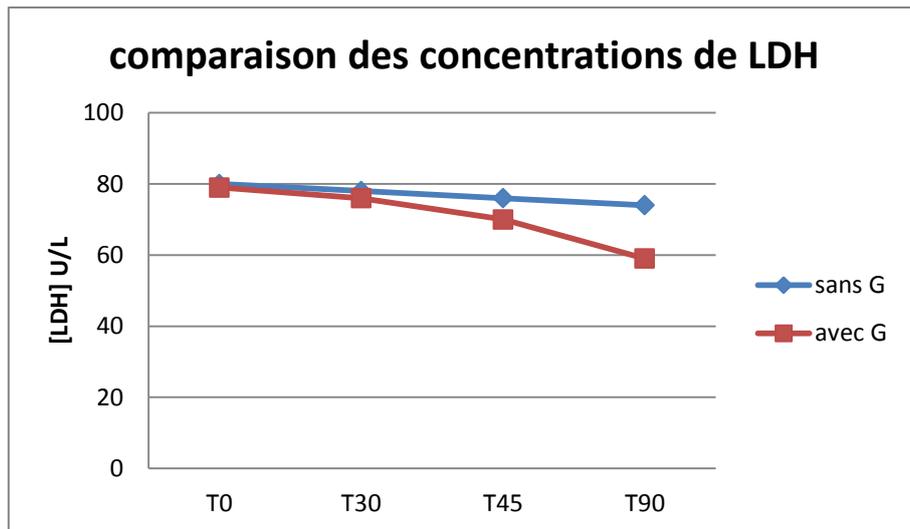


Figure 32: Test 10 [LDH]

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

A **T30 et après 45 minutes** on a remarqué que la concentration intracellulaire 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 LDH a encore diminué dans les deux suspensions cellulaires et cette diminution est beaucoup plus dans celle qui contient la molécule.

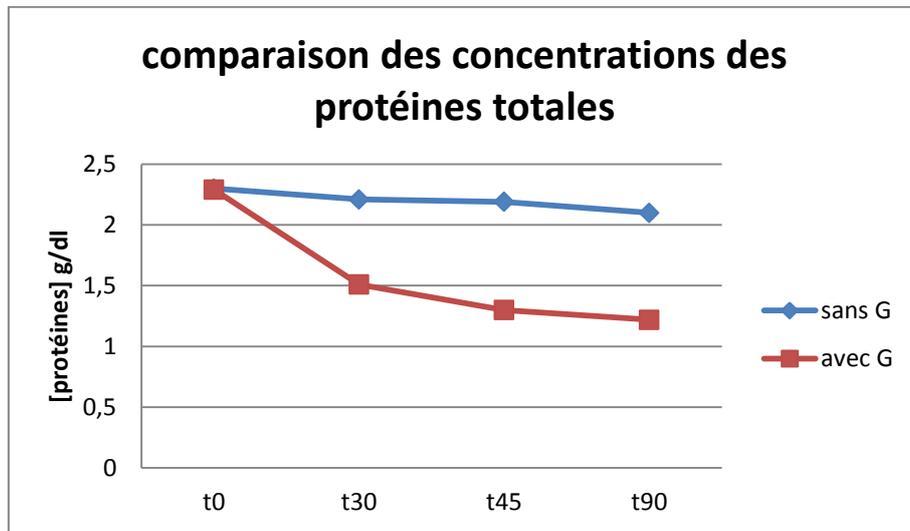
**B. Les protéines totales:**

Figure 33: Test 01 [protéines]

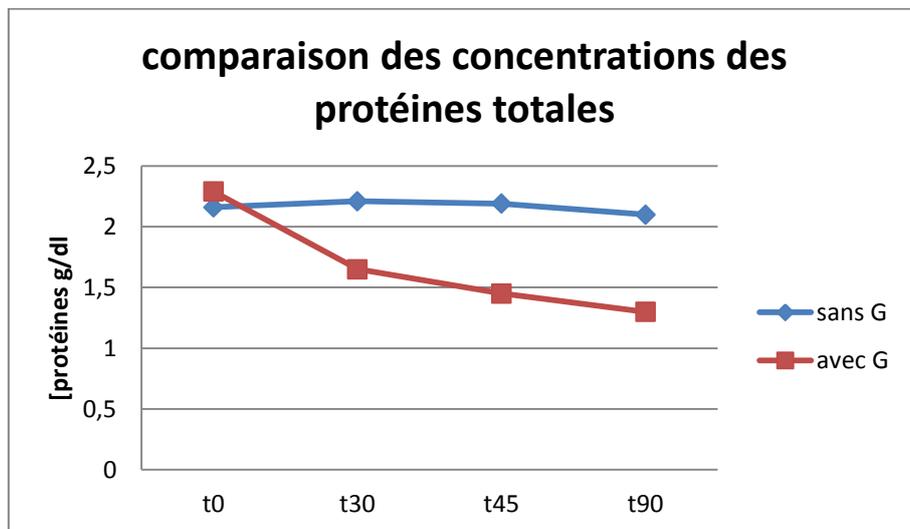


Figure 34: Test 02 [protéines]

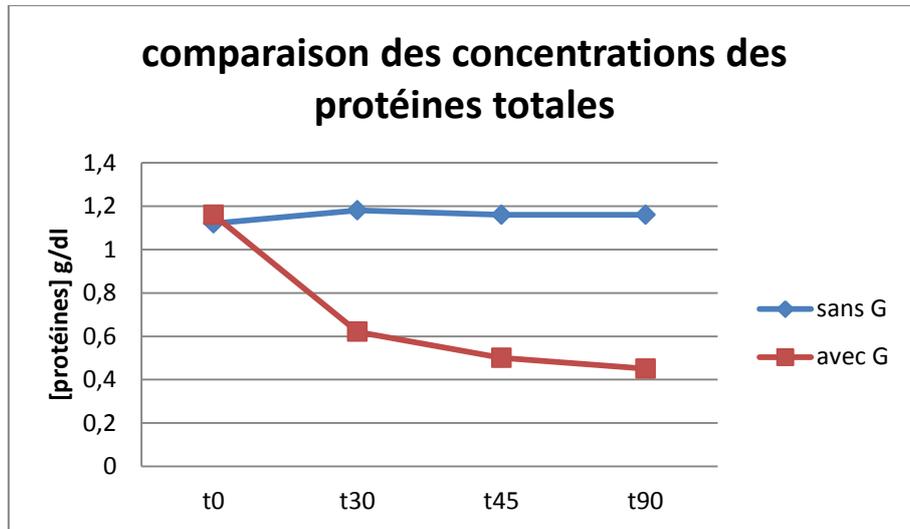


Figure 35: Test 03 [protéines]

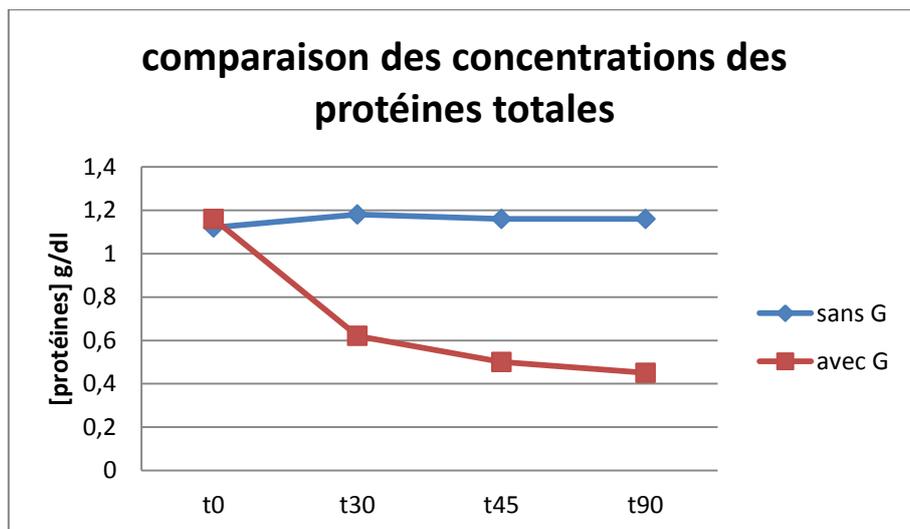


Figure 36: Test 04 [protéines]

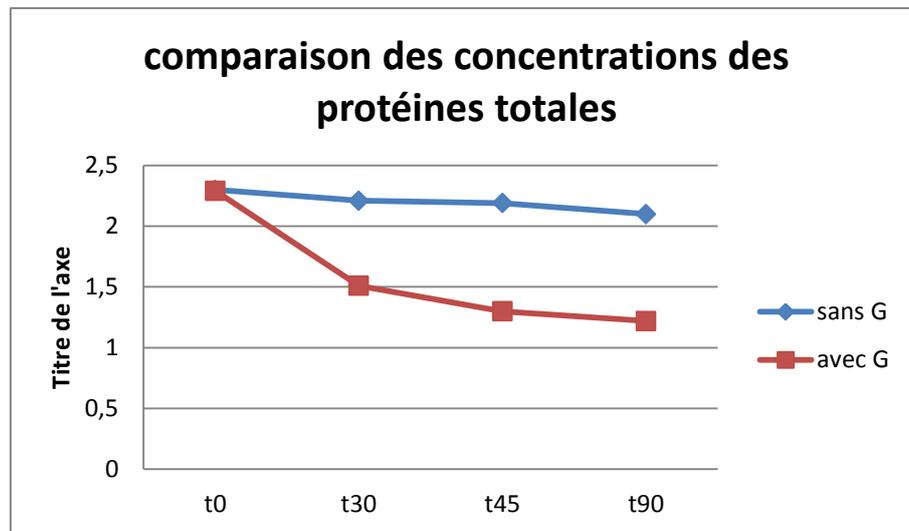


Figure 37: Test 05 [protéines]

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.

### C. Potassium :

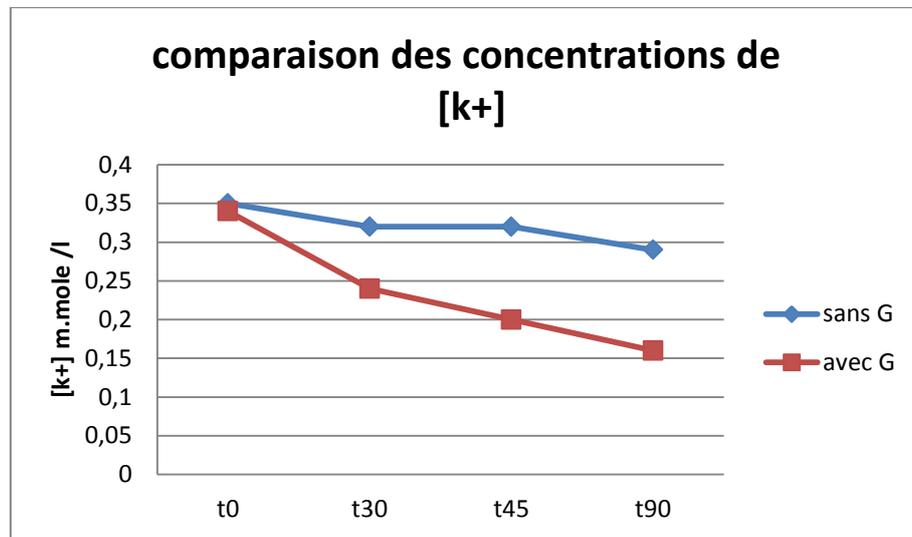


Figure 38: Test 01 [K+]

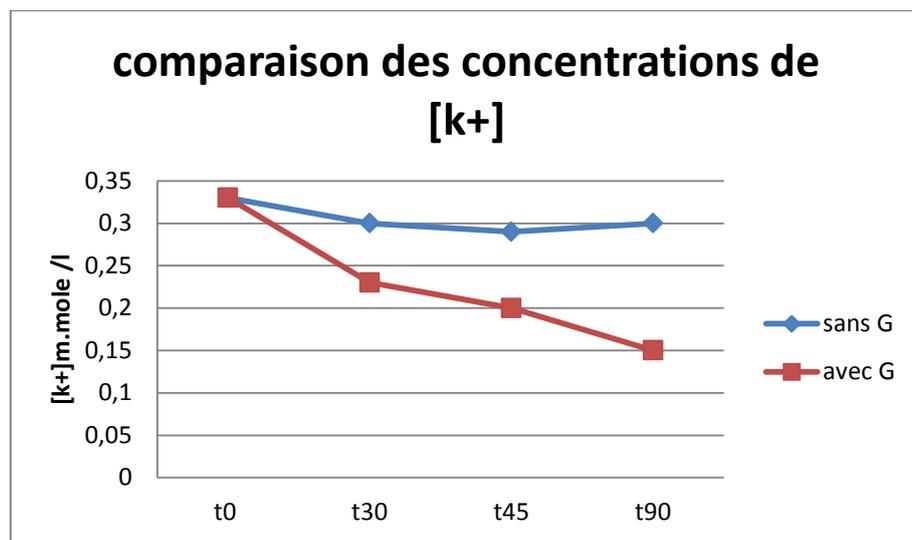


Figure 39: Test 02 [K+]

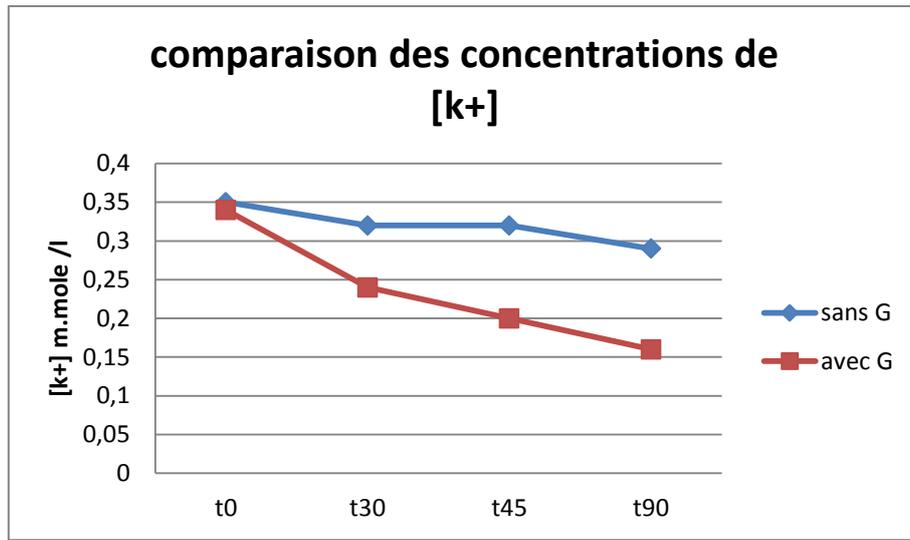


Figure 40: Test 03 [K+]

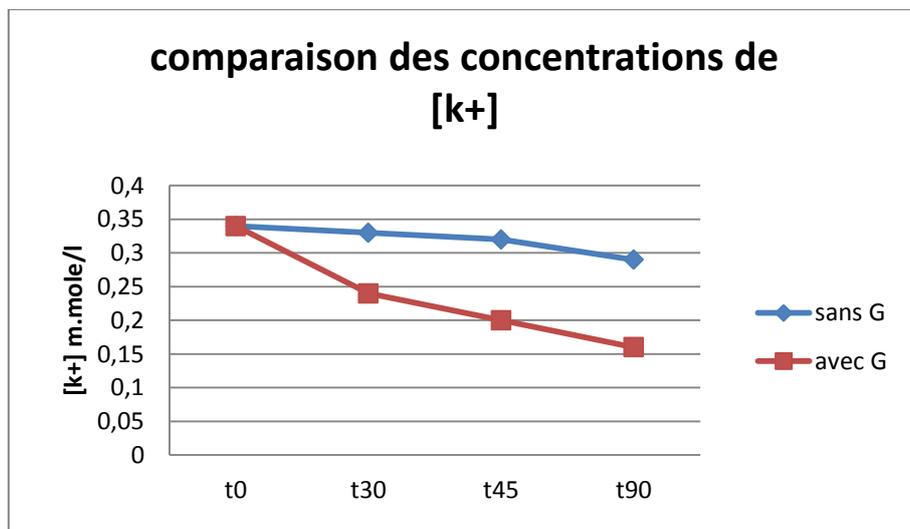
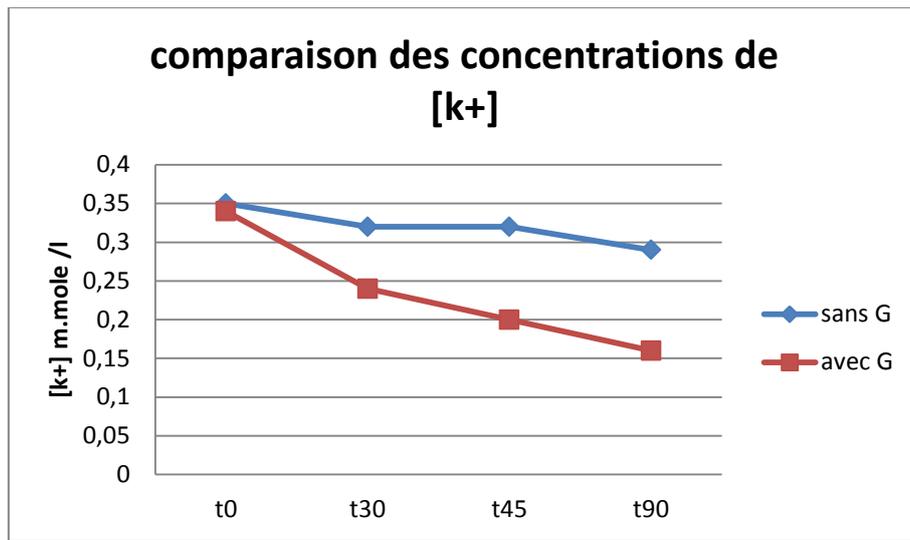
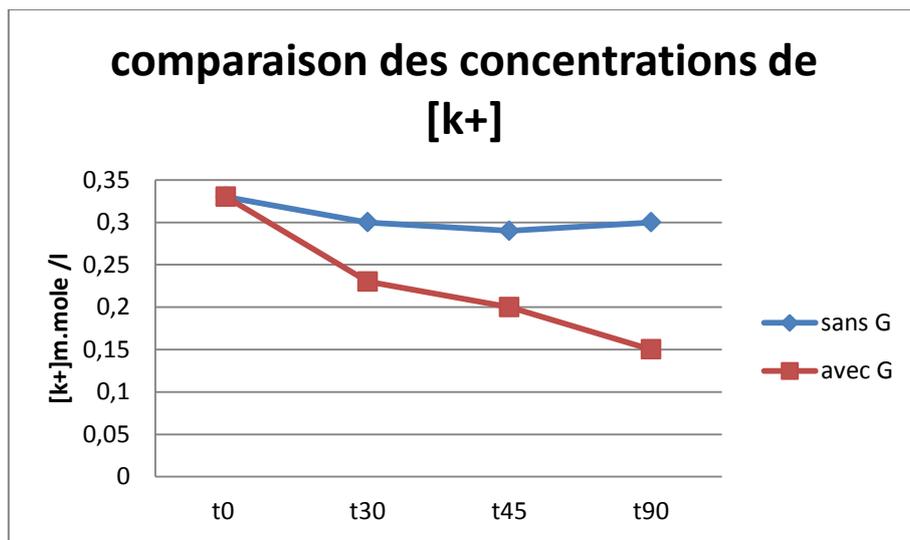


Figure 41: Test 04 [K+]

Figure 42: Test 05 [K<sup>+</sup>]Figure 43: Test 06 [K<sup>+</sup>]

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

**A T30 et après 45 minutes** on a remarqué que la concentration intracellulaire en potassium 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 a encore diminué dans les deux suspensions cellulaires et cette diminution est beaucoup plus dans celle qui contient la molécule.

**D. Hémoglobine:**

Calcule le taux de HB dans 2ml de suspension cellulaire.

Le pourcentage d'hémolyse:

0.26 : c'est l'hémolyse totale

0.26  $\longrightarrow$  100%

HB  $\longrightarrow$  %

- **Pourcentage d'hémolyse des testes:**

**Tableau 4: Pourcentage D'hémolyse Des Testes.**

	T30	T30	T45	T45	T90	T90
	Sans G	Avec G	Sans G	Avec G	Sans G	Avec G
1	20	21	21	26	26	35
2	19	29	21	30	26	34
3	19	19	20	20	20	36
4	24	31	25	32	22	36
5	21	26	22	29	27	34

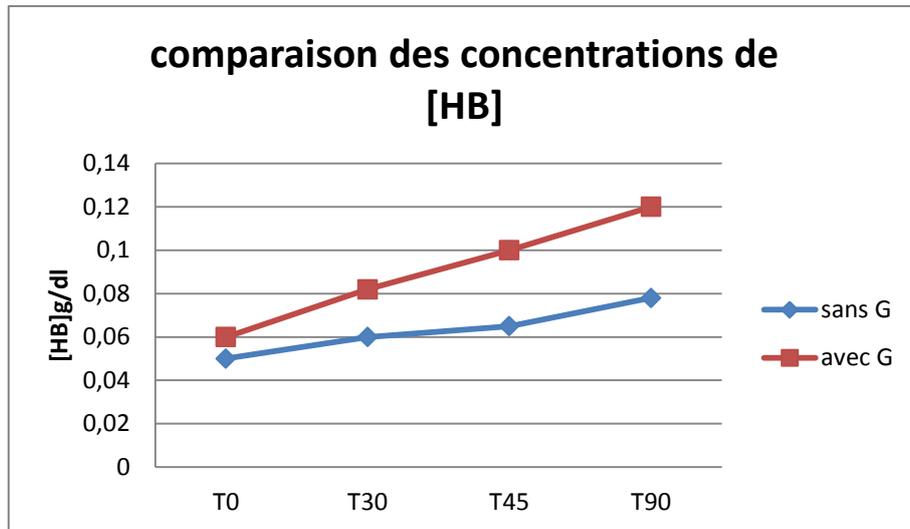


Figure 44: Test 01 [HB]

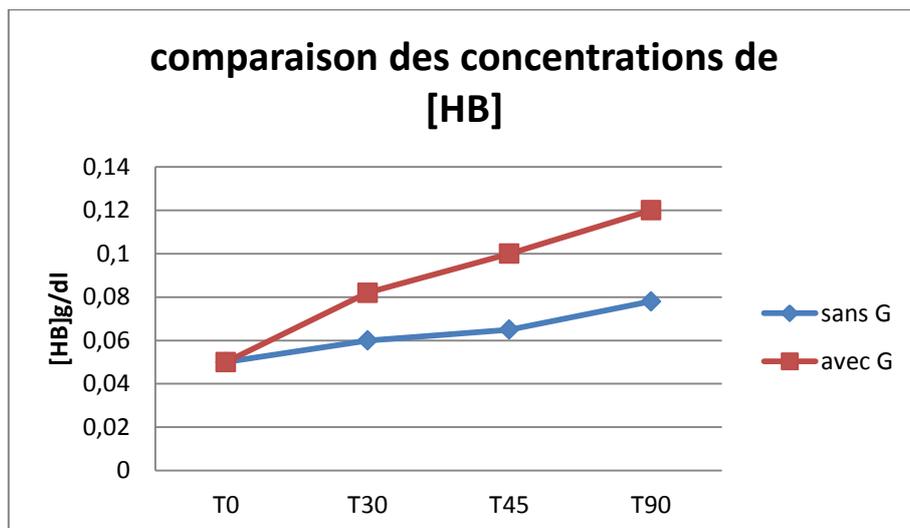


Figure 45: Test 02 [HB]

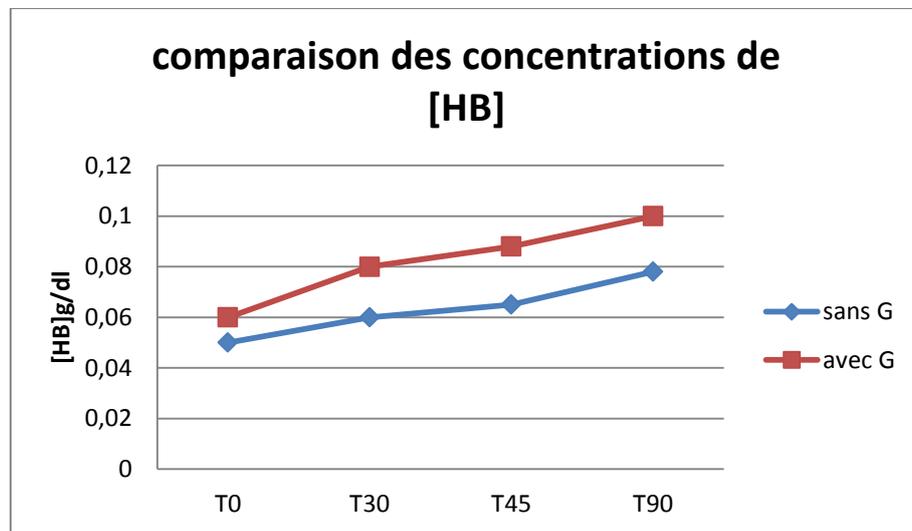


Figure 46: Test 03 [HB]

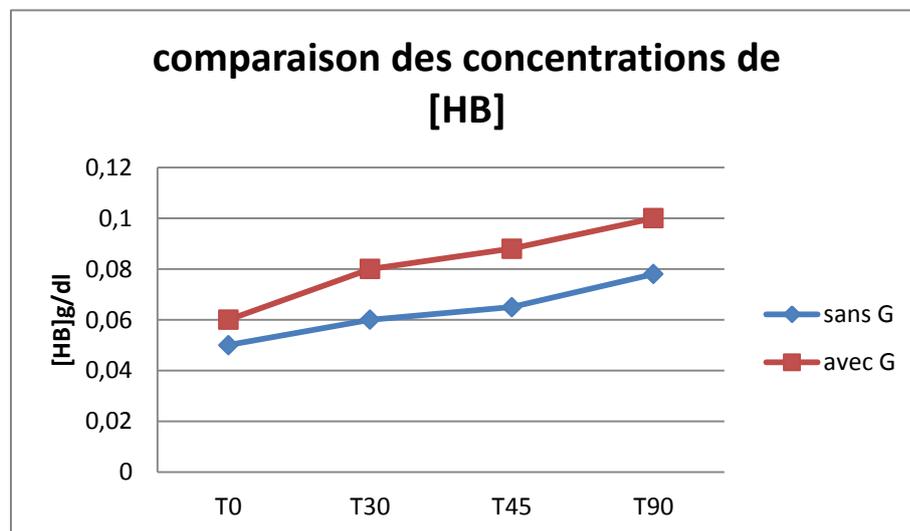


Figure 47: Test 04 [HB]

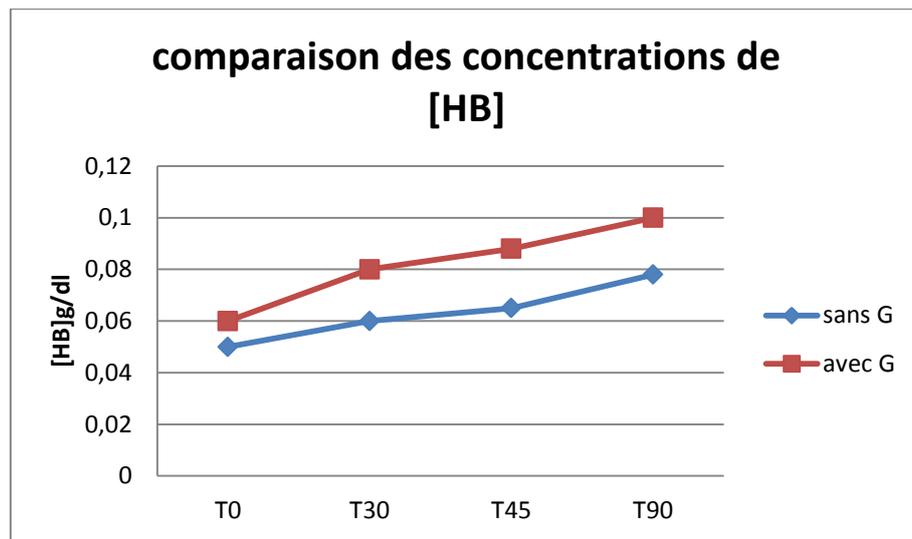


Figure 48: Test 05 [HB]

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

A **T 30 et après 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.

## 2. Les tests à dose = 100 $\mu$ l :

### A. LDH :

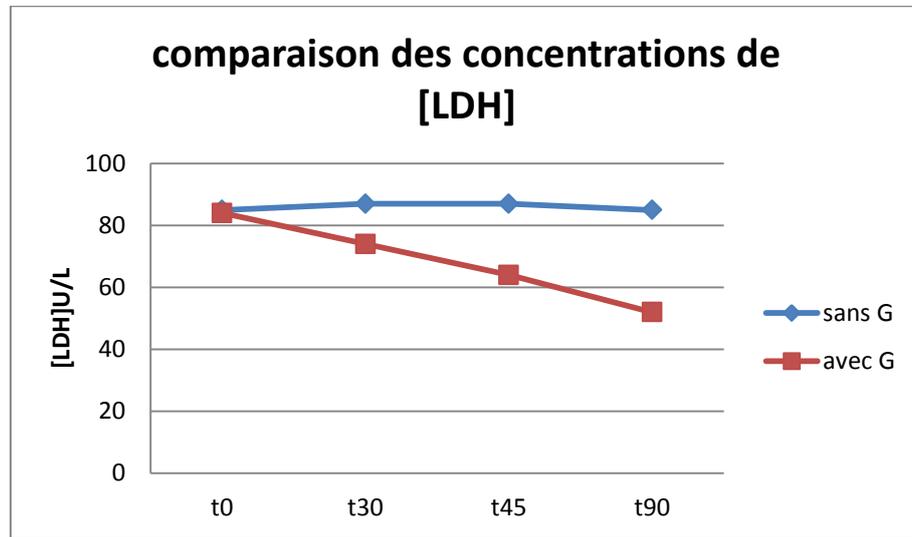


Figure 49: Test 01 [LDH]

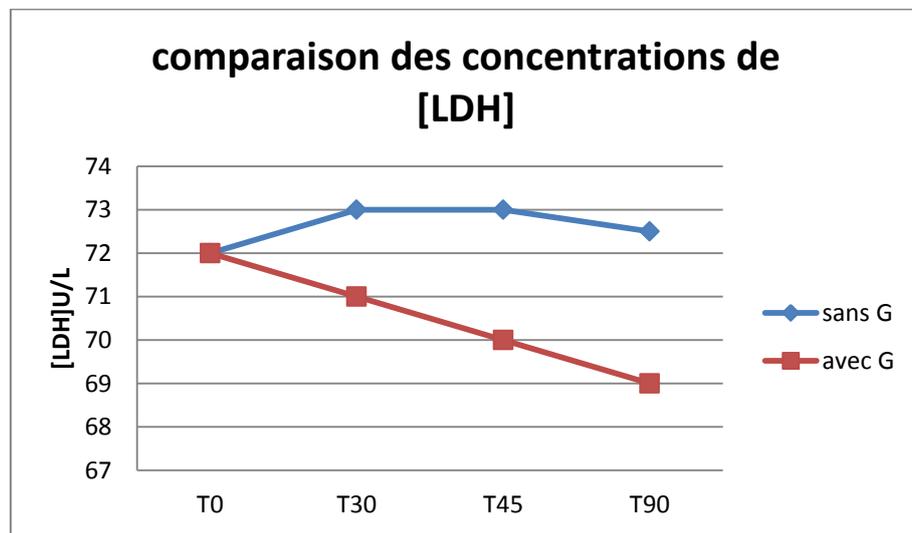


Figure 50: Test 02 [LDH]

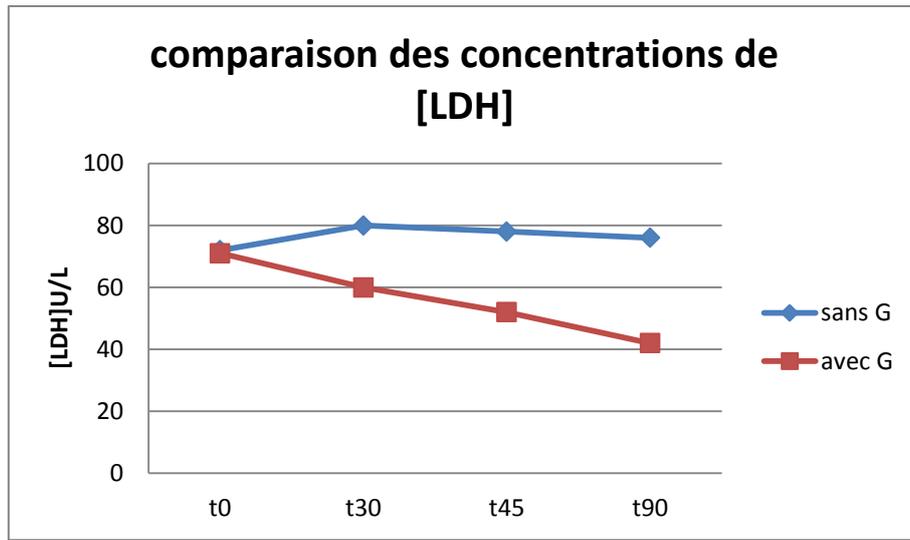


Figure 51: Test 03 [LDH]

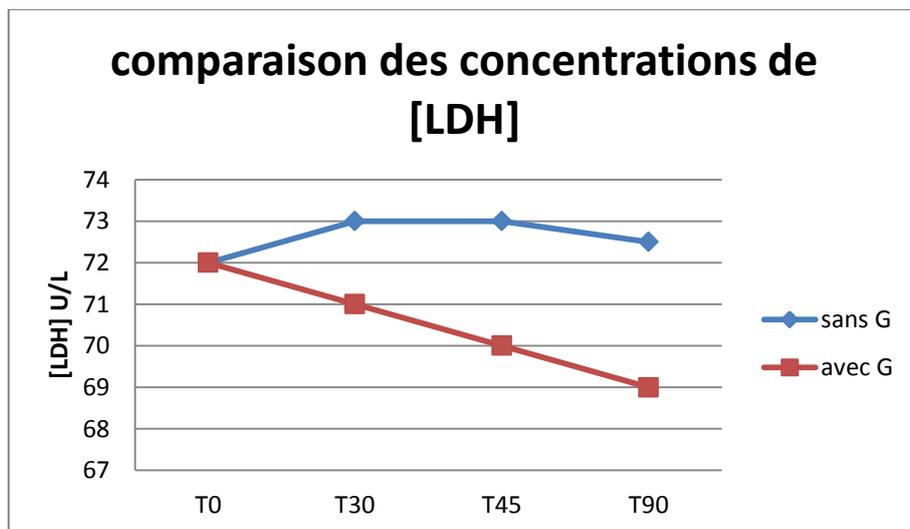


Figure 52: Test 04[LDH]

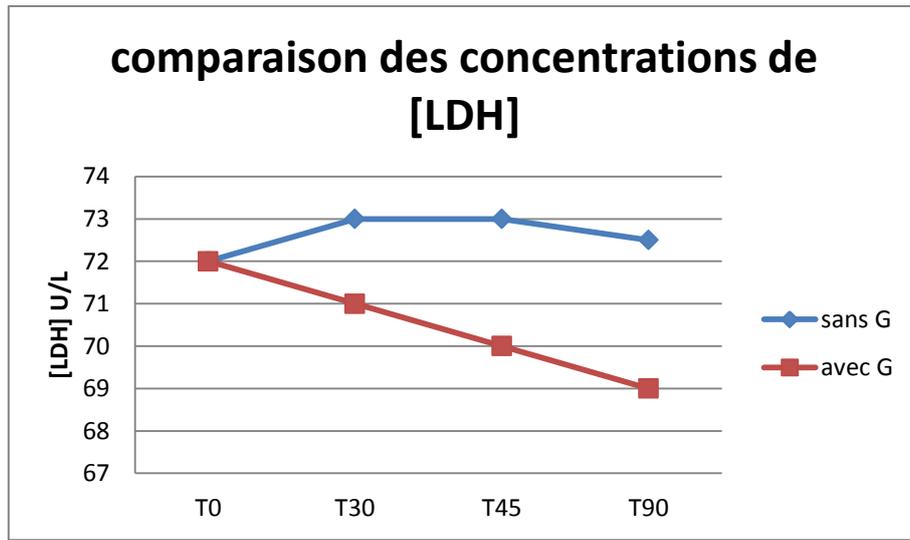


Figure 53: Test 05 [LDH]

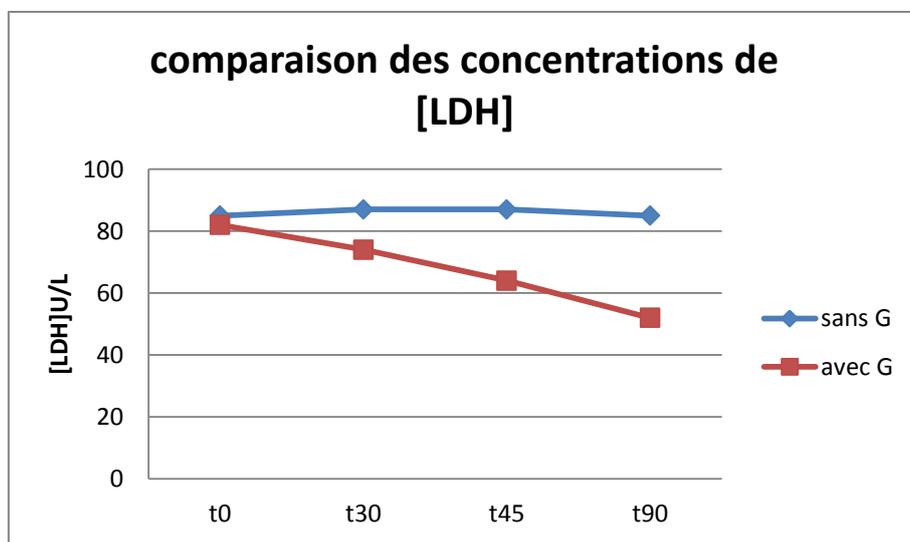


Figure 54: Test 06 [LDH]

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

A **T30 et après 45 minutes** on a remarqué que la concentration intracellulaire en LDH a diminuée dans la suspension cellulaire qui est au contact avec la molécule par rapport à T0.

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

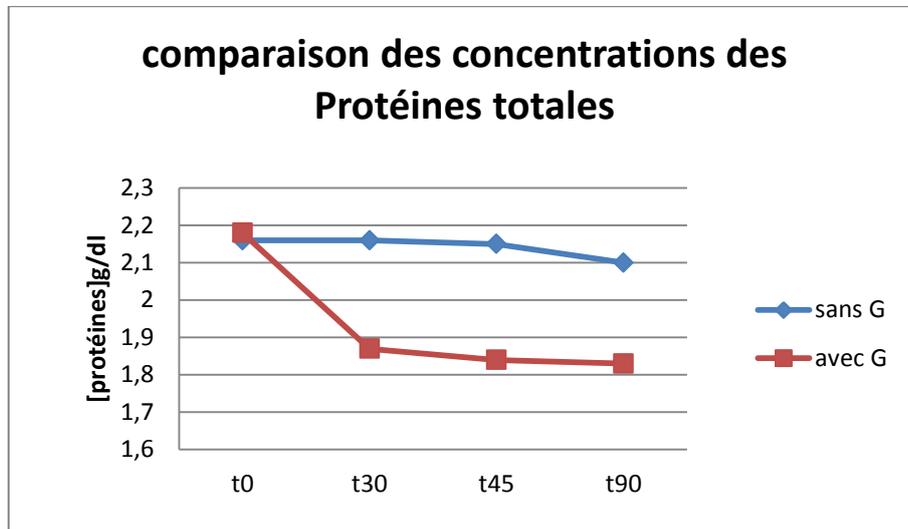
**B. Protéines totales:**

Figure 55: Test 01 [protéines]

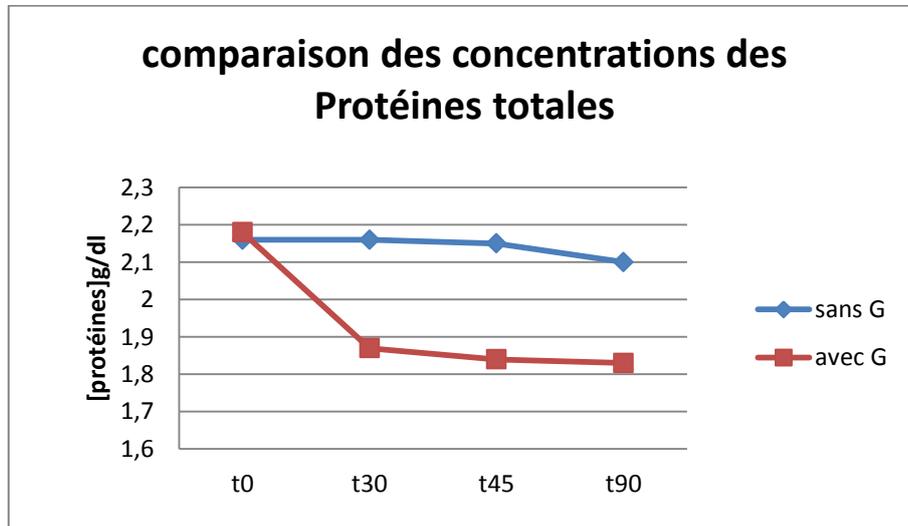


Figure 56: Test 02 [protéines]

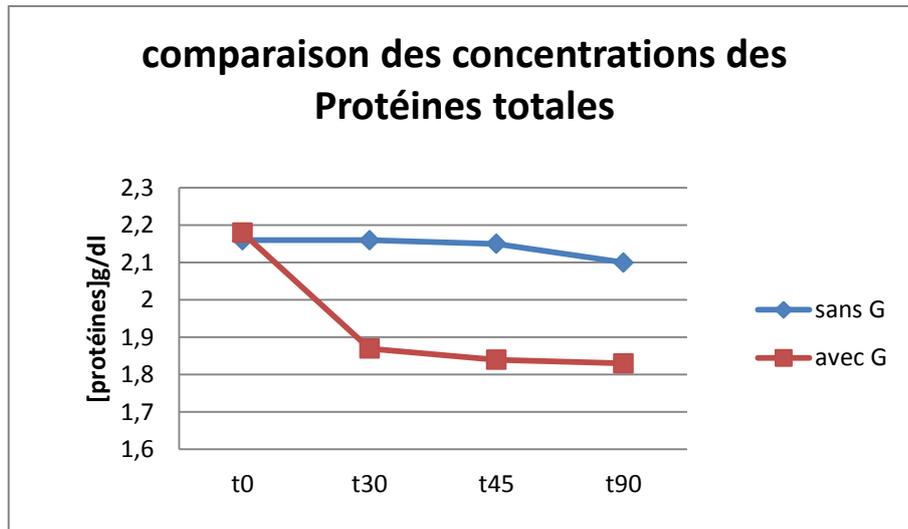


Figure 57 : Test 03 [protéines]

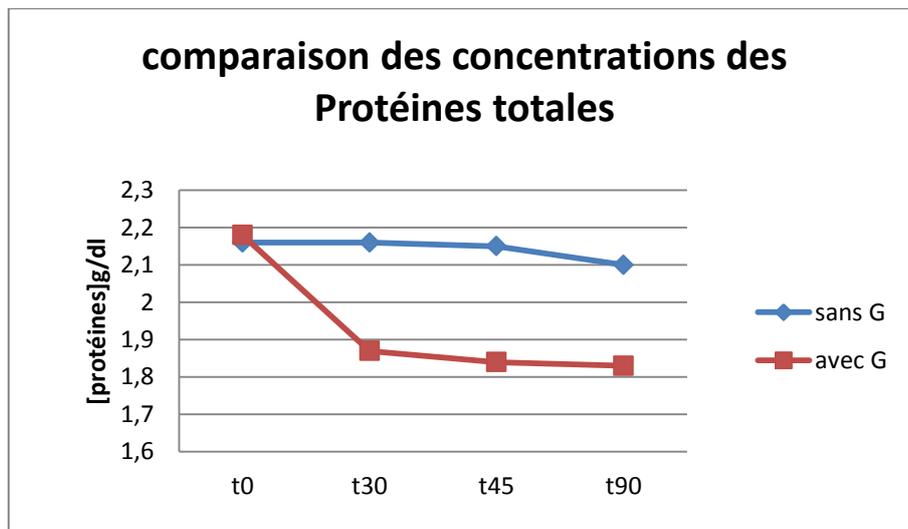


Figure 58: Test 04 [protéines]

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.

### C. Potassium:

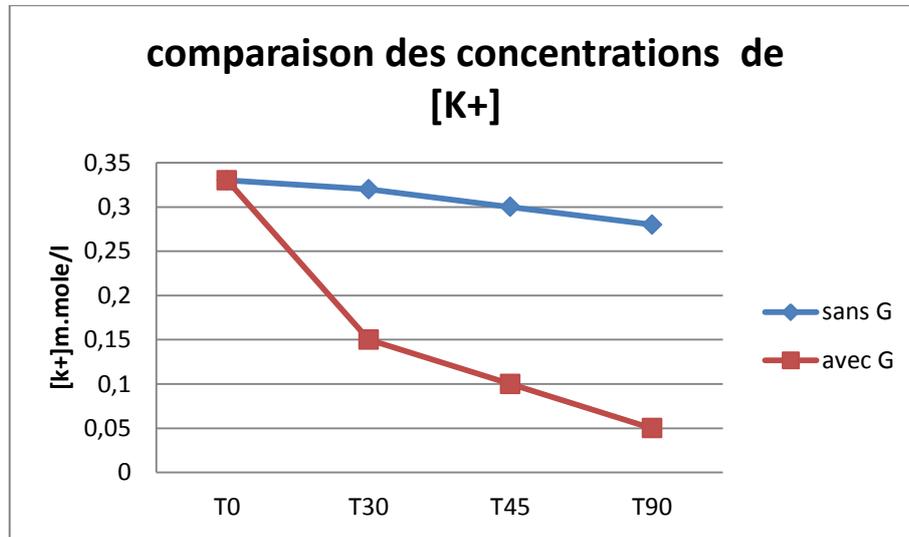


Figure 59: Test 01 [K<sup>+</sup>]

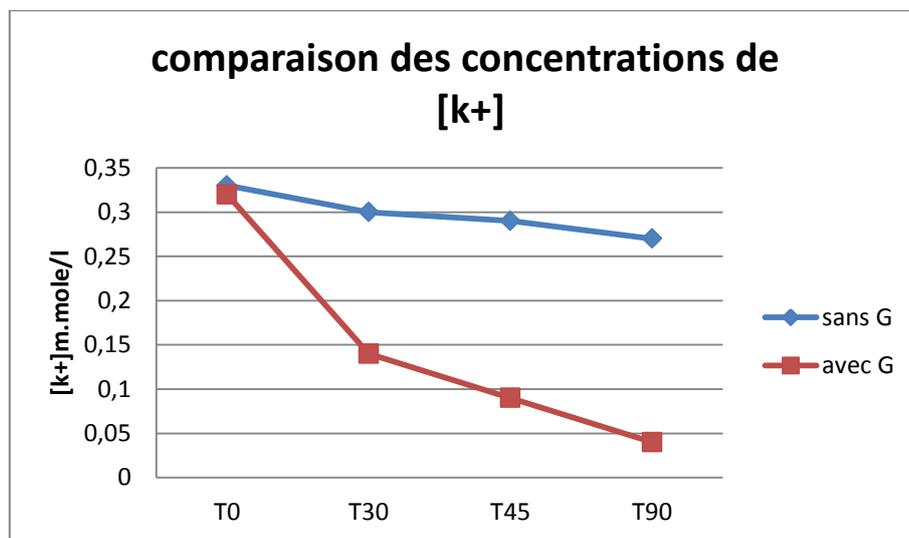


Figure 60: Test 02 [K<sup>+</sup>]

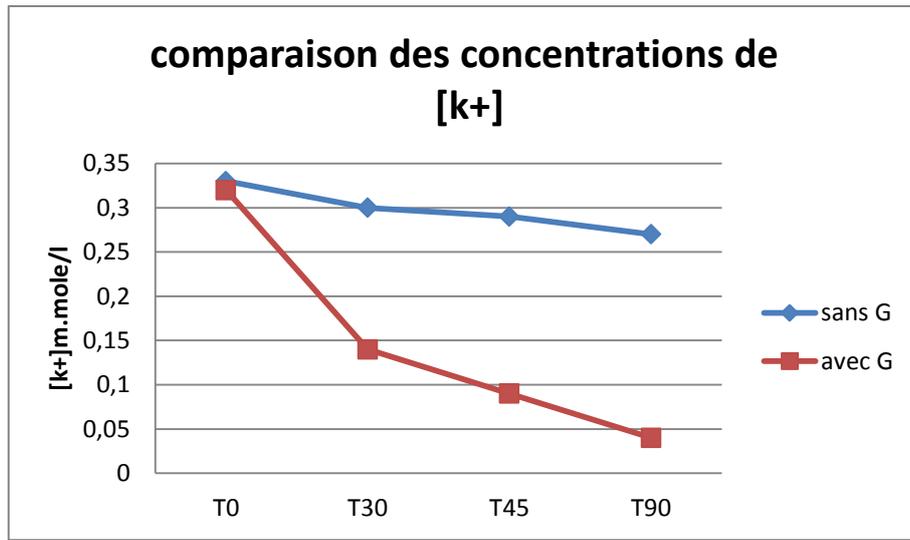


Figure 61: Test 03 [K+]

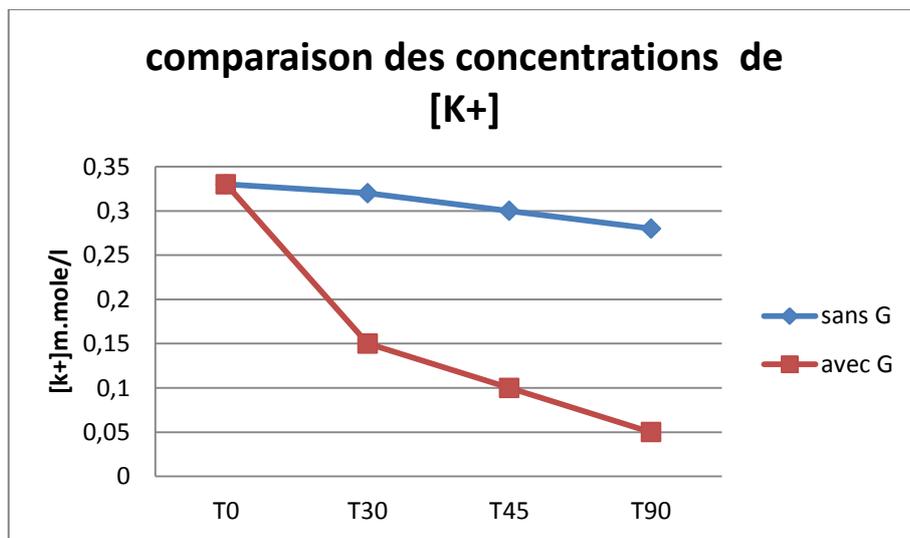
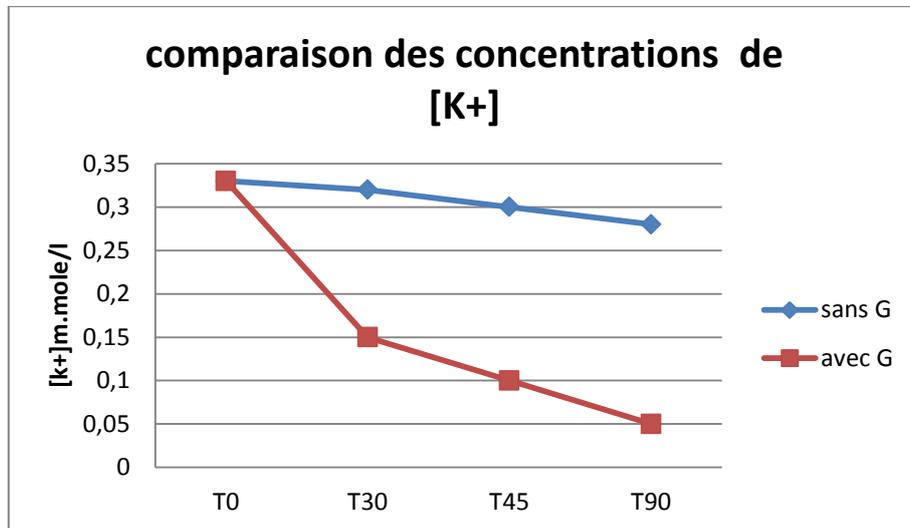


Figure 62: Test 04 [K+]

Figure 63: Test 05 [K<sup>+</sup>]

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

**A T30 et après 45 minutes** on a remarqué que la concentration intracellulaire en potassium a diminuée dans la suspension cellulaire qui est au contact avec la molécule par rapport à T0.

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

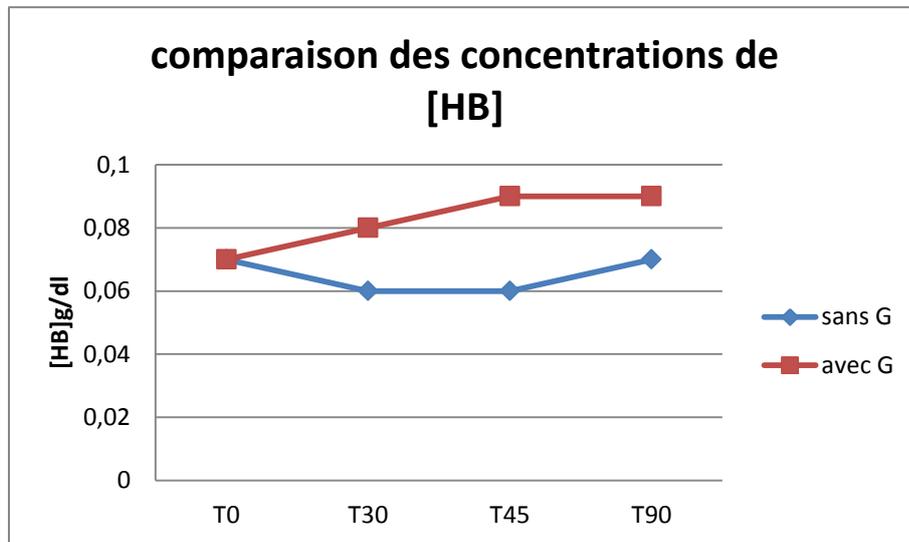
**D. Hémoglobine:**

Figure 64: Test 01 [HB]

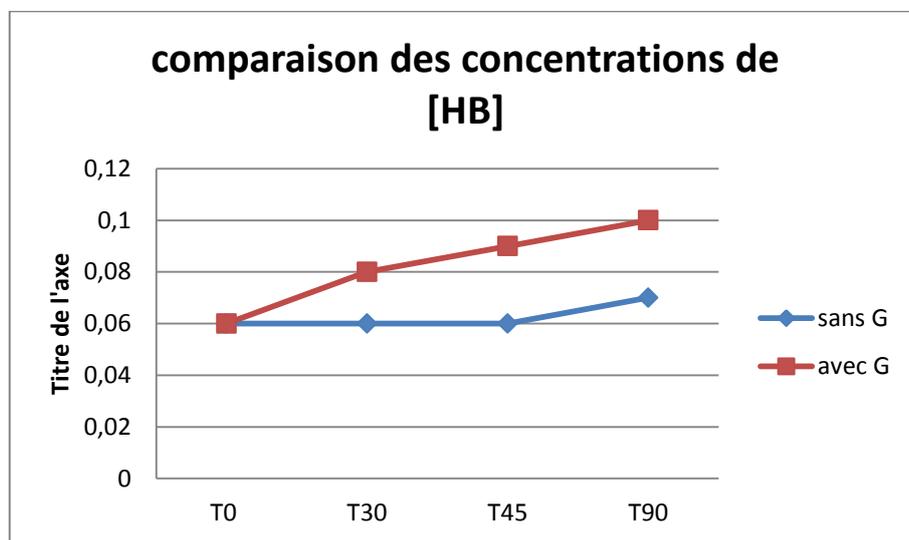


Figure 65: Test 02 [HB]

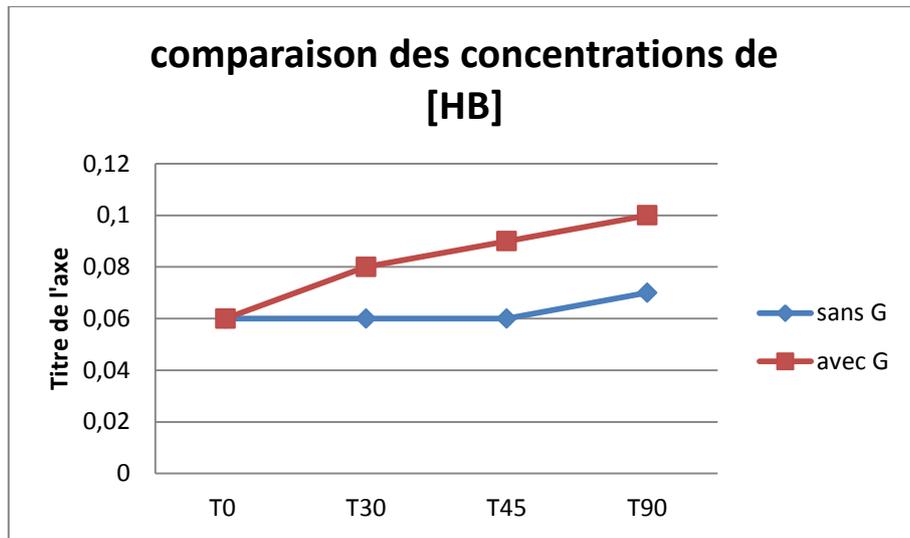


Figure 66: Test 03 [HB]

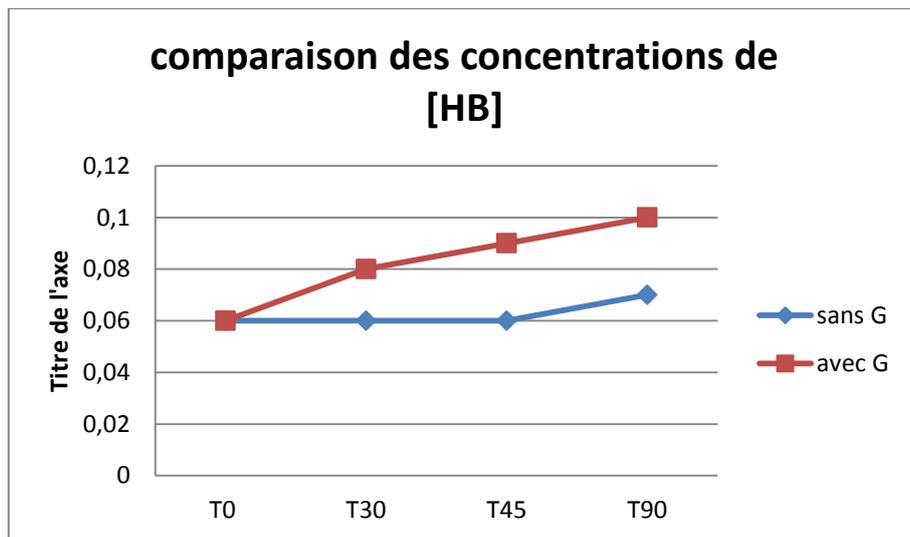


Figure 67: Test 04 [HB]

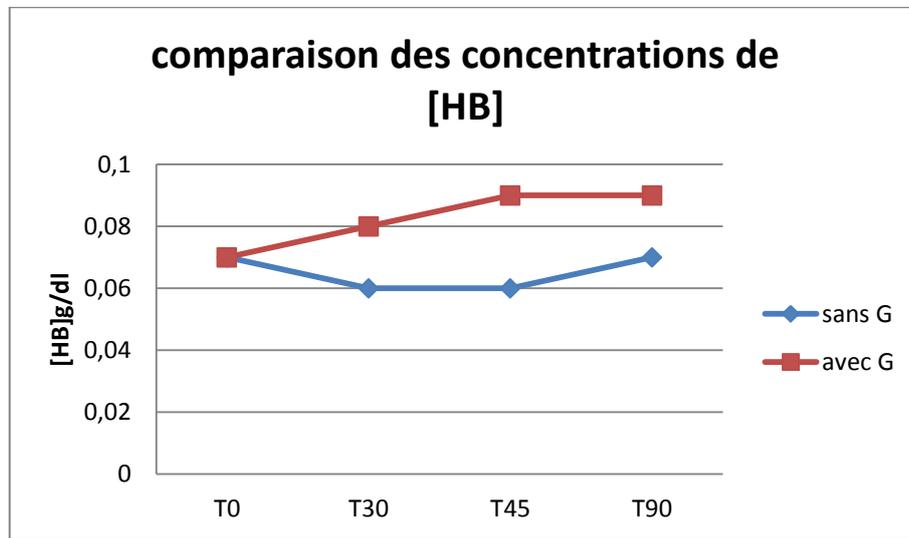


Figure 68: Test 05 [HB]

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

A **T 30 et après 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

### 3. Comparaison Entre La Dose 75 $\mu$ l Et La Dose 100 $\mu$ l:

#### A. LDH:

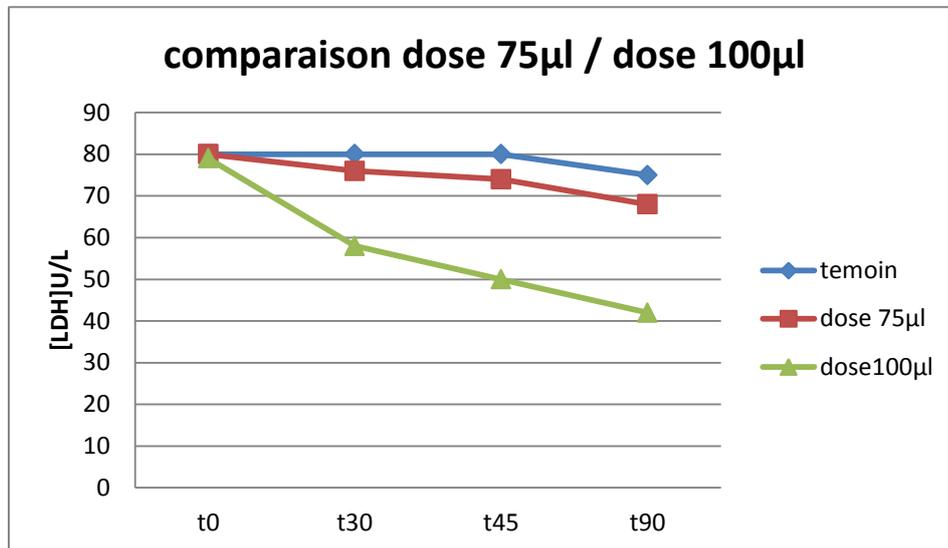


Figure 69: comparaison 1ere dose / 2eme dose.

#### B. Protéines totales:

#### C.

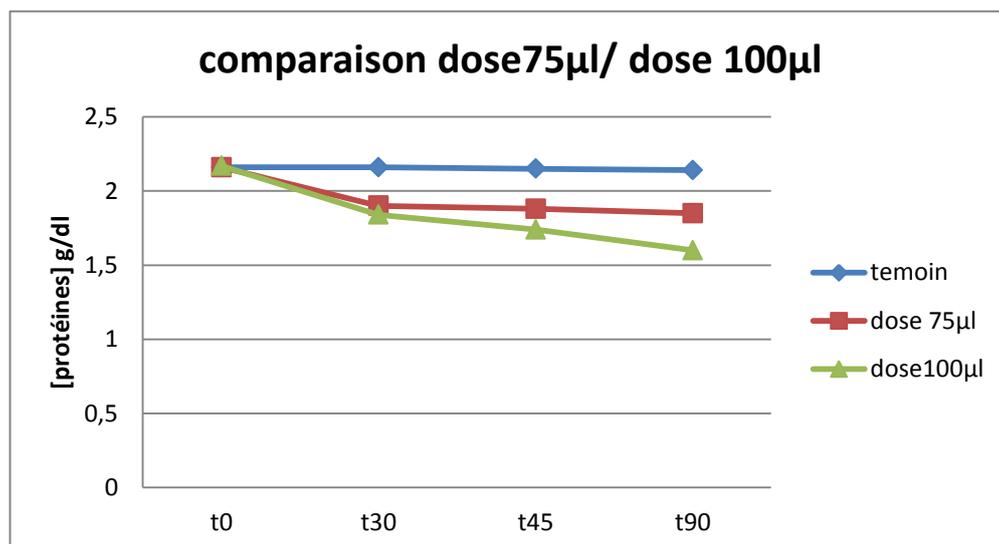


Figure 70: comparaison 1ere dose / 2eme dose

### C. Potassium:

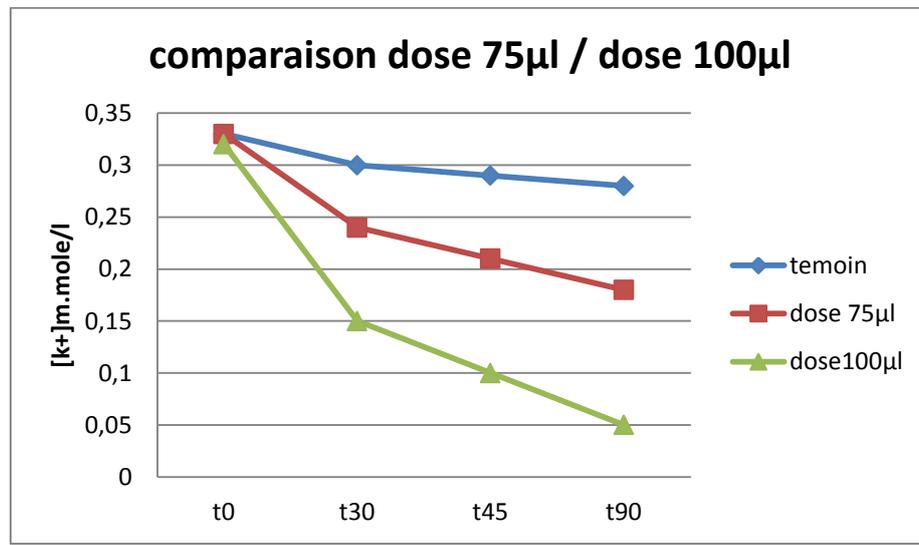


Figure 71: comparaison 1ere dose / 2eme dose

### D. Hémoglobine:

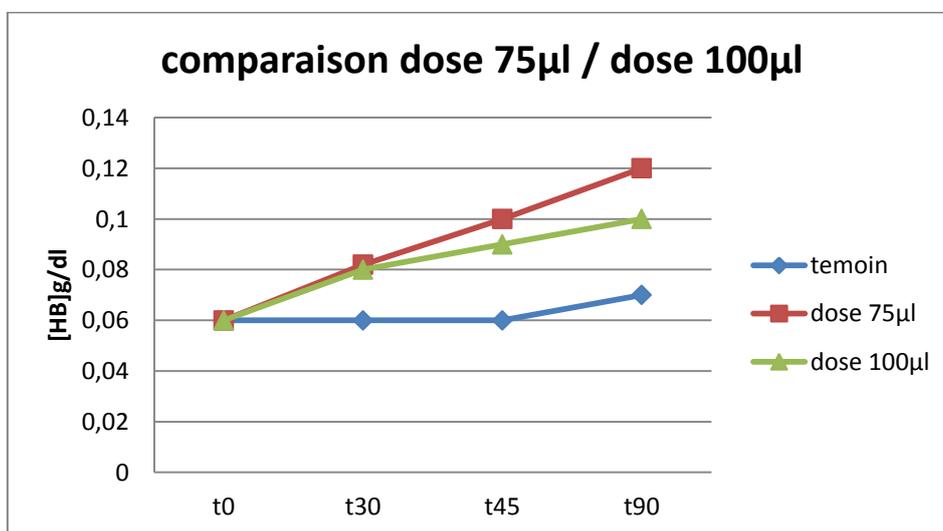


Figure 72: comparaison 1ere dose / 2eme dose

La comparaison entre la première dose (75 $\mu$ l) et la deuxième dose (100 $\mu$ l) nous a montré qu'il y a une grande différence pour la concentration intracellulaire en K<sup>+</sup>, HB, LDH et protéines.

# *Chapitre 3 :* *Discussion*

Notre travail a démontré à l'échelle moléculaire la toxicité du Glucantime à des doses thérapeutiques, en effet la molécule agit soit en bloquant la pompe  $K^+/Na^+$  ATPase, soit en lysant la membrane du globule rouge soit les deux.

Pour la dose 75  $\mu$ l on a remarqué une nette diminution de la concentration de LDH au cours du temps, qui peut être expliquée par une lyse de la membrane du globule rouge.

On a remarqué que même pour les protéines cellulaires la concentration diminue au cours du temps, Cette diminution du taux des protéines cellulaires peut s'expliquer par la lyse membranaire d'érythrocyte ce qui a favorisé la sortie des protéines.

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 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.

L'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.

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 30 minutes le taux moyen d'hémolyse été 25%, et il a continué d'augmenter après 45 minutes et 90 minutes (35 % des cellules sont hémolysées).

Et pour la dose 100 $\mu$ l, la diminution des concentrations des différents paramètres ( $K^+$ , LDH, protéines, HB) 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.

La comparaison entre la première dose 75µl et la deuxième dose 100µl nous a montré qu'il y a une grande différence pour les concentrations des différents paramètres (K<sup>+</sup>, LDH, protéines, Hb).

Au moment d'administration de la molécule, la concentration en potassium et en LDH et HB et Protéines était presque la même pour les deux suspensions cellulaires (témoin et avec la molécule) et pour les deux doses (75µl et 100µl). Alors on constate que le Glucantime n'a pas une action direct dès son contacte avec la suspension cellulaire. Donc en augmente la dose la toxicité de la molécule augmente.

Pour renforcer les résultats, on a calculé le rapport [K<sup>+</sup>]/ [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)

Cela veut dire que le Glucantime a un effet toxique sur le globule rouge:

- Soit en agissant sur la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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).

Nos résultats sont comparables à ceux trouvés par Mr.belhachem A et son collègue Mr.mansour benaouf Y. fait durant l'année 2013 au CHU de Tlemcen.

Leurs résultats ont démontrés que la molécule agit en lysant la mb d'érythrocytes. Et on bloquant la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase se qui favorise la sortie du **LDH, K<sup>+</sup>, HB, Protéines**.

La lyse était plus importante avec la dose la plus élevée avec sortie du K<sup>+</sup>, du LDH, du HB et du Protéines et que cette lyse est proportionnelle à la dose du Glucantime administrée.

[23]

*Conclusion*

Malgré les effets toxiques de la molécule, le Glucantime® reste le traitement de 1<sup>er</sup> intention 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.

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: ( 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 qui reste confirmer par une répétition de nombre encore plus élevé d'expérience en espèrent de trouvé une dose moins toxique tout gardent la sensibilité de la molécule.

*Références  
Bibliographiques*

- [1] . Guillaume-Signoret M. Une protéine parasitaire de leishmania, cible thérapeutique potentielle. Institut de recherche pour le développement. 2006, Fiche n°234.
- [2] . Dedet Leishmanies, leishmanioses :biologie, clinique et thérapeutique. EMC (Elsevier Masson SAS,Paris), Maladies infectieuses, 8-506-A-10, 2009.
- [3] . AubryP. Leishmanioses, diplôme de médecine tropicale des pays de l'océan indien, 2012, P 01-08.
- [4] . Benyahia D. Mise au point de la leucocytoconcentration et son application dans le diagnostic de la leishmaniose canine et la leishmaniose viscérale humaine, mémoire de fin d'étude de résidanat en parasitologie mycologie médicale, 2008-2009.
- [5] . Minodier P, Noel G, BLANC P, Uters M, Retornakz K, GARNIER J M. Traitement des leishmanioses cutanées de l'adulte et de l'enfant. *Médecine tropicale* 2005, 65: 487- 495.
- [6].Tammy H. La leishmaniose viscérale infantile, à propos de 73 cas à Fès; mémoire d'obtention de doctorat en médecine,thèse N°089/11, Mai 2011.
- [7] . Laveran A, Mesnil F. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Laveran et Mesnil) parasite d'une fièvre de l'Inde. *CR Acad Sci* 1903;137:957-61.
- [8] . Pratlong F, Lanotte G. Identification, taxonomie et phylogénèse. In: Dedet JP, editor. *Les Leishmanioses*. Paris: Ellipses; 1999. p. 21-39.
- [9]. <https://theses.ulaval.ca/Farchimede/fichiers/22822/ch01.html>.
- [10] . Pratlong 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.
- [11] . Schwenkenbecher JM, Wirth T, Schnur LF, Jaffe CL, Schallig H, Al-Jawabreh A, et al. Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *Int J Parasitol* 2006;36:237-46.
- [12]. Laboratoire de PARASITOLOGIE MYCOLOGIE CHU de Montpellier 39 avenue Charles Flachaut,34295 Montpellier.
- [13] . Léger N, Depaquit J. Les phlébotomes. In: Dedet JP, editor. *Les Leishmanioses*. Paris: Ellipses; 1999. p. 89-108.
- [14].Pierre Aubry, Bernard-Alex Gaüzère. Leishmanioses Actualités 2015 Mise à jour le 13/10/2015.

- [15]. Cabanillas B J. Caractérisation de principes actifs antileishmaniens isolés de Piperaceae et Zingiberaceae médicinales péruviennes. Thèse de doctorat en Chimie-Biologie-Santé, université de Toulouse 2011, 207p, IN <[http://thesesups.upstlse.fr/1150/1/Cabanillas\\_Billy-Joel.pdf](http://thesesups.upstlse.fr/1150/1/Cabanillas_Billy-Joel.pdf)>
- [16].Moumni H . Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie ; épidémiologie et diagnostic du laboratoire des leishmanioses au CHU de tlemcen ; Université Abou baker Belkaid . 2015.
- [17] .[Http://www.lescabrieres-vet.fr/actualite/la-leishmaniose-canine](http://www.lescabrieres-vet.fr/actualite/la-leishmaniose-canine).
- [18].[Http://jlbam.free.fr/arthropodes\\_et\\_sante/FR/jlbam\\_maquette\\_fiche\\_espece.php?param\\_insecte=35](http://jlbam.free.fr/arthropodes_et_sante/FR/jlbam_maquette_fiche_espece.php?param_insecte=35).
- [19] . Dereure J. Réservoirs de leishmanies. In: Dedet JP, editor. *Les Leishmanioses*. Paris: Ellipses; 1999. p. 109-30.
- [20].[https://www.researchgate.net/figure/8513077\\_fig1\\_Figure-2-Reservoir-hosts-of-Leishmania-spp-in-Israel-and-the-Palestinian-Authority](https://www.researchgate.net/figure/8513077_fig1_Figure-2-Reservoir-hosts-of-Leishmania-spp-in-Israel-and-the-Palestinian-Authority)
- [21] .Kamhawi S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* 2000;2:1765-73.
- [22] Wery M.Livre protozoologie,Editeur de Boeck, vo l279 ,P 127.
- [23].belhachem A , mansour benaouf Y. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie ; quelques tests de toxicité du glucantime ; Université Abou baker Belkaid.2013.
- [24] .Buffet P, Rosenthal E, Gangneux J P et al. Traitement des leishmanioses en France : proposition d'un référentiel consensuel. *Presse médicale*. 2010, 40,84-173.
- [25] . Moreira W. Stress oxydatif, différenciation et mort cellulaire chez le parasite leishmania. Thèse de doctorat en microbiologie immunologie, Faculté de médecine, Université Laval Québec2011, 213p.
- [26] . Buffet P, Morizot G. La leishmaniose cutanée en France : vers la fin des traitements injectables . *Dermatologie tropicale*. *Bull Soc PatholExot*. 2003, 96, 5, 383-388.
- [27] . Rezk alleh L. Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien Laghouat et Ain oussara, mémoire de fin d'étude de résidanat en parasitologie mycologie médicale, 2008-2009.
- [28] . Antoine JC, Lang T, Prina E. Biologie cellulaire de *Leishmania*. In: Dedet JP, editor. *Les Leishmanioses*. Paris: Ellipses; 1999. p. 41-62.
- [29] . Faucher B, Piarroux R .Actualités sur les leishmanioses viscérales, Volume 32, Issue 9,September 2011, Pages 544-551, P 547.

- [30] . Bafiuls, A L, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology* ; 2007 : 64: 2-109.
- [31].Rhamirich O . Les leishmanioses : actualités thérapeutiques . Université Mohammed 5 souissi faculté de médecine et de pharmacie rabat.2012.
- [32]. Zait H, Hamrioui B, Leishmanioses cutanées en Algérie Bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007O, Volume 2009, Issue 412,May2009,Pages33-39.
- [33] .Laboratoire de parasitologie-mycologie Centre hospitalier universitaire Mustapha: houria.zait article reçu le 22 octobre 2008, accepté le 7 mars 2009.
- [34] . Izri A, Bellazzoug S. Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en Algérie ; dossier scientifique supplément au N°396, P 3-10].
- [35] .Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Canavate C, Figueras MC, et al.Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2006;44:2343-7.
- [36] .Vega-Lopez F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2003;**16**:97-101.
- [37] . Mishra, B , Kale, R , Singh, R K. , Tiwari, VK, 2009. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* 80(2): 81-90.
- [38]. Minodier P, Jurquet A L, Noel G, Uters M, Laporte R, Garnier J M. Le traitement des leishmanioses. *Archives de Pédiatrie* 2010, 17: 838 -839
- [39]. Janvier F. Thérapeutique des leishmanioses. *Médecine tropicale* 2008, 68: 584-584
- [40]. Marquet P. Suivi thérapeutique pour l'adaptation de posologie des médicaments 2004
- [41] . <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/fr/> 2016 Aide-mémoire.
- [42]. Sekou Diarra S. Etude de l'incidence de l'exposition au parasite et les aspects epidemiocliniques de la leishmaniose cutanée en zone endémique de Barouéli (Kéména et Sougoula) Région de Ségou(Mali). Thèse de doctorat en médecine, Faculté de médecine, de pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'Université de Bamako, 2008, 97p, <<http://www.keneya.net/fmpos/theses/2008/med/pdf/08M37.pdf>>
- [43]. <https://posomed.fr/lab/1107/SANOFI-AVENTIS-GROUPE?start=380>.
- [44]. Charbagi N , Ben Salah N, Yacoub M. ANTIMOINE , SELS PENTAVALENTs ; Centre Anti-Poisons de Tunis ; International Programme on Chemical Safety Poisons Information Monograph 678 (Group PIM) Pharmaceutical ; aout 1998.
- [45]. Vidal 2011.
- [46]. [document-rcp.vidal.fr/af/47a0efc6b6d7463e8afd818c02e223af.pdf](http://document-rcp.vidal.fr/af/47a0efc6b6d7463e8afd818c02e223af.pdf)

- [47]. <https://www.intechopen.com/books/leishmaniasis-trends-in-epidemiology-diagnosis-and-treatment/metal-based-therapeutics-for-leishmaniasis> (Chemical structure of sodium stibogluconate (Pentostam) and meglumine antimoniate (Glucantime)).
- [48]. Sierra Romero GA, Flores EMM, Noronha EF. High frequency of skin reaction in patients with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate contaminated with heavy metals. *Mcm Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 2003; 98:145-9.1.
- [49]. *Médecine et maladies infectieuses* 2005 ; 35 : 42-5.
- [50]. Masmoudi A, Maalej N, Mseddi M et al. Glucantime® par voie parentérale, bénéfique versus toxicité.
- [51]. Delgado J , *Coll. Am. J.Trop. Mcd. I-Iyg.* 1999 ; 61: 766-769.
- [52]. Giroud, Mathe (1978) *Pharmacologie Clinique*, Tome I Ed. 1978, pp 113-114.
- [53]. De Wolff FA (1995). Antimony and health. *Br Mcd J*; 310: 1216-7.
- [54]. Goodman and Gilman's (1980) *The pharmacological basis of therapeutics*, 7ème édition Mac Millan Publishing Co pp 1062-1063.
- [55]. Blanc P, Sardin F, Wilner C (1980) Un cas probable d'intoxication aiguë par l'antimoine. *Mcd Leg Toxicologie*, 23, 7: 637-642.
- [56]. Donovan KL, White AD et CoII (1990) Pancreatitis and palindromic arthropathy with effusions associated with sodium stibogluconate *J Infect*, 21 (1):107-110.
- [57]. Torrus D. et *Coll. Am. J.Gastroenterol.* 1996; 91: 820- 821.
- [58]. Belyaeva, A.P. (1 967).The effect of antimony on reproduction. *Gig. Tr. Prof. Zabol.*, 11: 32.
- [59]. Ranque J , Quirlici M (1986) *EMC Maladies infectieuses*, 8094A10, 4.Ranque J et Quirlici M (1983) *Kala-Azar. EMC Maladies infectieuses*, 8993 A1 0, 2.Rees PH & Kager PA (1980) Renal clearance of pentavalent antimony. *Lancet*, 2, 226-229.
- [60]. Chulay JD, Fleckenstein L, Smith DH. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Trans R SocTrop Mcd Hyg* 1988; 82:6972.
- [61]. Sundar S, Chatterjee M. Visceral leishmaniasis-current therapeutic modalities. *Indian J med res* 123. March 2006, pp 345-352.
- [62]. *Le globule rouge*. NAJMAN A. chapitre V Edition Flammarion.
- [63]. Klinken, SP. (2002) Red blood cells. *IntJ Biochem Cdl Biol*, 34, 1513-1518.
- [64]. <http://www.larousse.fr/encyclopedie>.
- [65].[http://www.passeportsante.net/fr/Actualites/Dossiers/DossierComplexe.aspx?doc=interpreter\\_prise\\_sang\\_page1\\_do](http://www.passeportsante.net/fr/Actualites/Dossiers/DossierComplexe.aspx?doc=interpreter_prise_sang_page1_do).

- [66]. Jefferson SA, Robson DM, Thakar SC, Lorico JH, Rappa A, Sartorelli G, and Okunicyf, P.(2001) Erythrocyte membrane ATP binding cassette (ABC) proteins: MRP1 and CFTR as well as CD39 (ectoapyrase) involved in RBC ATP transport and elevated blood plasma ATP of cystic fibrosis. *Blood Celis Mol Dis*, 27,165-180.1.
- [67]. <http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/les-membranes-cellulaires.html>.
- [68]. Julie-Anne DO ROUVIERE. Thèse :Diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux.
- [69]. Physiologie du GR /par B. Dalle et Colli 1997. Cahier bioforma /. Christian JanotJ2001.
- [70]. L'Hématologie page 76 a 83, DREYFUS B.1ere partie édition Flammarion. Diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux : thèse du Julie-Anne DO-ROUVIERE. Le globule rouge. NAJMAN A.chapitre V Edition flammarion.
- [71]. Aguilar-Martinez P Faculté de Médecine Montpellier - Nîmes Janvier 2007.
- [72]. Tosteson, DC. and Hoffinan, JF. (1960) Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red celis. *J Gen Physiol*, 44, 169-194.
- [73]. Kaestner L, Bernhardt 1. (2002) Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry*, 55, 71-74.
- [74]. Cabantchik, ZI. (1999) Erythrocyte membrane transport. *Novartis Found Symp*, 226, 6-16.1.
- [75]. [http://www.facbio.com/content/index.php?option=com\\_content&task=view&id=18](http://www.facbio.com/content/index.php?option=com_content&task=view&id=18).
- [76]. Seigneurin D, 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.