



ETUDE DE LA LIPIDOPEROXYDATION  
DE LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE  
DANS LA DREPANOCYTOSE

THESE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MEDECINE  
(DIPLOME D'ETAT)

Présentée et soutenue publiquement  
Le 14 Janvier 1998

par

**Alassane DIATTA**

Maître ès-Sciences biologiques et médicales  
Titulaire du D.E.A. de Chimie - Biochimie des produits naturels

Né le 04 Mars 1964 à DIEMBERING-HOUDIABOUSSE (Sénégal)

**JURY**

PRESIDENT :	M. Ibrahima	SECK	Professeur
MEMBRES :	M. Doudou	THIAM	Maître de Conférences Agrégé
	M. Meissa	TOURE	Maître de Conférences Agrégé
	M. Pape Amadou	DIOP	Maître de Conférences Agrégé
	M. Niama Diop	SALL	Maître de Conférences Agrégé
DIRECTEUR DE THESE :	M. Niama Diop	SALL	Maître de Conférences Agrégé

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR  
FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET  
D'ODONTO-STOMATOLOGIE**

**PERSONNEL DE LA FACULTE**

Doyen	M. René	NDOYE
1 <sup>er</sup> Assesseur	M. Doudou	BA
2 <sup>ème</sup> Assesseur	M. Papa Demba	NDIAYE
Chef des Services Administratifs	M. Assane	CISSE

**SECTION MEDECINE**

**PROFESSEURS TITULAIRES**

M.	José Marie	AFOUTOU	Histologie-Embryologie
M.	Mamadou	BA	Pédiatrie
M.	Salif	BADIANE	Maladies Infectieuses
M.	Fallou	CISSE	Physiologie
M.	Fadel	DIADHIOU	Gynécologie-Obstétrique
M.	Baye Assane	DIAGNE	Urologie
M.	Samba	DIALLO	Hématologie
*M	El Hadji Malick	DIOP	ORL
Mme	Thérèse MOREIRA	DIOP	Médecine Interne I
M.	Sémou	DIOUF	Cardiologie
M.	Mohamadou	FALL	Pédiatrie
M.	Nicolas	KUAKUVI	Pédiatrie
M.	Bassirou	NDIAYE	Dermatologie
M.	Ibrahima Pierre	NDIAYE	Neurologie
M.	Madoune Robert	NDIAYE	Ophtalmologie

---

\* Associé

§M	Mouhamadou M.	NDIAYE	Neurologie
M	Papa Demba	NDIAYE	Anatomie-Pathologique
*M	Mamdou	NDOYE	Chirurgie Infantile
M.	René	NDOYE	Biophysique
M.	Abibou	SAMB	Bactériologie-Virologie
§M.	Awa COLL	SECK	Maladies Infectieuses
M.	Seydina Issa Laye	SEYE	Orthopédie-Traumatologie
M.	Dédéou	SIMAGA	Chirurgie Générale
M.	Abdourahmane	SOW	Médecine Préventive
M.	Housseyn Dembel	SOW	Pédiatrie
M.	Moussa Lamine	SOW	Anatomie Chirurgie
*M	Cheikh Tidiane	TOURE	Chirurgie Générale
M.	Papa	TOURE	Cancérologie
M.	Alassane	WADE	Ophtalmologie

### MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M.	Mamadou	BA	Urologie
M	Sérigne	BA	Cardiologie
M	Moussa	BADIANE	Radiologie
M	Seydou Boubakar	BADIANE	Neuro-Chirurgie
M	Mohamed Diawo	BAH	Gynécologie-Obstétrique
α	§M	Mamdou Diakhaté	Dermatologie
M.	Moussa Fafa	CISSE	Bactériologie-Virologie
M.	Abdallahmane	DIA	Anatomie-Chirurgie-Générale
M.	Amadou Gallo	DIOP	Neurologie
M	Babacar	DIOP	Psychiatrie
M.	El Hadji Ibrahima	DIOP	Orthopédie-Traumatologie
M	Raymond	DIOUF	ORL
M.	Souvasin	DIOUF	Orthopédie-Traumatologie
M.	Babacar	FALL	Chirurgie Générale
M.	Ibrahima	FALL	Chirurgie Infantile
Mme	Mame Awa	FAYE	Maladies Infectieuses
Mme	Sylvie SECK	GASSAMA	Biophysique
M	Oumar	GAYE	Parasitologie
M	Serigne Maguèye	GUEYE	Urologie

\* Associé

§ Detachement

M.	Abdou Almamy	HANE	Pneumophtisiologie
§M.	Salvy Léandre	MARTIN	Pédiatrie
M.	Victorino	MENDES	Anatomie-Pathologique
M.	Jean Charles	MOREAU	Gynécologie-Obstétrique
Mme	MbayangNIANG	NDIAYE	Physiologie-Neurologie
§M.	Mohamed Fadel	NDIAYE	Gastro-Entérologie
M.	Mouhamadou	NDIAYE	Chirurgie-Thoracique
M.	Pape Amadou	NDIAYE	Ophtalmologie
M.	Youssoupha	SAKHO	Neuro-Chirurgie
M.	Niama DIOP	SALL	Biochimie Médicale
Mme	Bineta KA	SALL	Anesthésie-Réanimation
M.	Mohamadou Guélaye	SALL	Pédiatrie
M.	Moustapha	SARR	Cardiologie
M.	Birama	SECK	Pédopsychiatrie
M.	Doudou	THIAM	Hématologie
M.	Meïssa	TOURE	Biochimie Médicale

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. Claude MOREIRA Pédiatrie

## MAITRES ASSISTANTS

M.	El Hadj Amadou	BA	Ophtalmologie
M.	Boubacar	CAMARA	Pédiatrie
M.	El Hadj Souleymane	CAMARA	Orthopédie-Traumatologie
M.	Jean Marie	DANGO	Anatomie Pathologique
*M.	Michel	DEVELOUX	Dermatologie
*M.	Massar	DIAGNE	Neurologie
M.	Ibrahima Bara	DIOP	Cardiologie
M.	Bernard Marcel	DIOP	Maladies Infectieuses
&M.	Alassane	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M.	Boucar	DIOUF	Médecine Interne I
M.	Saliou	DIOUF	Pédiatrie
M.	Oumar	FAYE	Parasitologie
M.	Gisèle WOTO	GAYE	Anatomie Pathologique
M.	Abdoul	KANE	Cardiologie
M.	Abdoulaye	NDIAYE	Anatomie-Chirurgie-Orthopédie
§M.	Adama Bandiougou	NDIAYE	Immunologie

---

§ Disponibilité

M.	Abdou Almamy	HANE	Pneumophtisiologie
§M.	Salvy Léandre	MARTIN	Pédiatrie
M.	Victorino	MENDES	Anatomie-Pathologique
M.	Jean Charles	MOREAU	Gynécologie-Obstétrique
Mme	Mbayand NIANG	NDIAYE	Physiologie-Neurologie
§M.	Mohamed Fadel	NDIAYE	Gastro-Entérologie
M.	Mouhamadou	NDIAYE	Chirurgie-Thoracique
M.	Pape Amadou	NDIAYE	Ophtalmologie
M.	Youssoupha	SAKHO	Neuro-Chirurgie
M.	Niama DIOP	SALL	Biochimie Médicale
Mme	Bineta KA	SALL	Anesthésie-Réanimation
M.	Mohamadou Guélaye	SALL	Pédiatrie
M.	Moustapha	SARR	Cardiologie
M.	Birama	SECK	Pédopsychiatrie
M.	Doudou	THIAM	Hématologie
M.	Meïssa	TOURE	Biochimie Médicale

#### CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M.	Claude	MOREIRA	Pédiatre
----	--------	---------	----------

#### MAITRES ASSISTANTS

M.	El Hadji Amadou	BA	Ophtalmologie
M.	Boubacar	CAMARA	Pédiatrie
M.	El Hadji Souleymane	CAMARA	Orthopédie-Traumatologie
M.	Jean Marie	DANGO	Anatomie Pathologique
*M.	Michel	DEVELOUX	Dermatologie
*M.	Massar	DIAGNE	Neurologie
M.	Ibrahima Bara	DIOP	Cardiologie
M.	Bernard Marcel	DIOP	Maladies Infectieuses
&M.	Alassane	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M.	Boucar	DIOUF	Médecine Interne I
M.	Saliou	DIOUF	Pédiatrie
M.	Oumar	FAYE	Parasitologie
Mme	Gisèle WOTO	GAYE	Anatomie Pathologique
M.	Abdoul	KANE	Cardiologie
M.	Abdoulaye	NDIAYE	Anatomie-Chirurgie-Orthopédie
§M	Adama Bandiougou	NDIAYE	Immunologie

\* Associé

§ Disponibilité

Mme	Coura SEYE	NDIAYE	Ophtalmologie
&M	Issa	NDIAYE	ORL
M.	El Hadji	NIANG	Radiologie
M.	Doudou	SARR	Psychiatrie
M.	Amadou Makhtar	SECK	Psychiatrie
M.	Gora	SECK	Physiologie
M.	Ahmed Iyane	SOW	Bactériologie-Virologie
Mme	Hassanatou TOURE	SOW	Biophysique
M.	Cheickna	SYLLA	Urologie
M.	Alé	THIAM	Neurologie

### ASSISTANTS DE FACULTE

#### ASSISTANTS DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX

M.	Boubacar Samba	DANKOKO	Médecine Préventive
M.	Abdoulaye Séga	DIALLO	Histologie Embryologie
M.	Yémou	DIENG	Parasitologie
M.	Diallo	DIOP	Bactériologie-Virologie
M.	Mamadou	DIOP	Anatomie Organogénèse
M.	Moctar	DIOP	Histologie Embryologie
M.	Saliou	DIOP	Hématologie
Mme	Mame Coumba GAYE	SALL	Médecine Légale
Mme	Khadissatou SECK	FALL	Hématologie
M.	Oumar	FAYE	Histologie Embryologie
M.	Lamine	GUEYE	Physiologie
M.	El Hadji Alioune	LO	Anatomie Organogénèse
M.	Ismaila	MBAYE	Médecine Légale
M.	Mamadou	MBODJ	Biophysique
M.	Oumar	NDOYE	Biophysique
M.	Abdoulaye	SAMB	Physiologie
M.	Ndéné Gaston	SARR	Biochimie Médicale
Mme	Anta DIA	TALL	Médecine Préventive
M.	Kamador	TOURE	Médecine Préventive
M.	Issa	WONE	Médecine Préventive

\* Associé

& En stage à l'extérieur

**CHEFS DE CLINIQUES-ASSISTANTS  
DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX**

Mme	Marième GUEYE	BA	Gynécologie-Obstétrique
&M.	Momar Codé	BA	Neuro-Chirurgie
M.	Moussa	BA	Psychiatrie
M.	Cheikh Ahmed Tidiane	CISSE	Gynécologie-Obstétrique
Mme	Mariama Safiétou KA	CISSE	Médecine Interne II
M.	André Vauvert	DANSOKHO	Orthopédie-Traumatologie
Mme	Elisabeth FELLSER	DANSOKHO	Maladies Infectieuses
*M.	Ibrahima	DIAGNE	Pédiatrie
M.	Djibril	DIALLO	Gynécologie-Obstétrique
M.	Saïdou	DIALLO	Médecine Interne I
M.	Ahmadou	DEM	Cancérologie
*M.	Mame Thierno	DIENG	Dermatologie
M.	Rudolph	DIOP	Stomatologie
Mme	Sokhna BA	DIOP	Stomatologie
M.	Mamadou Lamine	DIOUF	Médecine Interne
Mme	Elisabeth	DIOUF	Anesthésie-Réanimation
M.	Edouard Marcel I.	GUEYE	Neuro-Chirurgie
M.	Limamoulaye	HANE	Cardiologie
*M.	Mamadou Mourtalla	KA	Médecine Interne I
M.	Assane	KANE	Dermatologie
*M.	Abdoul Aziz	KASSE	Cancérologie
Mme	Aminata DIACK	MBAYE	Pédiatrie
M.	Mouhamadou	MBENGUE	Médecine Interne I
M.	Amadou Koura	NDAO	Neurologie
M.	A. Ousmane	NDIAYE	Pédiatrie
*M.	Cheikh Tidiane	NDOUR	Maladies Infectieuses
M.	Alain Khassim	NDOYE	Urologie
Melle	Paule Aïda	NDOYE	Ophthalmologie
*M.	Abdou	NIANG	Médecine Interne I
M.	Abdoulaye	POUYE	Médecine Interne
M.	Mamadou	SANGARE	Gynécologie-Obstétrique
Melle	Anne Aurore	SANKHALE	Chirurgie-Plastique
Mme	Anna	SARR	Médecine Interne II
Mme	Fatou	SENE	Neurologie
M.	El Hassane	SIDIBE	Médecine Interne II
*M.	Masserigne	SOUMARE	Maladies Infectieuses

---

& M. en stage à l'extérieur

\* M. associé

M.	Charles Mouhamed	SOW	Orthopédie-Traumatologie
M.	Daouda	SOW	Psychiatrie
M.	Mouhamadou Habib	SY	Orthopédie-Traumatologie
M.	Abdourahmane	TALL	ORL
M.	Gilbert	TENDING	ORL
M.	Silly	TOURE	Stomatologie

### ATTACHES CHES DE CLINIQUE

M.	Oumar	BA	Pneumophtisiologie
Mme	Bineta DIOP	BADIANE	Anesthésie-Réanimation
M.	Saïba	CISSOKHO	Pneumophtisiologie
Mme	Pauline	DIOUSSE	Dermatologie
M.	Mor	NDIAYE	Pneumophtisiologie

### ATTACHES - ASSISTANTS

M.	Néloum	DJIMADOUN	Histologie-Embryologie
M.	Jean Marc Ndiaga	NDOYE	Anatomie
Mme	Françoise NDOUR	NGOM	Hématologie
Mlle	Oumou Kalsome	SY	Biochimie Médicale

---

**SECTION PHARMACIE**  
**PROFESSEURS TITULAIRES**

M	Doudou	BA	Chimie Analytique et Toxicologie
M	Emmanuel	BASSENE	Pharmacognosie et Botanique
*M	Babacar	FAYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M	Issa	LO	Pharmacie Galénique
*M	Souleymane	MBOUP	Bactériologie-Virologie
*M	Oumar	NDIR	Parasitologie

**MAITRES DE CONFERENCES AGREGES**

M	Mamadou	BADIANE	Chimie Thérapeutique
M	Cheikh S. Bouh	BOYE	Bactériologie-Virologie
M	Mounirou	CISS	Toxicologie
M	Balla Moussa	DAFFE	Pharmacognosie
M	Aïssatou GAYE	DIALLO	Bactériologie-Virologie
M	Aminata SALL	DIALLO	Physiologie Pharmaceutique
M	Alioune	DIEYE	Immunologie
M	Pape Amadou	DIOP	Biochimie Pharmaceutique

**MAITRES ASSISTANTS**

M	Amadou	DIOUF	Toxicologie
M	Rita B.	NONGONIERMA	Pharmacognosie
M	Matar	SECK	Pharmacie Chimique et Chimie

**ASSISTANTS**

Mlle	Issa Bella	BAH	Parasitologie
*M	Aynina	CISSE	Physique Pharmaceutique
M	Mounibé	DIARRA	Physique Pharmaceutique
Mlle	Thérèse	DIENG	Parasitologie
*M	Amadou Moctar	DIEYE	Pharmacologie et Pharmacodynamie
M	Yérin Mbagnick	DIOP	Chimie Analytique
M	Ahmédou Bamba K.	FALL	Pharmacie Galénique
M	Djibril	FALL	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
M	Modou	LO	Botanique
M	Tharcisse Nkyliye	MFURA	Physique Pharmaceutique
*M	Augustin	NDIAYE	Physique Pharmaceutique

Mme	Maguette Dème	NIANG	Biochimie Pharmaceutique
Mme	Philomène LOPEZ	SALL	Biochimie Pharmaceutique
Mme	Aïssatou GUEYE	SANKHARE	Toxicologie
*M	Elimane Amadou	SY	Chimie Générale et Minérale
M	Oumar	THIOUNE	Pharmacie Galénique
M	Alassane	WELE	Chimie Physique

### ATTACHES

M	William	DIATTA	Botanique
M	Antoine	DIEDHIOU	Biochimie Pharmaceutique
M	Ciré	DIENG	Pharmacologie Pharmacodynamie
M	Alioune Badara	DIOP	Pharmacie Galénique
M	Aly Coto	NDIAYE	Biochimie Pharmaceutique
M	Mamadou	SARR	Biochimie Pharmaceutique
Melle	Edwige	GOMIS	Pharmacognosie

---

\*Associé

**SECTION CHIRURGIE DENTAIRE  
PROFESSEURS TITULAIRES**

M.	Ibrahima	BA	Pédodontie-Prvention
M.	Ndioro	NDIAYE	Odontologie Préventive et Sociale

**MAITRE DE CONFERENCES AGREGES**

*M.	Boubacar	DIALLO	Chirurgie Buccale
M.	Pape Demba	DIALLO	Parodontologie
Mme	Charlotte FATY	NDIAYE	Chirurgie Buccale
M.	Malick	SEMBENE	Parodontologie

**MAITRES - ASSISTANTS**

Melle	Fatou	GAYE	Dentisterie Opérateur
M.	Abdou Wahag	KANE	Dentisterie Opérateur
M.	Abdoul Aziz	YAM	Pédodontie

**ASSISTANTS DE FACULTE**

&Mme	Christiane JOHNSON	AGBOTON	Prothèse Dentaire
Mme	Aïssatou TAMBA	BA	Pédodontie-Préventive
Mme	Khady DIOP	BA	Orthopédie Dento-Faciale
M.	Daouda	CISSE	Odontologie Préventive et Sociale
*M.	Fallou	DIAGNE	Orthopédie Dento-Faciale
Mme	Adam Awa Marie SECK	DIALLO	Parodontologie
*M.	Lambane	DIENG	Prothèse Dentaire
&Mme	Affissatou NDOYE	DIOP	Dentisterie Opérateur
Mme	Fatou	DIOP	Pédodontie-Préventive
&M.	Libasse	DIOP	Prothese Dentaire
*M.	Malick	MBAYE	Dentisterie Opérateur
Mme	Paulette M. AGBOTON	MIGAN	Prothèse Dentaire
M.	Edmond	NABHANE	Prothèse Dentaire
Mme	Maye Ndave NDOYE	NGOM	Parodontologie
M.	Paul Débé Amadou	NIANG	Chirurgie Buccale

---

\* Associé

§ Disponibilité

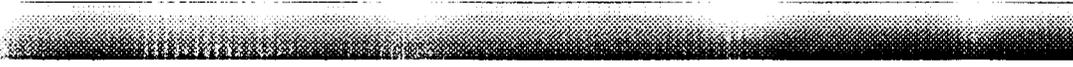
M	Mohamed Talla	SECK	Prothèse Dentaire
Mme	Soukène DIA	TINE	Chirurgie Buccale
M.	Saïd Nour	TOURE	Prothèse Dentaire

### ATTACHES

M.	Abou	BA	Chirurgie Buccale
M	Henri Michel	BENOIST	Parodontologie
M	Babacar	FAYE	Odontologie Conservatrice Endodontie
M	Malick	FAYE	Odontologie Préventive et Sociale
M	CheikhMouhamadou	LO	Odontologie Préventive et Sociale
M	El Hadji Babacar	MBODJ	Prothèse Dentaire
M	Mohamed	SARR	Odontologie Conservatrice Endodontie
M.	Fatoumata DIOP	THIAW	Odontologie Conservatrice Endodontie
M	Babacar	TOURE	Odontologie Conservatrice Endodontie

**"Par délibération, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation".**

*JE DEDIE CE TRAVAIL...*



**Au Professeur H. Mouray de l'Université François Rabelais de Tours (France),**  
*Vous avez éveillé en moi, une forte curiosité scientifique et l'amour du travail. Je ne saurais trouver de mots adéquats pour vous exprimer toute ma reconnaissance, merci pour tout.*

**A Mes Parents,**  
*Pour tous les sacrifices consentis pour ma réussite, ce travail vous est entièrement dédié.*

**A Mes Frères et Sœurs, en particulier au Docteur Diatta David, à François Diatta, In**  
**mémoriam à Pascal Diatta et à Jean Paul Diatta,**  
*Recevez ce travail en témoignage de ma reconnaissance et de mon profond attachement.*

**A Mes Oncles Birame Ndiaye, Mamadou Diatta, Alpha Ndiaye, Alexandre Bossy, à ma**  
**Tante Marthe Diatta et Familles, à Feue Tante Fatou Diatta, née Preira (en France),**  
**à mon Oncle Jacques Diatta et à Pascal Manga, Président du Conseil Régional de**  
**Ziguinchor,**  
*Pour vos conseils, vos encouragements, votre soutien financier ô combien important vous avez toujours manifesté un intérêt particulier à la réussite de mes études. Ce travail est le vôtre.*

**A Mon Epouse, à Mon Fils et à Ma Belle Famille,**  
*Merçi pour votre indéfectible soutien. Que Dieu préserve nos liens.*

**A Marc Faure, aux Amis du Puy-En-Velay et de Tours,**  
*Trouvez ici l'expression de mon amitié et de ma profonde reconnaissance.*

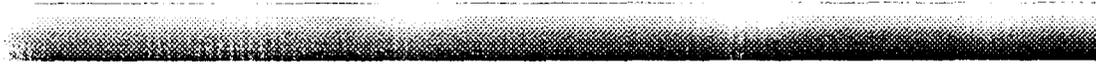
**Aux Docteurs Gérard Coly, Alfousseyni Gaye, à Monsieur Diatta Georges et famille,**  
*En témoignage de l'estime porté en mon endroit et de votre soutien, Trouvez ici l'expression de notre sincère amitié, devenue fraternité.*

**A Ndiaye Mamadou, à Thérèse Oussaye, à tous mes Cousins et Cousines,**  
*Toute ma sympathie.*

- A Messieurs André Sonkho et à Robert Sagna respectivement Ministre de l'Education Nationale et Ministre de l'Agriculture et à Alpha Diallo, Directeur des Bourses, je ne saurais trouver de phrase adéquate pour exprimer toute ma gratitude. Votre attention et votre humanisme vous valent respect et admiration. En signe de reconnaissance, recevez ce travail, le vôtre eu égard votre soutien.*
- A Tous les Membres de la Sympathique Equipe du Laboratoire de Biochimie Médicale de l'UCAD et de l'HALD, que Chacun(e) trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond attachement.*
- Au Docteur Gaston Ndéné Sarr, grand, avec tout le bien que je pense de vous, je vous dédie ce travail.*
- A Madame Sall Philomène Lopèz, En réponse à l'accueil ô combien chaleureux que vous et votre équipe du Laboratoire de l'hôpital des enfants Albert Royer m'avez réservé, ce travail vous est dédié.*
- A Tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, je ne saurais citer vos noms désormais gravés pour toujours dans mon cœur. Merci pour tout.*

*Prêtez-moi Mon Dieu, l'Indulgence et la Patience.  
Faites de moi un homme modéré en tout mais insatiable dans mon  
amour à l'endroit de la Science.*

*A NOS MAÎTRES ET JUGES*



*Notre Maître et Président de jury,  
Monsieur le Professeur Ibrahima SECK,*

*Honorable Maître,*

*Nous sommes profondément ému par l'honneur que vous nous faites en acceptant, avec la spontanéité qui vous caractérise, d'assurer la présidence du jury de notre thèse.*

*Nous avons toujours apprécié la qualité de votre enseignement caractérisé par la rigueur, l'honnêteté, l'humilité, le respect de l'homme et l'amour du travail bien fait.*

*Qu'il nous soit donné en cet instant l'occasion de vous adresser nos remerciements et de vous témoigner notre respect et dévouement.*

*Notre Maître et Juge,*

*Monsieur le Professeur Agrégé Doudou THIAM,*

*La spontanéité avec laquelle vous avez accepté d'être membre du jury de notre thèse nous honore sans nous étonner.*

*En effet, la disponibilité qui ne s'embarrasse guère de protocole, le souci du travail bien fait, la rigueur sont quelques unes des grandes qualités de l'enseignement que vous êtes.*

*Veillez trouver ici l'expression de notre profond respect.*

*Notre Maître et Juge,*

***Monsieur le Professeur Agrégé Meïssa TOURE,***

*Cher Maître,*

*Vous nous avez appris qu'au-delà du savoir, il y a le savoir faire et le savoir-être dans la vie professionnelle. Ce sont là les deux piliers fondamentaux de la formation que vous nous avez léguée.*

*Merci pour tout et trouvez ici l'expression de notre indéfectible attachement.*

*Notre Maître et Juge,*

***Monsieur le Professeur Agrégé Pape Amadou DIOP,***

*Avec tout le bien que pensent de vous les étudiants en Pharmacie, vous avoir comme juge est pour nous un grand honneur.*

*Merci et soyez assuré de notre grande admiration.*

*Notre Maître et Directeur de Thèse,*

***Monsieur le Professeur Agrégé Niama Diop SALL,***

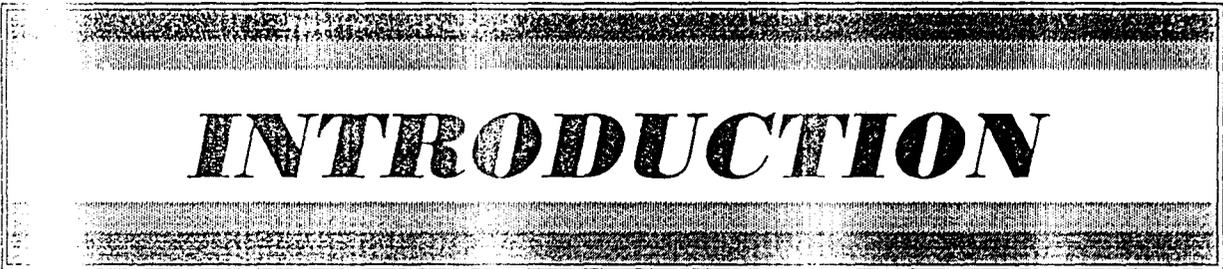
*Vous n'avez rien ménagé pour nous initier, nous guider pour la réalisation de ce travail. Votre humanisme, votre disponibilité et surtout votre souci permanent du travail bien fait vous valent notre sincère reconnaissance et notre grande admiration.*

*Nous vous assurons de notre profonde gratitude.*

# SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION.....	1
PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
BIOCHIMIE DE L'HÉMOGLOBINE : APPROCHE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE .....	5
I.1. Les hémoglobines normales de l'Homme .....	5
I.2. Les hémoglobines pathologiques.....	6
CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LA DRÉPANOCYTOSE.....	8
II.1. Epidémiologie.....	8
II.2. Physiopathologie.....	10
II.3. Manifestations cliniques.....	12
II.4. Traitement.....	14
II.5. Les perspectives d'une thérapeutique spécifique de la drépanocytose....	15
II. RAPPELS SUR LA MEMBRANE : ASPECTS STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS .....	17
RAPPEL SUR LA PEROXYDATION LIPIDIQUE.....	20
IV.1. Radicaux libres oxygénés et mécanismes de régulation.....	20
IV.2. Peroxydation lipidique et facteurs de protection.....	24
IV.3. Physiopathologie de la peroxydation lipidique.....	32
III. DEUXIÈME PARTIE : ETUDE EXPÉRIMENTALE.....	36
SCHEMA GÉNÉRAL DE L'ÉTUDE.....	38
MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	39
II.1. Choix des sujets.....	39
II.2. Recueil et traitement des spécimens.....	39
II.2.1. Prélèvements.....	39
II.2.2. Traitement des échantillons.....	39

III.	ELECTROPHORÈSE DE L'HÉMOGLOBINE.....	40
III.1.	Hémolyse des globules rouges.....	40
III.2.	Electrophorèse proprement dite.....	40
III.2.1.	Réactifs.....	40
III.2.2.	Appareillages et accessoires.....	41
III.2.3.	Mode opératoire.....	41
III.2.4.	Electrophorégrammes.....	42
IV.	ETUDE DES LIPIDES DE LA MEMBRANE DU DRÉPANOCYTE.....	44
IV.1.	Dosage pondéral des phospholipides membranaires.....	44
IV.2.	Extraction des lipides membranaires de globule rouge.....	44
IV.2.1.	Matériel et réactifs.....	44
IV.2.2.	Mode opératoire.....	45
IV.2.3.	Analyse des lipides par CLHP.....	45
IV.2.3.1.	Instrumentation.....	46
IV.2.3.2.	Solvants.....	46
IV.2.3.3.	Standards.....	46
IV.2.3.4.	Analyse proprement dite.....	47
IV.2.3.5.	Résultats et commentaires.....	48
V.	EVALUATION DE LA LIPIDOPEROXYDATION ET DES FACTEURS DE PROTECTION AU SEIN DE LA MEMBRANE ÉRYTHROCYTAIRE.....	60
V.1.	Dosage du malondialdéhyde.....	60
V.1.1.	Généralités.....	60
V.1.2.	Réactifs.....	61
V.1.3.	Préparation des réactifs.....	61
V.1.4.	Appareillage et accessoires.....	62
V.1.5.	Mode opératoire.....	62
V.1.5.1.	Préparation de la gamme étalonnage.....	62
V.1.5.2.	Procédure analytique.....	63
V.2.	Mesures des activités SOD et GPX de la membrane du globule rouge ...	63
V.3.	Résultats expérimentaux et commentaires.....	65
V.3.1.	Résultats globaux des analytes : Hb, MDA, SOD et GPX des membranes érythrocytaires.....	65
V.3.2.	L'hémoglobine totale.....	66
V.3.3.	Le malondialdéhyde.....	66
V.3.4.	Les activités SOD et GPX.....	66
	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	69
	BIBLIOGRAPHIE.....	73



***INTRODUCTION***

Il est de plus en plus admis que la plupart des maladies sont d'origine multifactorielle. Ainsi dans la drépanocytose, en plus de l'anomalie moléculaire présidant à la synthèse d'une hémoglobine anormale dite S, un certain nombre d'autres facteurs semblent se déterminer. Il s'agit entre autres des facteurs alimentaires, immunologiques et surtout membranaires.

En effet, l'hyperhémolyse observée dans cette maladie pourrait être liée à une désorganisation des phospholipides qui assurent l'essentiel de la stabilité des membranes biologiques en général, et de celle de l'érythrocyte en particulier. La principale cause de désorganisation serait la peroxydation lipidique, secondaire essentiellement à l'action des radicaux libres oxygénés (RLO) [50].

La membrane cytoplasmique du globule rouge est la barrière qui enveloppe le cytosol et l'hémoglobine. Il s'agit d'une structure complexe constituée pour l'essentiel de lipides, de protéines et de glucides. Ces divers composants biochimiques assurent les fonctions de transfert de molécules, de signaux biologiques et les propriétés de plasticité membranaire. Leur intégrité à la fois structurale et fonctionnelle conditionne la survie du globule rouge. Cela explique l'intérêt de l'étude des lipides et de l'équilibre entre la lipidoperoxydation et les facteurs protecteurs de la membrane érythrocytaire au cours de la drépanocytose.

Dans ce travail, nous nous proposons de mener une étude biochimique comportant deux volets expérimentaux ; le premier correspond à l'analyse par chromatographie liquide haute pression (CLHP) des lipides membranaires : phospholipides et cholestérol. La deuxième étape a pour thème : l'évaluation de la lipidoperoxydation et de son contrôle par les enzymes superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPX) au sein de la membrane du drépanocyte.

Le choix de ce sujet d'étude repose sur six critères fondamentaux :

1. la drépanocytose par sa morbidité et le coût élevé de sa prise en charge médico-sociale constitue un réel problème de santé publique dans notre pays,
2. le cholestérol et les phospholipides, support essentiel de l'intégrité membranaire, sont la cible privilégiée des attaques radicalaires [39],
3. la CLHP est l'une des méthodes d'analyses les plus sensibles en chimie organique,
4. le malondialdéhyde (MDA) est le marqueur biochimique le plus utilisé pour évaluer la peroxydation lipidique,
5. les enzymes SOD et GPX constituent l'essentiel du capital antioxydant de la membrane de l'hématie,
6. la physiopathologie de la crise drépanocytaire relève de multiples altérations, les unes portant sur le couple membrane / hémoglobine, les autres sur l'équilibre stress oxydatif / facteurs de régulation.

En définitive, notre principal objectif est de rechercher, d'identifier et de mesurer d'éventuelles altérations biochimiques membranaires pouvant contribuer à mieux élucider la pathogénie de la drépanocytose.

**PREMIERE PARTIE :**  
**ETUDE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# I. BIOCHIMIE DE L'HEMOGLOBINE : APPROCHE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE

## II. LES HEMOGLOBINES NORMALES DE L'HOMME

L'hémoglobine normale est une hétéroprotéine comportant un groupement prosthetique fait de quatre noyaux héminiques et de quatre chaînes protéiques ou apoprotéines.

Chaque noyau héminique est constitué d'une partie organique et d'un atome de fer. La partie organique appelée protoporphyrine est formée de 4 noyaux pyrroles unis par des ponts méthyles. L'atome de fer se lie aux quatre atomes d'azote au centre du noyau tétrapyrrole. Cette structure protoporphyrinique est commune à toutes les hémoglobines.

Seule la cupule protéique permet de décrire les différentes hémoglobines. Les quatre chaînes constitutives de l'apoprotéine présentent une distribution variable en fonction de l'âge chez le sujet normal (Figure 1).

**Figure 1** : Développement des chaînes de l'hémoglobine humaine.

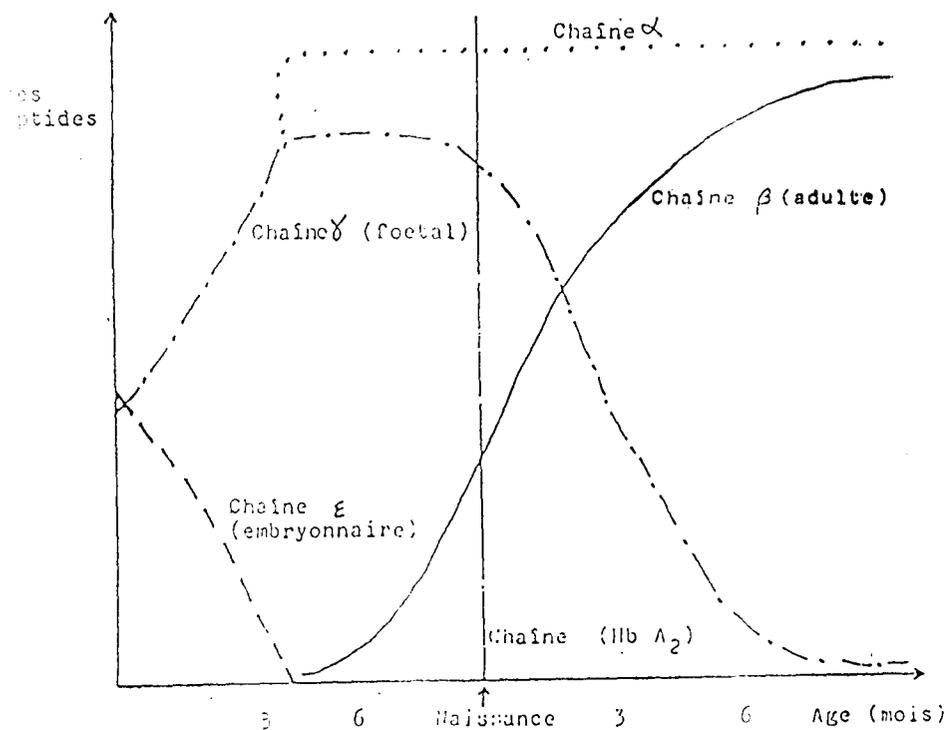
# I. BIOCHIMIE DE L'HEMOGLOBINE : APPROCHE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE

## 1. LES HEMOGLOBINES NORMALES DE L'HOMME

L'hémoglobine normale est une hétéroprotéine comportant un groupement prosthétique fait de quatre noyaux hémiques et de quatre chaînes protéiques ou apoprotéines.

Chaque noyau hémique est constitué d'une partie organique et d'un atome de fer. La partie organique appelée protoporphyrine est formée de 4 noyaux pyrroles unis par des ponts méthényles. L'atome de fer se lie aux quatre atomes d'azote au centre du noyau tétrapyrrole. Cette structure protoporphyrinique est commune à toutes les hémoglobines.

Seule la cupule protéique permet de décrire les différentes hémoglobines. Les quatre chaînes constitutives de l'apoprotéine présentent une distribution variable en fonction de l'âge chez le sujet normal. (Figure 1).



Figure; 1

Développement des chaînes de l'hémoglobine humaine

On distingue les hémoglobines embryonnaires Gowers I ( $\xi_2 \xi_2$ ) Gowers II ( $\alpha_2 \epsilon_2$ ) et Portland ( $\xi_2 \xi_2$ ) qui disparaissent au cours de la foetogenèse. Elles ne comportent pas de chaîne  $\beta$  et par conséquent ne sont pas concernées par la maladie drépanocytaire.

Les autres types d'hémoglobines résultent des combinaisons oligomériques identiques deux à deux), entre chaînes  $\alpha$  et chaînes non  $\alpha$ . Les associations intercaténaires permettent de décrire trois hétérodimères majoritaires. Ceux-là présentent chez le sujet sain une distribution qui varie avec l'âge comme le montre le tableau I :

**Tableau I :**  
Variétés des dimères d'hémoglobine en fonction de l'âge

Type d'hémoglobine	Chez le nouveau-né	Chez l'adulte
HbA <sub>1</sub> ( $\alpha_2 \beta_2$ )	20 à 30 %	95 à 98 %
HbA <sub>2</sub> ( $\alpha_2 \delta_2$ )	traces	2 à 3 %
Hb F ( $\alpha_2 \gamma_2$ )	65 à 90 %	0,1 à 1 %

Cette structure quaternaire tétramérique existe sous deux formes fonctionnelles : la configuration R (ou Relax) pauvre en liaisons chimiques intercaténares, plus affine pour l'oxygène que la structure T (ou Tens) riche en ponts salins intercaténares [111].

Les deux conformères R et T sont en équilibre et la transition de l'un à l'autre est soumise à l'influence de divers effecteurs que sont l'oxygène (O<sub>2</sub>), le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), le 2, 3 -diphosphoglycérate (2, 3 -DPG), le monoxyde de carbone (CO) et le pH entre autres.

## III. LES HEMOGLOBINES PATHOLOGIQUES

On oppose classiquement deux types d'hémoglobinopathies selon qu'elles correspondent à un trouble quantitatif ou qualitatif. La première, appelée thalassémie, est liée à un déficit en chaîne surtout  $\beta$  et  $\alpha$ ,  $\delta$  ou  $\gamma$  plus rarement. La deuxième anomalie résulte de la mutation d'un gène de structure avec comme conséquence l'apparition d'une hémoglobine anormale. La drépanocytose ou hémoglobinopathie S

est de loin la plus fréquente. C'est le premier exemple démontré d'une maladie néféculaire.

L'hémoglobine S a pour formule  $\alpha_2^A \beta_2^A$  (6<sup>glu-val</sup>). (Elle est l'expression de la mutation du triplet codant GAG en GTG d'un gène porté par le bras court du chromosome 11 (45).

Sa structure primaire diffère de celle de l'hémoglobine A normale par la présence de la valine en lieu et place de l'acide glutamique 6<sup>e</sup> acide aminé de la chaîne  $\beta$  (Figure 2).

La substitution de l'acide glutamique (AA polaire) par la valine (AA neutre) entraîne des modifications stéréochimiques des structures secondaires, tertiaires et surtout quaternaires de l'hémoglobine.

Il en découle plusieurs conséquences fonctionnelles :

- une polymérisation irréversible de la désoxyhémoglobine S à l'origine de la déformation du globule rouge : c'est le principe du test d'EMMEL, test de dépistage rapide de la drépanocytose.
- une baisse de la solubilité de l'hémoglobine
- une modification de la charge globale de l'hémoglobine S à l'origine de sa différence de migration à l'électrophorèse par rapport à l'hémoglobine normale.
- une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène.

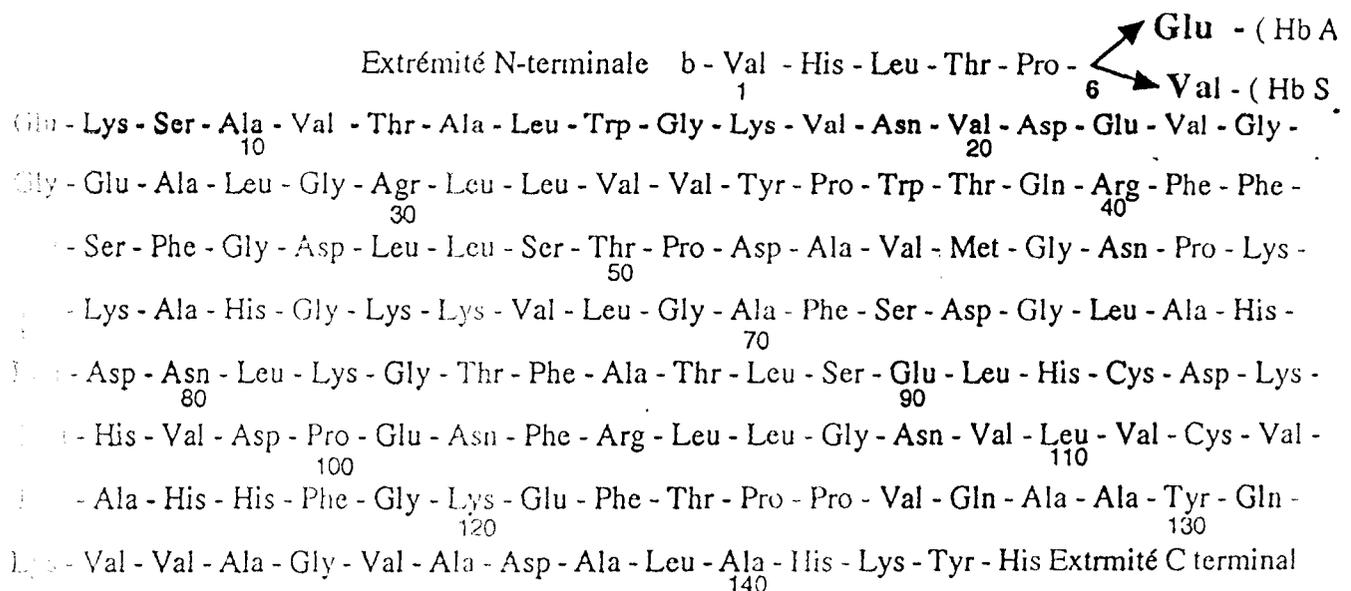


Figure 2 :

Séquence comparée de la chaîne  $\beta$  des hémoglobines A et S [40]

## II. CONSIDERATIONS GENERALES SUR LA DREPANOCYTOSE

### 1. EPIDEMIOLOGIE

L'hémoglobinopathie S présente une répartition ethnique et géographique particulière (Figure 3).

Les Noirs africains de la ceinture sicklémique qui s'étend du 20<sup>e</sup> parallèle de latitude Sud au 15<sup>e</sup> parallèle de latitude Nord sont les plus atteints : 40 % dans certaines ethnies d'Afrique Centrale (Congo, Zaïre, Nigéria), 20 % en Afrique de l'Est. Au Sénégal, la fréquence est de 10 % [118].

Cette affection est répandue aussi chez les Noirs de la diaspora avec 9 % aux États-Unis, 12 % aux Antilles françaises. Elle s'observe parfois chez les non mélanodermes du Moyen-Orient, en Arabie Saoudite, en Inde et dans bien d'autres pays [14].

Ici et là, dans le monde entier, en Afrique en particulier, cette maladie génétique constitue un réel problème de santé publique. Elle est responsable d'une mortalité de 50 % avant l'âge de 20 ans [96].

Les sujets atteints par la forme homozygote (SS) meurent en général avant l'âge de 20 ans, au décours d'une évolution émaillée de complications multiviscérales souvent imprévisibles interpellant toutes les spécialités médicales [13].

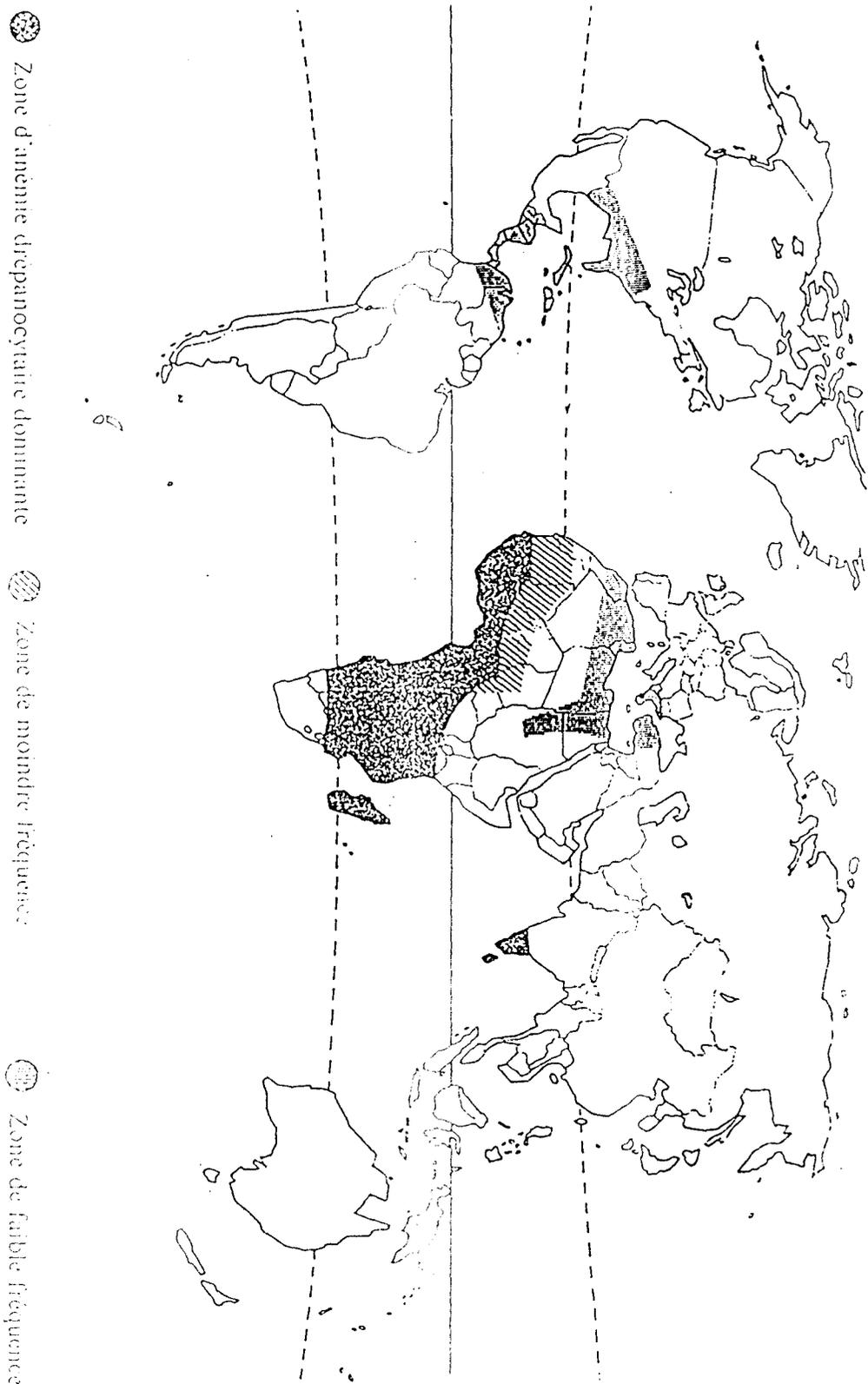


Figure 3 :

Répartition géographique de l'hémoglobine S [14]

## II.2. PHYSIOPATHOLOGIE

La physiopathologie de la maladie drépanocytaire relève de phénomènes complexes faisant intervenir divers processus morbides liés essentiellement à des altérations structurales et fonctionnelles de l'Hb S et de la membrane cytoplasmique. (Figure 4).

En effet l'Hb S à l'état désoxygéné (c'est-à-dire  $P_{aO_2} < 45$  mm Hg) polymérise et forme un gel à l'intérieur de l'érythrocyte. Cet agrégat fait de plusieurs molécules d'hémoglobine, stabilisé par des liaisons chimiques inter et intramoléculaires, entraîne la déformation du globule rouge et étire la membrane cytoplasmique. Celle-là perd alors sa forme normalement discoïde, sa plasticité et fait l'objet de destruction par le système réticulo-endothélial hépatique et par la rate (hypersplénisme).

La membrane soumise ainsi au stress mécanique de l'étirement subit également les effets néfastes de la peroxydation lipidique particulièrement intense chez le drépanocytaire [29, 112].

Il en résulte des pertes en acides gras au sein des lipides riches en doubles liaisons avec enchaînement malonique et une destabilisation de la membrane du globule rouge.

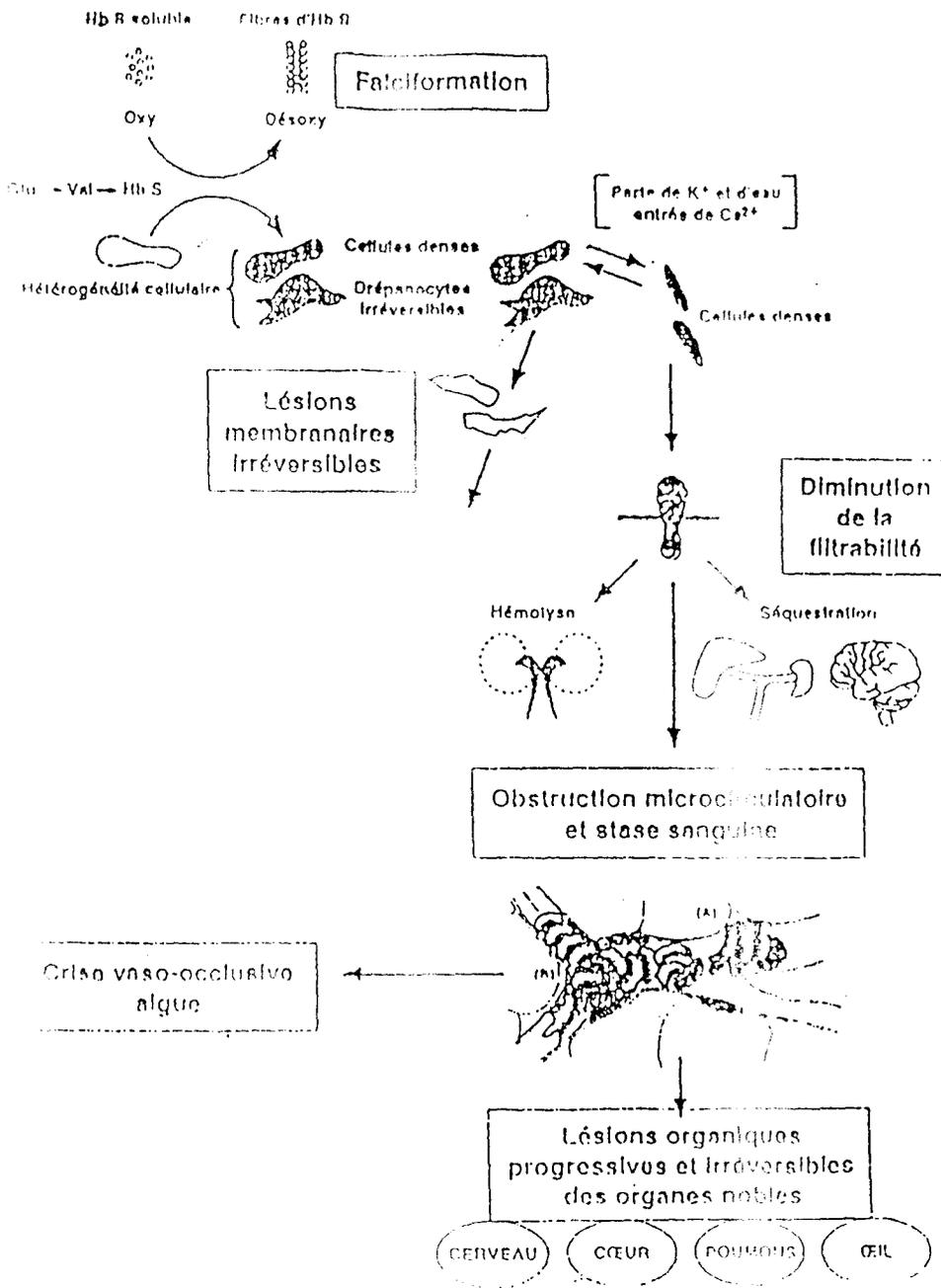
La perturbation chimique de la membrane cytoplasmique induit alors une entrée importante de sodium ( $3Na^+$ ) contre une sortie de potassium ( $2K^+$ ) de la cellule [30, 87].

L'intrusion concomitante de calcium ( $Ca^{2+}$ ) stimule le canal potassique  $Ca^{2+}$ -dépendant : c'est l'effet GARDOS [6] mais aussi la peroxydation [86]. Le déséquilibre de l'homéostasie ionique intra-érythrocytaire entraîne une déshydratation qui à son tour accentue la polymérisation de l'hémoglobine S. Ce cercle vicieux est associé à des troubles hémorhéologiques [57, 66] liés à une hyperviscosité sanguine et à une importante adhésivité des drépanocytes à l'endothélium vasculaire [74]. Ces troubles sont responsables du syndrome vaso-occlusif [66] qui par suite d'infarctus répétés de la rate entraîne l'asplénie fonctionnelle accentuant la déficience immunitaire du drépanocytaire [76, 110].

Ces thromboses vasculaires peuvent également toucher divers autres organes et engendrer le pronostic vital du malade.

Le caractère multifactoriel du processus physiopathologique de la drépanocytose laisse déjà entrevoir le polymorphisme des manifestations cliniques.

**Polymérisation de la désoxy Hb S**



**Figure 4 :**  
 Physiopathologie de la crise drépanocytaire [33]

## A. MANIFESTATIONS CLINIQUES DE LA DREPANOCYTOSE

La drépanocytose homozygote, à l'inverse de la forme hétérozygote asymptomatique, présente une expression clinique à la fois riche et variée. Elle peut en effet revêtir divers aspects cliniques différents les uns des autres d'un malade à un autre, d'une crise à une autre chez un même patient.

Les signes cliniques souvent imbriqués peuvent être rangés selon leur sévérité dans l'une ou l'autre des stades évolutifs suivants :

- 1) la phase intercritique,
- 2) la crise drépanocytaire,
- 3) les complications.

La phase intercritique est le plus souvent paucisymptomatique. L'anémie est la manifestation la plus fréquente. C'est une anémie hémolytique (normocytaire, normochrome, régénérative habituellement). Elle apparaît à un âge variable, habituellement après 6 mois, âge de déplétion de l'Hb F. Le degré de l'anémie est différent d'un malade à un autre. Les formes sévères peuvent être observées dès le second semestre de la vie extra-utérine avec des taux d'hémoglobine parfois inférieurs à 5 g/l. Les formes modérées sont cependant les plus couramment rencontrées. Il s'agit d'anémie chronique bien tolérée. C'est la survenue des crises qui détermine le véritable handicap.

La crise drépanocytaire est un accident aigu douloureux, lié d'une part à des thromboses vasculaires causées par l'agglutination de drépanocytes, d'autre part à une hémolyse massive. La survenue toujours possible de ces troubles hémorhéologiques dans n'importe quel territoire du lit vasculaire, explique les atteintes multiviscérales et le polymorphisme clinique de la maladie drépanocytaire.

Les crises ostéo-articulaires sont fréquentes. Elles peuvent se résumer au "syndrome mains-pieds". Il s'agit en général d'une tuméfaction aiguë et douloureuse des membres. La peau en regard est tendue, chaude et douloureuse. La paume et la plante sont oedémateuses, les doigts et les orteils boudinés.

Les manifestations abdominales elles, surviennent isolément ou imbriquées à la crise ostéo-articulaire. Elles se résument le plus souvent à un iléus paralytique caractérisé par un syndrome pseudo-occlusif.

Les manifestations ostéo-articulaires et abdominales s'accompagnent le plus souvent d'une fièvre mais sans infection sous-jacente. Cependant, une infection peut être le facteur déclenchant d'une crise drépanocytaire. La gravité potentielle des infections toujours préjudiciables au drépanocytaire, fait de la fièvre une urgence médicale. Aussi devant toute hyperthermie, l'enquête bactériologique, infectieuse en général, devra-t-elle être systématique avec une antibiothérapie et/ou un traitement antifongique si besoin.

Les crises hématologiques correspondent à une déglobulisation massive se greffant sur un fond d'anémie chronique. Cette hyperhémolyse entraîne une anémie aiguë, un ictère intense, un collapsus hypovolémique menaçant. Elle peut décompenser une cardiopathie pré-existante.

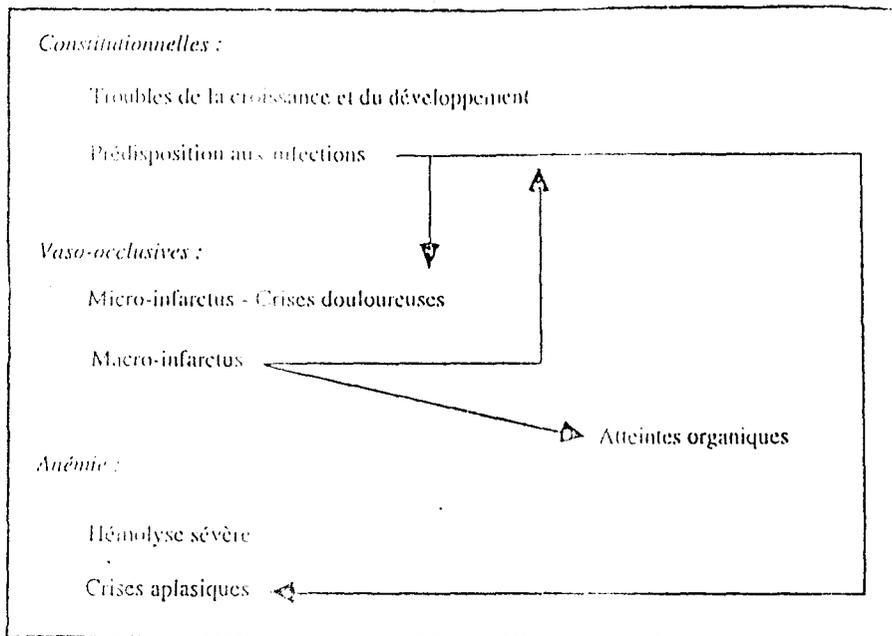
L'ensemble de ces manifestations aiguës, sans cesse à craindre chez le drépanocytaire, peut laisser place à des complications osseuses, spléniques, cardiaques, rénales et pulmonaires entre autres. La plupart de ces atteintes sont dues à des thromboses vasculaires par des hématies falciformées et rigides qui s'agglutinent dans le lit vasculaire. Elles évoluent chacune pour son compte et peuvent engager le pronostic fonctionnel voire vital du drépanocytaire.

Les infarctus osseux sont les complications les plus fréquentes. Tous les os peuvent être atteints mais plus particulièrement les zones hypervascularisées du fémur et de l'humérus. Les infarctus les plus à redouter sont ceux des épiphyses et surtout de la tête fémorale. Négligée, cette atteinte entraîne une ostéonécrose à l'origine de séquelles orthopédiques le plus souvent très invalidantes.

Les infarctus répétés de la rate aboutissent à l'asplénie fonctionnelle. La défaillance splénique rend le sujet drépanocytaire particulièrement vulnérable aux infections surtout à germes encapsulés [97]. Ce risque infectieux constitue un danger permanent au cours de la vie du drépanocytaire.

L'infarctissement toujours possible des différents autres organes est à l'origine de diverses manifestations cliniques. Les symptômes les plus fréquents sont résumés dans le tableau II.

**Tableau II :**  
Manifestations cliniques



## II.9. TRAITEMENT DE LA DREPANOCYTOSE

Le traitement comporte 2 volets : celui de la prise en charge de la phase critique et le traitement préventif pendant la phase intercritique.

Malgré les multiples investigations menées dans le but de conjurer l'évolution émaillée de complications parfois fatales, l'approche thérapeutique n'en est que très incertaine, au mieux largement symptomatique ou expérimentale quand elle se veut spécifique. Le traitement habituellement institué a pour but d'améliorer l'état hémodynamique, calmer la douleur et éventuellement corriger le facteur déclenchant.

La réhydratation constitue l'essentiel du traitement. Elle permet de diminuer la viscosité et l'hémoconcentration, sources de thromboses, d'anoxie et d'acidose. Le rapport hydroélectrolytique devra être suffisant (150 ml/kg/24 h) réparti dans le jour et la nuit.

La surveillance concernera la diurèse, la tolérance cardiaque, si possible l'hématocrite, l'ionogramme sanguin et urinaire. Le traitement médicamenteux le plus souvent utilisé est fait d'antalgiques et de vasodilatateurs. Le choix est le plus souvent porté sur l'aspirine qui est à la fois antalgique et anti-agrégant plaquettaire. Elle est utilisée à la posologie de 50 mg/kg/j. L'association d'un vasodilatateur semble abréger et atténuer la crise drépanocytaire.

L'ensemble de ces moyens thérapeutiques souvent efficaces dans les crises mineures, nécessite parfois d'être accompagné d'une transfusion sanguine adéquate. Celle-là sera surtout réservée aux cas d'extrême nécessité à cause des accidents et des risques infectieux (à VIH en particulier). Son efficacité est réhaussée par l'oxygénothérapie souvent associée et qui améliore l'hématose.

Les moyens thérapeutiques aussi divers soient-ils ne sont que des traitements symptomatiques. Ils ne mettent en aucun cas définitivement le drépanocytaire à l'abri d'une nouvelle crise.

## II.5. LES PERSPECTIVES D'UNE THERAPEUTIQUE SPECIFIQUE DE LA DREPANOCYTOSE

Depuis que l'on connaît avec précision la lésion moléculaire et certains mécanismes responsables de la pathogénie de la drépanocytose, divers travaux ont été entrepris dans le but de définir une thérapeutique spécifique [15, 80, 81, 109]. C'est dans ce cadre qu'un grand nombre de molécules ont été testées [42].

Les produits utilisés sont soit des composés à tropisme hémoglobinique, soit des molécules interagissant avec la membrane cytoplasmique de l'hématie ou alors des modulateurs de l'expression des gènes de globine.

Parmi les agents se liant à l'hémoglobine, les résultats expérimentaux les plus probants ont été obtenus avec l'urée [38], le cyanate [21], le phosphate de pyridoxal [11, 88], les moutardes azotées [116] et surtout l'acétylsalicylate (Aspirine®) entre autres.

Ces divers agents chimiques, sans nul doute inhibiteurs de la falciformation, présentent à l'exception de l'acide salicylique l'inconvénient d'être le plus souvent toxiques pour une utilisation thérapeutique.

L'aspirine a une forte stéréospécificité pour les zones de la molécule d'hémoglobine directement impliquées dans le mécanisme de la polymérisation : elle inhibe ainsi la falciformation du globule rouge [93].

L'espoir suscité par l'acide salicylique est cependant déçu par le problème non résolu de la perméation de la membrane érythrocytaire de ce composé polaire ainsi que de ses dérivés.

Des molécules capables d'interagir avec les membranes cellulaires ont aussi été testées dans le but de prévenir la falciformation. Une des premières observations concerne des essais pratiqués avec des hormones stéroïdes [82].

L'apparente action bénéfique de cet agent a été remise en cause par les essais cliniques. Il en va de même des tests au dexaméthasone [59].

D'autres composés, susceptibles d'interagir avec la membrane du globule rouge et d'induire des modifications morphologiques, ont également été testés [121].

Le zinc est l'un des plus anciennement connus [18]. Son efficacité résulterait de son action inhibitrice sur l'ATPase calcium-dépendante, à l'origine de la diminution d'accumulation intra-érythrocytaire de calcium [17].

Une inhibition de la falciformation est également observée avec l'utilisation de divers produits tels que les neuroleptiques (Thioridazine, chlorpromazine) et les anesthésiques locaux (chlorhydrate de procaine) entre autres.

Tous ces agents interagissant avec la membrane sont lipophiles. Ils s'intègrent dans la bicouche lipidique et modifient la perméabilité membranaire aux ions. La conséquence est une augmentation plus ou moins importante du volume cellulaire et partant une diminution de la concentration intra-érythrocytaire en hémoglobine. La dilution résultante a pour effet essentiel d'inhiber la polymérisation de l'hémoglobine. Les effets de ces produits, souvent nets in-vitro, ne sont très souvent pas corrélés avec les résultats des essais cliniques; qui plus est, leur innocuité chez l'être humain reste encore à prouver.

C'est pourquoi, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, les recherches sont de plus en plus orientées vers l'utilisation de facteurs modulateurs de l'expression du gène de hémoglobine F mais aussi vers l'emploi des techniques de génie génétique [23, 46].

Ainsi il a été mis en évidence par De SIMONE et Coll. [46] que la 5-azacytidine stimulait chez le babouin la synthèse de l'hémoglobine F, inhibiteur connu de la polymérisation de l'hémoglobine S [84]. L'essai clinique avec ce produit chez les malades a abouti à des résultats probants selon LEY et coll. [98].

Les risques cancérigènes de ce composé font cependant accueillir cette médication avec une très grande réserve. Actuellement dans le domaine de la biologie moléculaire les espoirs sont à l'évidence centrés sur la thérapie génique. Elle a pour objectif principal de corriger la mutation au niveau même de l'ADN [4, 5, 32].

Son application, véritable lueur d'espoir, est encore malheureusement du domaine de la science-fiction et dans tous les cas peu accessibles pour les pays pauvres.

Le bilan actuel de l'ensemble des essais thérapeutiques à la recherche d'un traitement radical de la drépanocytose montre que les résultats les plus probants ont été obtenus avec les agents lipophiles. L'interaction de ces composés avec les lipides membranaires inhibe la falciformation de l'hématie. Cela explique toute l'importance des phospholipides du drépanocyte et partant le rôle potentiellement déterminant de la peroxydation lipidique dans la physiopathologie de la maladie drépanocytaire.

### III. RAPPELS SUR LA MEMBRANE : ASPECTS STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS

Le modèle architectural de la membrane actuellement admis est celui de SINGER et NICOLSON [125] selon le schéma de la mosaïque fluide (Figure 5).

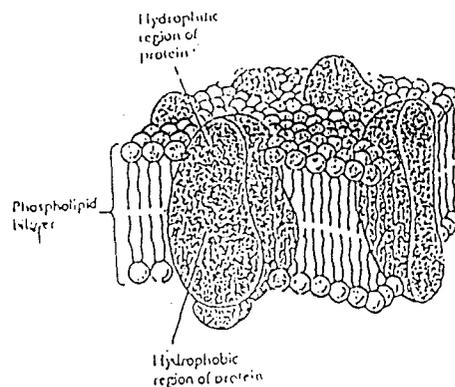


Figure 5 :

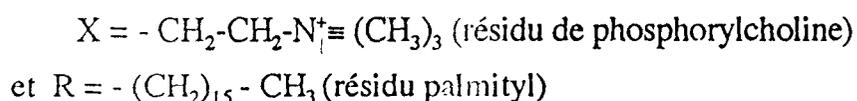
Modèle membranaire de la « mosaïque fluide » [125]

Ce schéma recouvre non seulement l'aspect structural mais aussi et surtout la dynamique moléculaire qui est le support de multiples fonctions biologiques de la membrane. Celle-là est essentiellement constituée de phospholipides qui forment une

couche bilamellaire visqueuse dans laquelle sont enchassés protéines et cholestérol. Ces lipides structuraux se répartissent en glycérophospholipides et en sphingolipides.



Dans cette classe phospholipidique formée par la sphingomyéline et les cérébrosides, X et R constituent également des facteurs de variabilité. Cependant dans la membrane érythrocytaire, le sphingolipide prépondérant est la sphingomyéline. Dans ce cas :



A ces divers composés phospholipidiques sont dévolues la survie, les fonctions de transfert de molécules, de signaux biologiques et les propriétés de plasticité membranaire du globule rouge [20, 22, 92].

Les acides gras polyinsaturés de l'une ou l'autre des deux classes des lipides structuraux de la membrane érythrocytaire présentent des doubles liaisons maloniques : cibles privilégiées des attaques radicalaires [39, 56]. Ce faisant, la relation stress oxydatif des lipides et hyperhémolyse laisse entrevoir toute l'importance de la peroxydation lipidique dans la pathogénie de l'anémie hémolytique observée chez le drepanocytaire [113, 123].

#### IV. RAPPEL SUR LA PEROXYDATION LIPIDIQUE

La peroxydation lipidique est une attaque oxydative des doubles liaisons maloniques des acides gras polyinsaturés qui sont les composants essentiels des phospholipides de la membrane de l'hématie. Il s'agit d'un phénomène ubiquitaire initié et entretenu par la présence de radicaux libres oxygénés (RLO).

##### IV.1. RADICAUX LIBRES OXYGENES ET MECANISMES DE REGULATION

Le radical libre oxygéné (R.L.O.) se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécules oxygénés porteurs d'un ou plusieurs électrons libres, non appariés. La recherche avide par ces espèces chimiques d'électrons pour réappairier leur électron célibataire et recouvrer leur stabilité en fait un danger pour les molécules environnantes, notamment les acides gras polyinsaturés et partant pour l'intégrité membranaire [39].

L'oxygène, support vital de la vie aérobie habituellement stable, peut être activé au cours du métabolisme cellulaire [47, 52]. Il génère alors d'une manière

physiologique ces espèces chimiques très actives que sont les radicaux libres oxygénés (RLO) (tableau III).

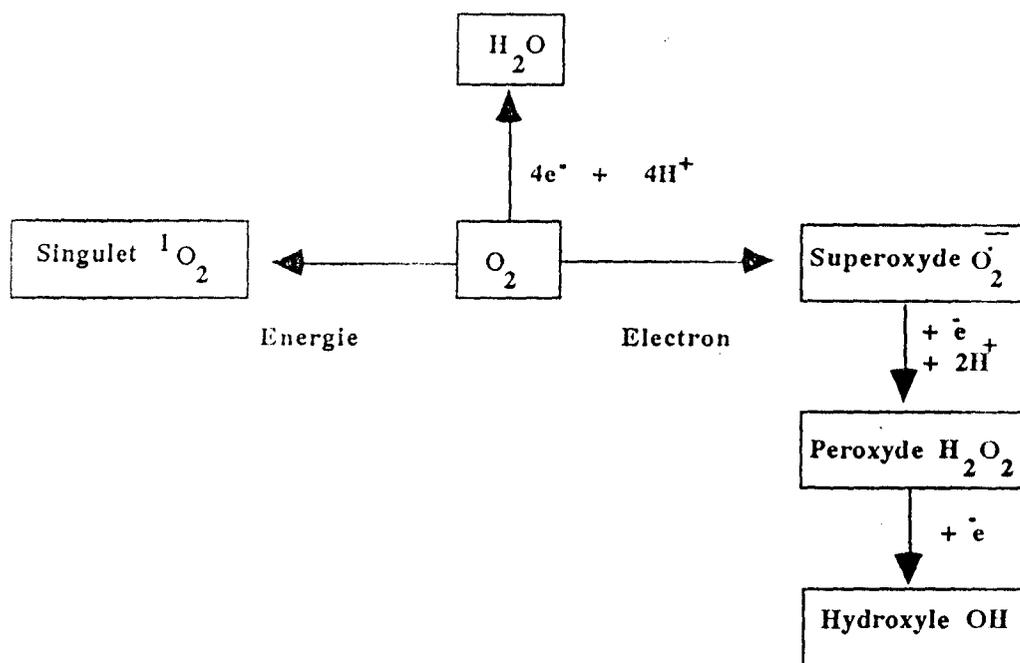
**Tableau III :**  
Radicaux libres oxygénés

	Formule	Dénomination	Stabilité
	$O_2$	Oxygène moléculaire	Stable
1	$O_2^-$	Ion superoxyde	Instable
2	$H_2O_2$	Peroxyde d'hydrogène	Moins instable
3	$\cdot OH$	Radical hydroxyle	Très instable
4	$^1O_2$	Oxygène singulet	Le plus instable
5	$ROO\cdot$	Radical peroxyde	Instable
6	$RO\cdot$	Radical alkoxyde	Instable

Dans ce symbolisme le signe "-" rappelle la charge électrique négative (anion) et le point "." l'existence d'un électron célibataire.

Les formes 1, 3, 5, et 6 sont les véritables RLO. On y rattache 2 et 4 à cause de leur participation à la toxicité de l'oxygène sans être stricto sensu des radicaux libres.

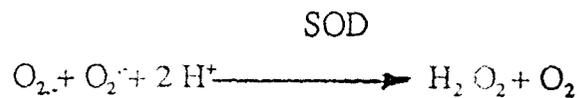
La production de RLO se fait selon le mécanisme suivant :



**Figure 6 :**  
Mécanisme de formation des RLO

Le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) est le produit de la réduction univalente de l'oxygène moléculaire. Cette réduction survient soit au cours des réactions enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale soit comme conséquence de l'action de différents facteurs exogènes (radiations ionisantes et produits chimiques entre autres). Il s'agit de l'espèce la plus couramment générée par les cellules [52]. Il est en particulier formé au cours de stress accompagné d'une très forte consommation d'oxygène.

La dismutation de l'anion superoxyde par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) conduit à la formation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).



$H_2O_2$  peut également résulter de la réduction bivalente de l'oxygène sous l'action de différentes enzymes : NADH déshydrogénase, xanthine oxydase, uricase et mono-amine oxydase entre autres. La xanthine oxydase par exemple génère de l'eau oxygénée selon le schéma suivant :

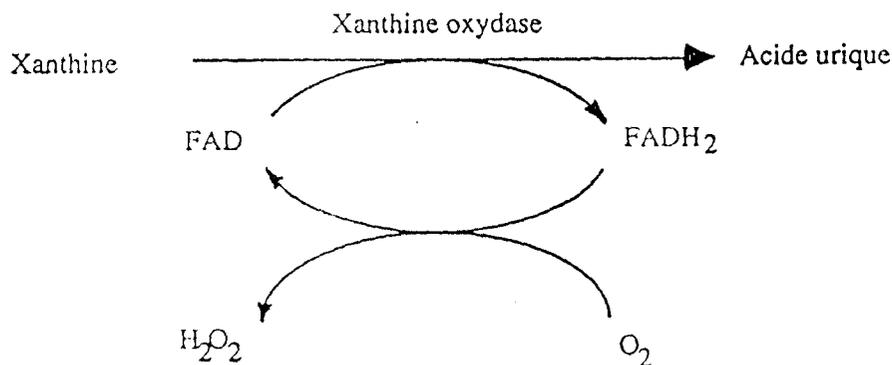


Figure 7 :  
Formation de  $H_2O_2$  par la xanthine oxydase [50]

En présence de complexes de fer, l'eau oxygénée se décompose en radical hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ) et en oxygène singulet ( $^1O_2$ ) qui sont des espèces chimiques à très fort pouvoir oxydant.

La dégradation de  $H_2O_2$  peut se produire par la réaction de FENTON :



Elle peut également être induite par l'action secondaire de  $O_2^{\cdot -}$  sur  $H_2O_2$  selon la réaction d'HABER-WEISS :

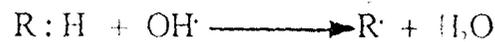


Cette réaction est catalysée par les ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ).

Ces schémas réactionnels témoignent de l'importance des métaux de transition comme le fer dans la genèse des espèces radicalaires [7, 103].

## 2. PEROXYDATION LIPIDIQUE ET FACTEURS DE PROTECTION

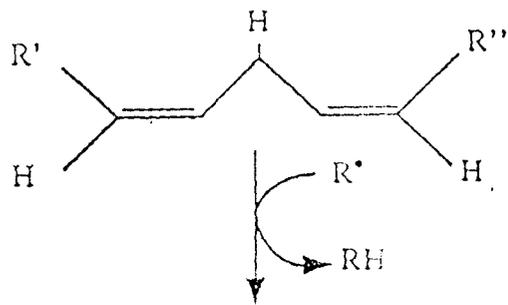
Les différentes espèces radicalaires vont attaquer les doubles liaisons maloniques des acides gras polyinsaturés des phospholipides qui sont les constituants structuraux fondamentaux des membranes biologiques. L'attaque se fait au niveau de la structure divinylméthane présente dans les acides gras polyinsaturés. Il s'ensuit l'arrachement d'un atome d'hydrogène et une rupture de la liaison covalente avec production à la fois d'un autre radical et de l'eau :



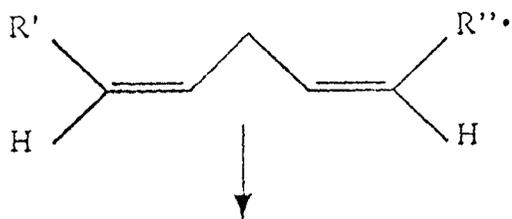
L'enclenchement de cette étape inaugurale du processus de peroxydation lipidique est favorisé par le caractère non conjugué des graisses biologiques.

En effet l'enchaînement malonique confère aux atomes d'hydrogène allylique des  $-CH_2-$  une très grande mobilité. Les radicaux libres, porteurs d'un ou plusieurs électrons non appariés vont arracher cet hydrogène et générer un radical libre sur la chaîne continue de l'acide gras polyinsaturé. Le nouveau radical va à son tour réagir rapidement avec l'oxygène pour former un radical peroxyde. Celui-là, chimiquement très actif, entretient le processus peroxydatif en arrachant l'atome d'hydrogène d'une autre molécule d'acide gras. Il en résulte alors une cascade de réactions radicalaires [58].

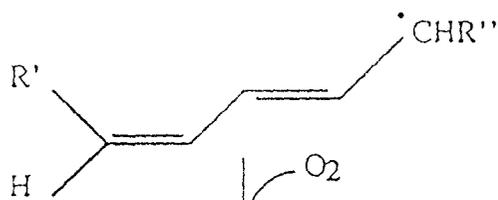
L'ensemble de ce processus initié et entretenu par les radicaux libres oxygénés correspond à la peroxydation lipidique et se schématise comme suit (Figure 8) [31] :



Réaction d'initiation



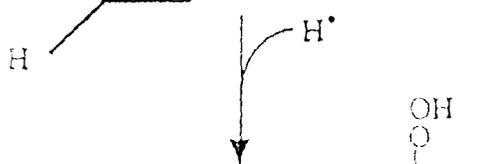
Réaction de propagation



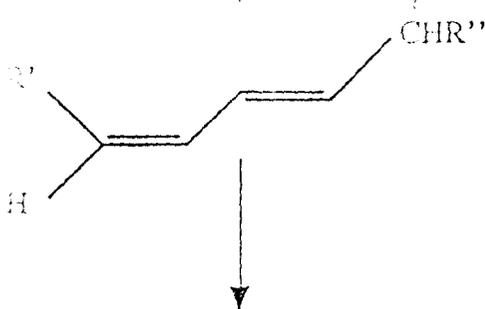
Réarrangement des doubles liaisons



Formation d'un peroxy radical



Formation d'un hydroperoxyde instable



Produit de décomposition (Aldéhyde, alcane, MDA ... etc )

Figure 8 :  
Peroxidation des acides gras polyinsaturés

Au cours du processus radicalaire de peroxydation lipidique, de nombreux composés oxygénés sont produits. Parmi ces métabolites, les hydroperoxydes très labiles se décomposent en malondialdéhydes, en diènes conjugués, en hydrocarbures (ethane, pentane) et en lipofuchsine.

Ces divers composés par leur toxicité vont accentuer les effets délétères de la peroxydation lipidique sur les constituants phospholipidiques de la membrane cytoplasmique. Le danger représenté par les attaques radicalaires des doubles liaisons des composants chimiques de l'organisme vivant est contrôlé par différents systèmes les uns endogènes et les autres exogènes.

Le système endogène non enzymatique regroupe à la fois les facteurs qui complexent les métaux de transition et ceux qui se comportent en piègeurs de radicaux libres, encore appelés "scavengers". Parmi les métalloprotéines de l'équipement non enzymatique, la transferrine ou sidérophilline et la céruléoplasmine jouent un rôle important de protection contre le stress oxydatif. Elles vont inhiber la formation du radical  $\text{OH}\cdot$  en complexant les métaux de transition, ou catalyser l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique sans libération de radicaux libres oxygénés [1, 7, 68].

D'autres facteurs non enzymatiques mais non moins importants protègent aussi contre la peroxydation lipidique. Il s'agit :

- de l'albumine,
- de l'haptoglobine
- de l'acide urique,
- du glucose
- et de la bilirubine [3, 127].

Ces différents composés constituent le pool de scavengers qui vont piéger les radicaux libres et entraver ainsi l'initiation et l'amplification du processus de la lipidoperoxydation. Cependant l'essentiel de la protection membranaire contre les attaques radicalaires est assuré par les enzymes que sont la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPX) [2, 34].

C'est en 1969 que Mc CORD et FRIDOVITCH [102] ont décrit les propriétés catalytiques des superoxydes dismutases. Ces enzymes catalysent de façon efficace la dismutation des radicaux superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) en oxygène et en peroxyde d'hydrogène.

Chez les mammifères on trouve deux superoxydes dismutases selon les propriétés résumées dans le tableau IV :

**Tableau IV :**  
Résumé des propriétés des superoxydes dismutases chez l'Homme

	Métal	Nombre de Monomèrese par molécule	Inhibition par le cyanure (CN)	Distribution tissulaire	Localisation intracellulaire	Localisation chromosomique du gène de structure
$SOD_1$	Cu-Zn	2	Oui	Tous les tissus	Essentiellement cytoplasmiques	Chromosome 21
$SOD_2$	Mn	4	Non	Tous les tissus sauf hématie	Mitochondriale	Chromosome 6

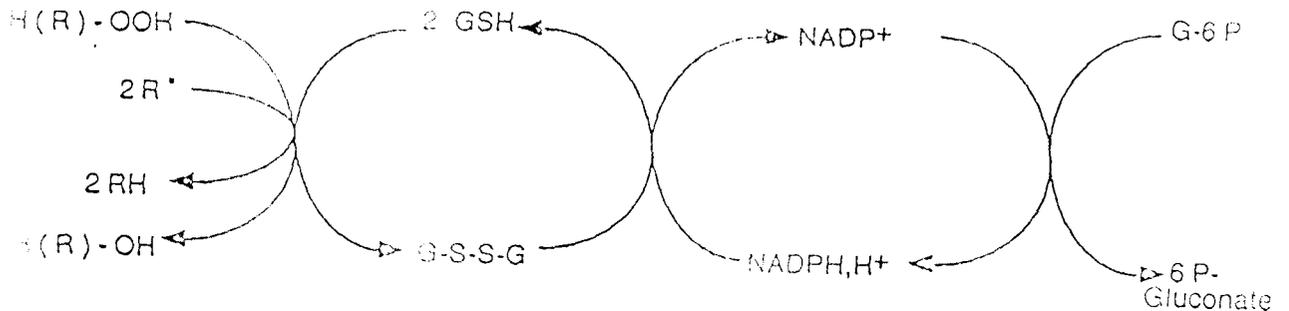
La  $SOD_1$  est la seule forme concernée par notre étude car contrairement à la  $SOD_2$  elle est présente au niveau de l'hématie.

Cette enzyme est une hétéroprotéine dont le groupement prosthétique est formé par  $Cu^{2+}$  et  $Zn^{2+}$ . Ces métaux, localisés au sein du site actif, sont indispensables à l'activité enzymatique de la  $SOD_1$  [128].

En ce qui concerne la glutathion peroxydase, il s'agit d'une enzyme sélénopépendante retrouvée au niveau du foie, des reins, des cellules sanguines en général et de l'érythrocyte en particulier. Elle attaque non seulement le peroxyde d'hydrogène mais également les hydroperoxydes d'acides gras avec comme donneur d'hydrogène le glutathion réduit. Son action se fait selon deux schémas réactionnels [24] :



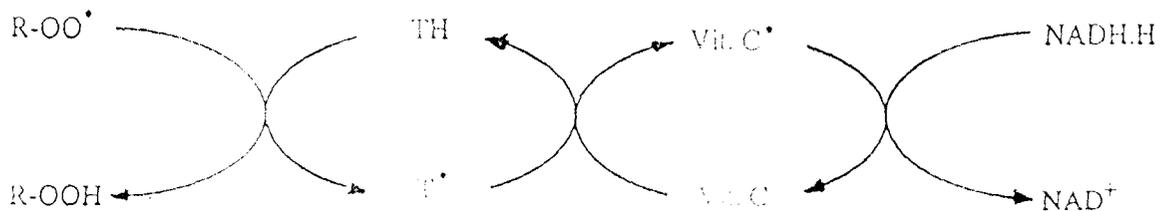
GSH est régénéré à partir du glutathion oxydé (GSSG) grâce au NADPH, H<sup>+</sup> fourni par la voie des pentoses phosphates.



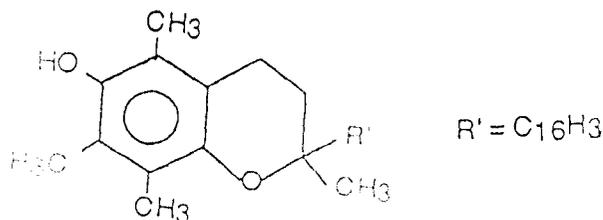
La Glutathion peroxydase est une métalloenzyme ayant dans son site actif un métalloïde : le sélénium indispensable à son activité enzymatique [115].

A tous ces facteurs endogènes de protection, s'ajoutent divers autres qui eux sont exogènes. Il s'agit en réalité de certaines substances d'origine alimentaire : vitamine E, vitamine C, vitamine A entre autres mais aussi des médicaments dotés de pouvoir anti-oxydant.

Ces composés vitaminiques régulent la peroxydation lipidique selon le schéma suivant :



Les membranes sont protégées par l' $\alpha$ -Tocophérol ( $\alpha$ TH), principal composant de la vitamine E de formule :



La présence d'une extrémité hydrophile et d'une longue chaîne hydrophobe permet à la fois le rôle protecteur de la vitamine E contre la peroxydation lipidique et sa incorporation dans la membrane cellulaire. C'est le groupe hydroxyle fixé sur le cycle benzénique de l' $\alpha$ -Tocophérol qui agit comme réducteur lors d'une agression radicalaire selon le schéma réactionnel suivant :



L'attaque radicalaire génère ainsi une autre forme de radical libre caractérisée par sa faible réactivité. La réaction en chaîne de la peroxydation lipidique se trouve ainsi interrompue ou tout au moins ralentie au niveau de la membrane [26].

Cependant la très faible quantité de Vitamine E dans les membranes cellulaires a permis de suggérer l'idée de sa régénérescence par une autre molécule telle que l'ascorbate (ou vitamine C) [101].

L'action conjointe des vitamines E et C contribue à la régulation efficace de la peroxydation dans les membranes cellulaires.

La vitamine C possède en outre la propriété de réagir avec l'ion superoxyde et le radical hydroxyl avec production d'un radical semi-déhydroascorbate. C'est également un piègeur d'oxygène singulet. Le semi-déhydroascorbate se décompose selon la réaction :



En ce qui concerne les médicaments anti-oxydants, le répertoire est plus difficile à énumérer, en raison de la diversité de ces produits. Certains méritent d'être cités en raison de leur prescription courante en pratique médicale. Il s'agit de :

- l'allopurinol : il inhibe la xanthine oxydase qui normalement en présence d'oxygène catalyse la formation de l'ion superoxyde.
- le diméthylsulfoxyde : il est un agent anti-inflammatoire piègeur d'hydroxyl.
- les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens qui inhibent la formation de radicaux libres.

Ces différents composés endogènes et exogènes vont à des niveaux différents les uns des autres, inhiber le processus de la peroxydation lipidique : (Figure 9).

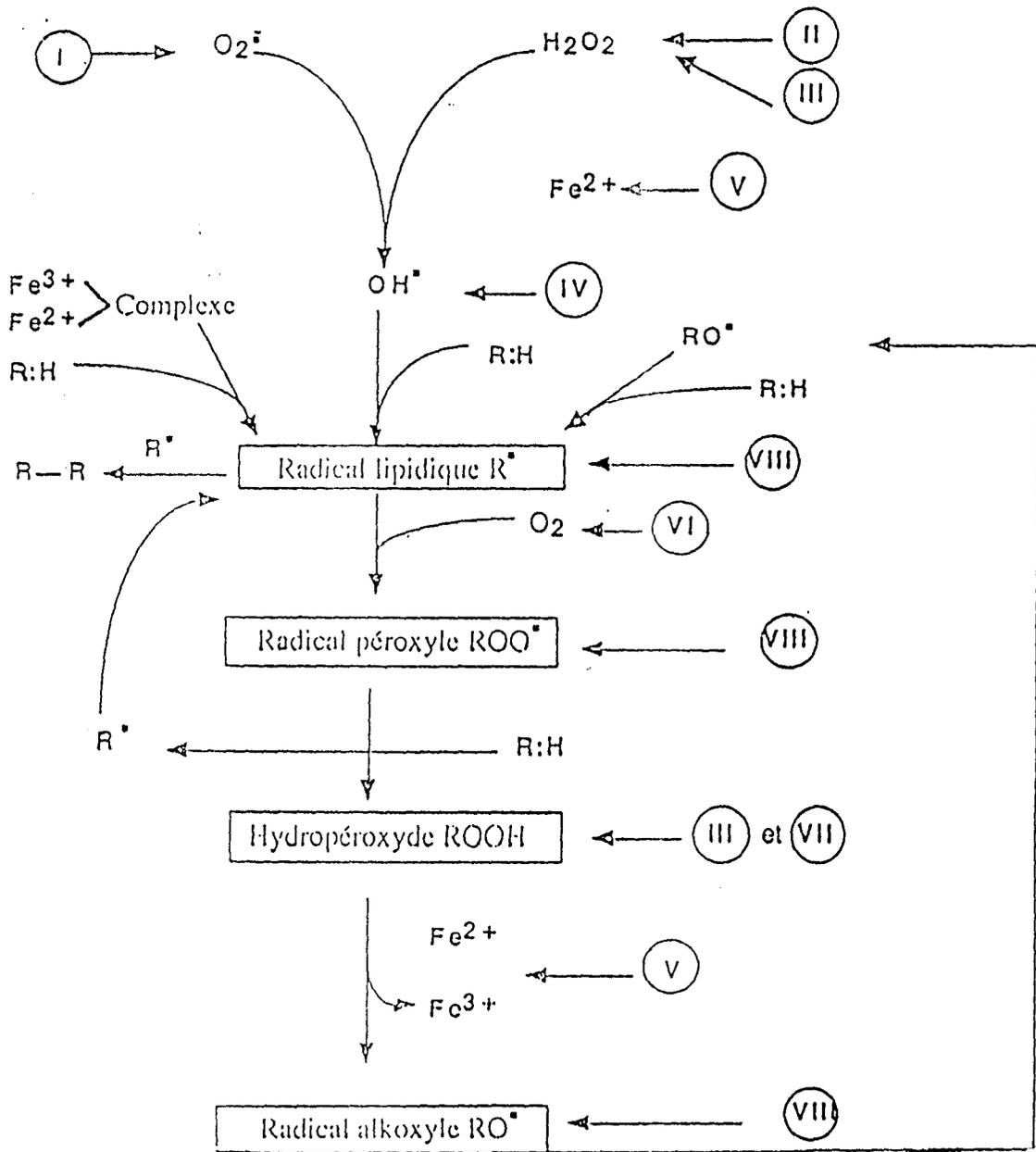


Figure 7 :

Cycle d'oxydation des AGPI et moyens de protection [47, 69]

- |                       |                          |
|-----------------------|--------------------------|
| (I) :                 | SOD                      |
| (II) :                | Catalase                 |
| (III) :               | GPX                      |
| (IV) :                | Acide urique, Vitamine E |
| (V) :                 | Céroléoplasmine          |
| (VI), (VII), (VIII) : | Vitamine E               |

A l'état physiologique, le stress oxydatif des lipides est en équilibre avec les facteurs de protection. C'est seulement en cas de dépassement du système anti-oxydant que les radicaux libres vont avoir des effets néfastes sur les fonctions et la survie du globule rouge.

#### IV.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE

La peroxydation lipidique est un phénomène ambivalent car à la fois bénéfique et toxique pour l'organisme vivant. L'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  par exemple intervient dans la phagocytose à double titre : d'abord en tant que précurseur d'espèces chimiques bactéricides ( $OH^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$ ) puis en tant que générateur d'un processus chimiotactique conduisant les phagocytes sur le lieu de production de  $O_2^{\cdot-}$  c'est-à-dire de l'inflammation. Un autre effet bénéfique est représenté par les voies de synthèse des prostaglandines et des leucotriènes [75]. En effet les attaques oxydatives de l'acide arachidonique membranaire par la lipo-oxygénase et la cyclo-oxygénase conduisent à la formation de ces substances à haute activité biologique. (Figure 10).

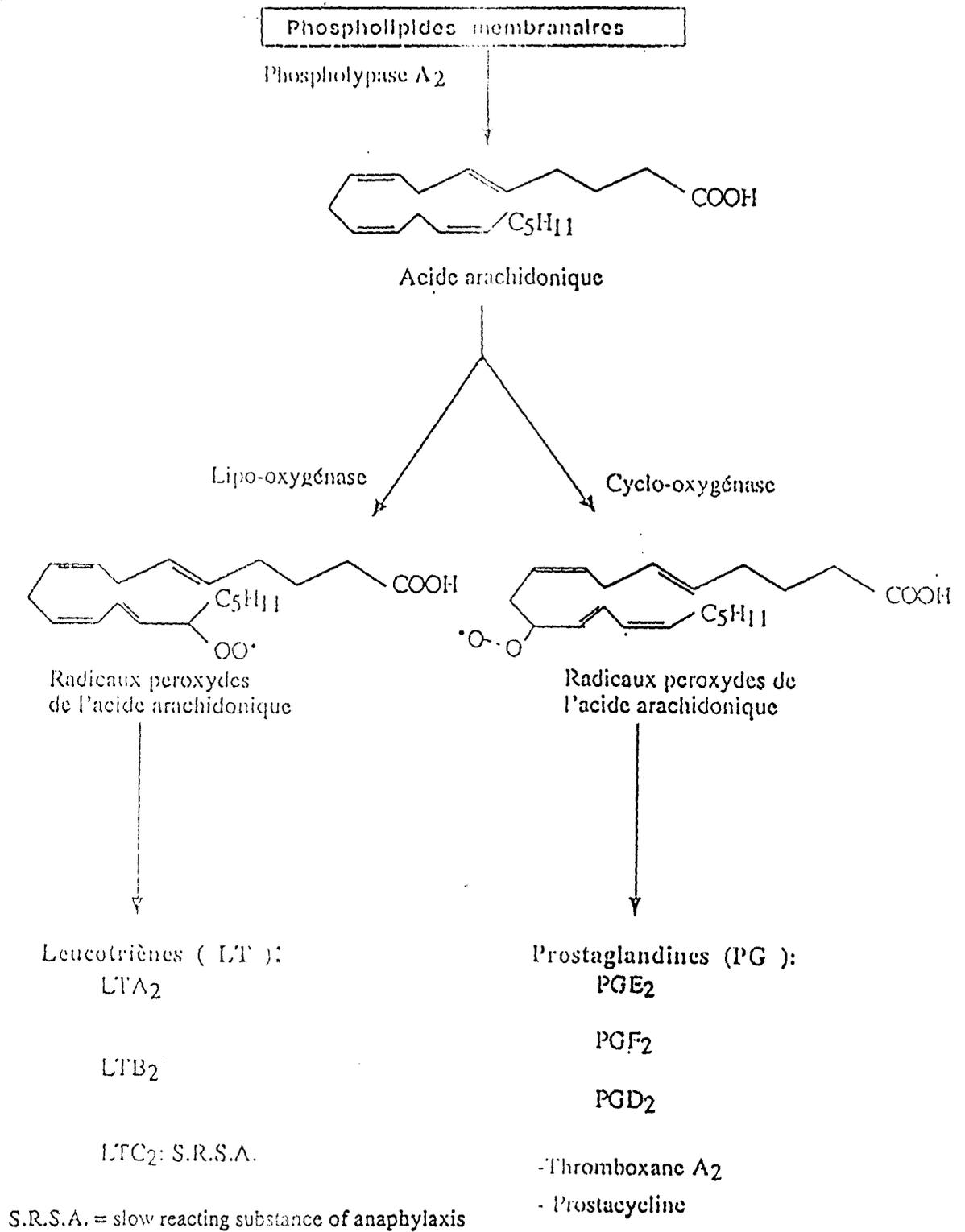


Figure 10 :  
Synthèse des prostaglandines et des leucotriènes.

Ces divers composés chimiques sont caractérisés par leurs propriétés biologiques extrêmement importantes et variées.

A l'inverse, la peroxydation lipidique peut occasionner des pertes lipidiques et une désorganisation à la fois structurale et fonctionnelle de la membrane érythrocytaire. Elle attaque les doubles liaisons maloniques des acides gras polyinsaturés et génère, au sein de la membrane, des radicaux libres. Ceux-là sont ensuite hydrolysés par les phospholipases en particulier la phospholipase A2 et relâchés dans le milieu extracellulaire. Les pertes lipidiques résultantes altèrent l'architecture bilamellaire de la membrane érythrocytaire, ses propriétés viscodynamiques et sa stabilité.

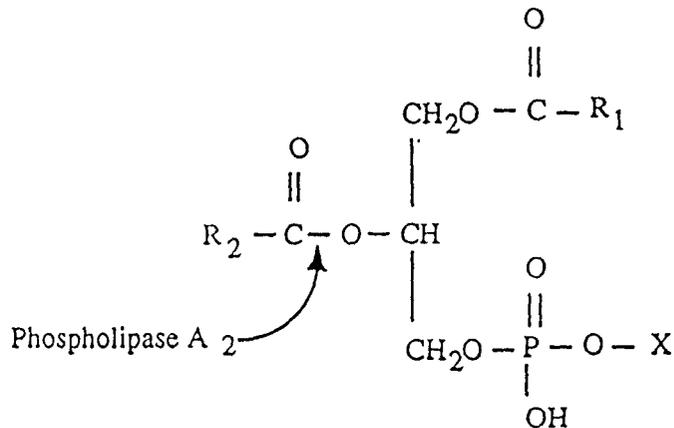
Les troubles conséquents correspondent essentiellement à une perte de la perméabilité sélective, de la plasticité de la membrane ainsi que de la morphologie normalement discoïde de l'hématie mûre ; car la forme cellulaire est étroitement liée à la surface. Il s'ensuit également des altérations des propriétés fonctionnelles membranaires (récepteurs, enzymes, transporteurs) dont le microenvironnement est composé de lipides [20, 22].

D'autres conséquences en particulier biophysiques ont été également décrites [114]. Il s'agit de l'augmentation de l'adhésivité endothéliale du globule rouge, de la diminution de la résistance électrique de la membrane, de la modification de la température de transition des lipides et de l'accroissement des échanges interlamellaires (flip-flop) entre autres, ainsi qu'une baisse de la fluidité membranaire.

A ces effets délétères directement liés à la peroxydation lipidique, s'ajoutent les effets toxiques du malondialdéhyde et des lysophosphatides [28, 85, 112]. Ces deux métabolites vont l'un et l'autre compromettre les fonctions de transport gazeux développées aux globules rouges par l'intermédiaire de son contenu hémoglobinique, mais surtout compromettre la survie du drépanocyte.

Le malondialdéhyde, par sa très grande réactivité, présente une affinité pour les groupements SH, NH<sub>2</sub> des protéines et des acides nucléiques. Son interaction avec ceux des lipides entraîne une désorganisation structurale et fonctionnelle de la membrane cytoplasmique.

Les lysophosphatides tiennent leur toxicité de leur pouvoir hyperhémolysant. Ils induisent la destruction massive de globules rouges avec comme conséquence une anémie hémolytique accentuée par l'hypersplénisme habituel du drépanocytaire. Les dérivés lyso. résultent de l'hydrolyse, par la phospholipase A<sub>2</sub>, des radicaux libres d'origine lipidique. Ils sont le plus souvent issus de l'attaque peroxydative des acides gras polyinsaturés estérifiant la fonction alcool secondaire des glycérophospholipides comme le montre le schéma suivant [120] :



La stimulation de cette enzyme par les radicaux libres et par leurs métabolites laisse entrevoir non seulement l'augmentation des lysophosphatides mais aussi le rôle potentiel de la lipidiperoxydation dans la pathogénie de l'hyperhémolyse des drépanocytes [12].

Cela montre une fois de plus l'intérêt physiopathologique de l'étude des lipides et du système lipidiperoxydation / facteurs antioxydants érythrocytaires au cours de la drépanocytose.

**DEUXIEME PARTIE :**  
**ETUDE**  
**EXPERIMENTALE**

Le travail expérimental a comme objectif principal l'évaluation de l'intensité de la peroxydation lipidique, des anomalies biochimiques conséquentes ainsi que celles du système antioxydant au sein de la membrane du drépanocyte.

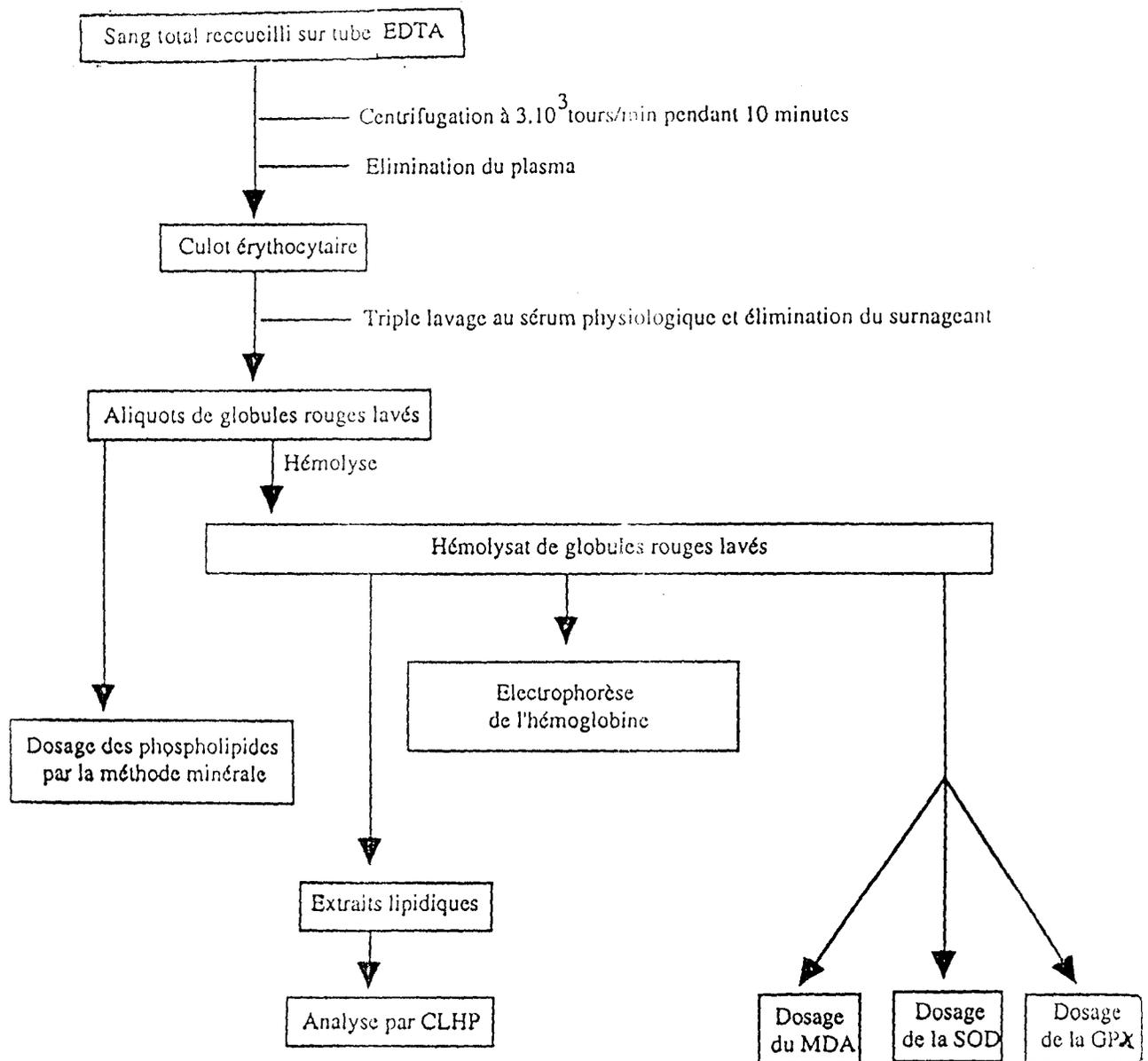
Cette démarche s'articule autour de deux grands axes à savoir :

- l'analyse par chromatographie liquide haute pression (CLHP) des lipides membranaires.
- le dosage du malondialdéhyde (MDA), la mesure de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion peroxydase (GPX) de la membrane du globule rouge.

Elle présente un double intérêt , celui de permettre l'étude des lipides : cibles privilégiées du stress oxydatif , mais aussi de s'intéresser aux deux principales enzymes du capital antioxydant endogène. Elle recherche ainsi un éventuel déséquilibre du système lipidoperoxydation / facteurs de protection au cours de la drépanocytose.

Notre étude a été menée en deux étapes ; la phase préliminaire a consisté en l'analyse des lipides membranaires. Elle a été suivie de l'évaluation à la fois de l'intensité de la lipidoperoxydation et des systèmes de protection.

# I. SCHEMA GENERAL DE L'ETUDE



- MDA : Malondialdéhyde
- SOD : Superoxyde dismutase
- GPX : Glutathion peroxydase
- CLHP : Chromatographie Liquide Haute Pression
- EDTA : Ethylène Diamine Tétracétate

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1. CHOIX DES SUJETS

L'échantillonnage a concerné 213 sujets, tous de race noire, répartis en trois groupes

- sujets témoins AA (n = 78)
- sujets drépanocytaires AS (n = 91)
- sujets drépanocytaires SS (n = 44)

Il s'agit soit de sujets recrutés au sein de l'entourage professionnel et familial, soit de drépanocytaires suivis à l'Hôpital Pédiatrique Albert Royer du CHU Fann de Dakar. Les uns et les autres ont tous fait l'objet d'un prélèvement sanguin après consentement éclairé et bénéficié d'une électrophorèse de l'hémoglobine.

Le profil électrophorétique a été le critère exclusif pour reconnaître les témoins (sujets AA), les drépanocytaires hétérozygotes (sujets AS) et les homozygotes (sujets SS).

### II.2. RECUEIL ET TRAITEMENT DES SPECIMENS

#### *II.2.1. Prélèvements*

Les sujets inclus dans notre étude ont fait l'objet après un jeûne de 12 heures de prélèvements sanguins au laboratoire central de Biochimie Médicale du CHU Aristide le Dantec de Dakar où à la Pédiatrie Albert Royer du CHU de Fann. Il s'agit de prélèvements de cinq millilitres de sang veineux sur tube contenant de l'éthylène diamine tétraacétate (EDTA).

#### *II.2.2. Traitement des échantillons*

Après centrifugation à 3000 tours/minute pendant dix minutes, le plasma est éliminé et le culot de globules rouges lavé quatre fois avec du sérum physiologique (solution NaCl à 9 g/l). Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à 3000 tours/minute pendant cinq minutes et le surnageant est éliminé par aspiration.

Ce traitement permet de satisfaire les objectifs suivants :

- empêcher la coagulation et la dégradation des constituants cellulaires (les échantillons sont traités dans les deux heures qui ont suivi leur recueil) ;
- soustraire les hématies du milieu extracellulaire (plasma) riche en enzymes.

### III. ELECTROPHORESE DE L'HEMOGLOBINE

#### III.1. HEMOLYSE DES GLOBULES ROUGES

Elle est réalisée dans un tube à hémolyse selon les modalités suivantes :

- 1 volume de culot de globules rouges lavés,
- 1/2 volume de chloroforme,
- 1 volume et 1/2 d'eau distillée.

Ce mélange est laissé 30 minutes au repos à température ambiante du laboratoire (25°C environ au mois de janvier) avant de subir une centrifugation à 7000 tours/minute pendant 45 minutes. Le surnageant est récupéré pour électrophorèse.

#### III.2. ELECTROPHORESE PROPREMENT DITE

Son principe repose sur la différence de charge des acides aminés constitutifs de l'hémoglobine, qui auront à un pH donné une migration électrophorétique différente sous l'effet d'un champ électrique.

##### *III.2.1. Réactifs*

• Tampon barbital pH 8,6

Barbital sodique.....	20,60 g
Barbital (diéthylmalonylurée).....	3,60 g
Eau distillée qsp .....	1000 ml.

Ce mélange est dilué extemporanément au quart (1/4) avec de l'eau distillée.

- \* Bandes cellogel<sup>®</sup> (bandes d'acétate de cellulose commercialisées par la firme Sébia<sup>®</sup>)
- \* Chloroforme
- \* Méthanol
- \* Acide acétique
- \* Diacétone alcool

### *III.2.2. Appareillages et accessoires*

- \* Densitomètre profil 2 Sébia<sup>®</sup>
- \* Générateur (200 volts)
- \* Cuve d'électrophorèse et portoir
- \* Applicateur 4 dépôts semi-micro
- \* Pincés en fer
- \* Plaques en verre

### *III.2.3. Mode opératoire*

Il a été adopté le procédé suivant :

- **fixation de la bande cellogel sur le portoir;**
- **dépôt des surnageants sur le côté cathodique de la bande cellogel;**
- **application d'une tension de 200 volts entre les 2 bornes de la cuve ;**
- **migration des hémoglobines de la cathode vers l'anode pendant 1 heure 30 minutes;**
- **révélation des hémoglobines par le rouge ponceau;**
- **transparisation au diacétone alcool des bandes puis séchage à l'étuve à 50°C;**
- **lecture au densitomètre.**

## III.2.4. Electrophorégrammes

### III.2.4.1. Migration et électrophorétique

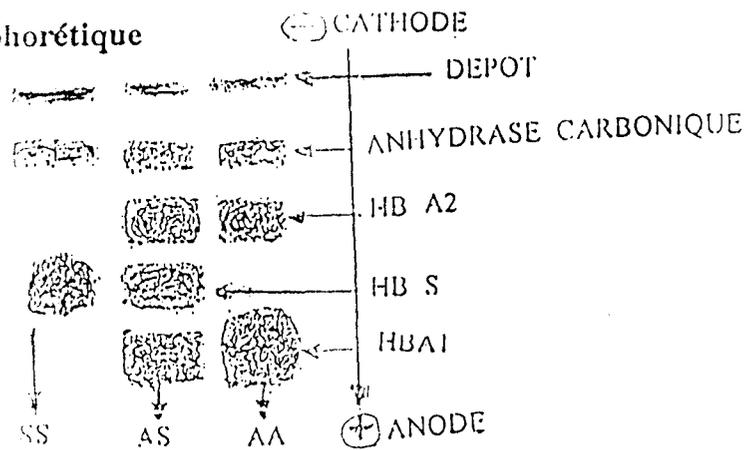


Figure 11 :  
Migration électrophorétique

### III.2.4.2. Enregistrement densitométrique

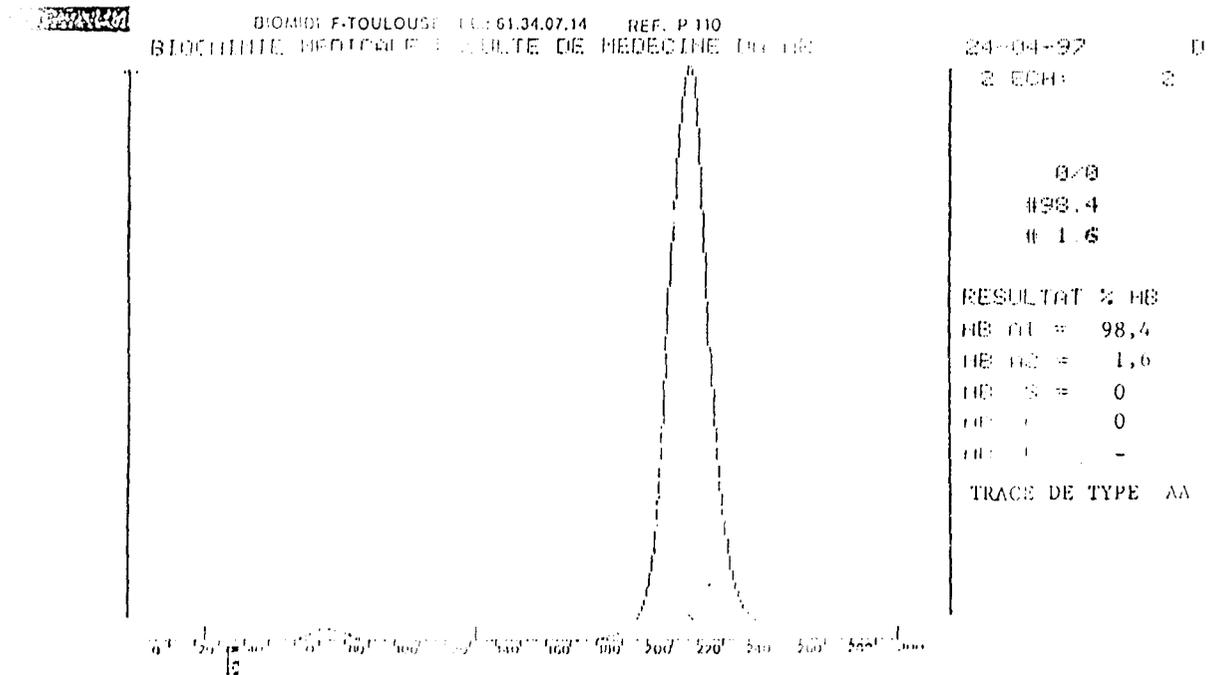
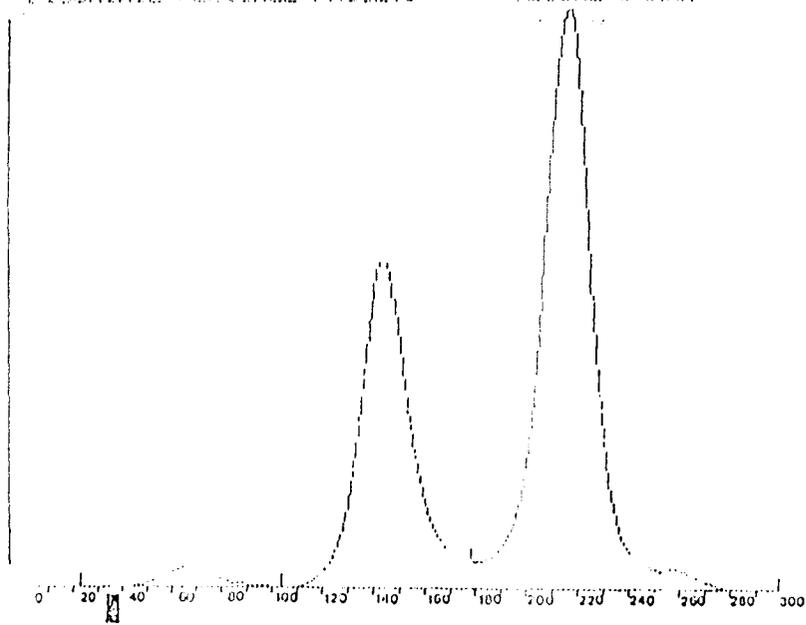
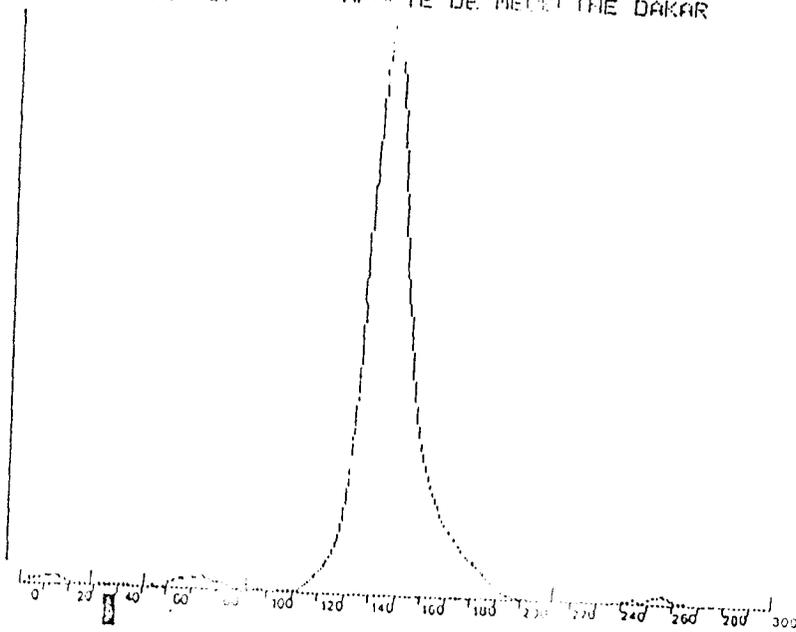


Figure 12 a :  
Enregistrement densitométrique (sujet AA)



0.0  
#62.4  
#35.1  
#2.5

RESULTAT : HB  
HB A1 = 62,4  
HB A2 = 2,5  
HB S = 35,1  
HB C = 0  
HB F = -  
TRACE DE TYPE AS



0.0  
#95.8  
#95.8  
#2.0  
#0.2  
#1.1

RESULTAT : HB  
HB A1 = 96,7  
HB A2 = 3,3  
HB S = 95,8  
HB C = 0  
HB F = -  
TRACE DE TYPE SS

Figure 12 b :  
Enregistrement densitométrique (sujets AS et SS)

## IV. ETUDE DES LIPIDES DE LA MEMBRANE DU DREPANOCYTE

### IV.1. DOSAGE PONDERAL DES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES

Les phospholipides totaux membranaires ont été dosés par méthode minérale grâce au kit Randox Inorganic Phosphorus Colorimetric Method<sup>®</sup> ; ils sont précipités avec de l'acide trichloracétique et oxydés en phosphates avec l'acide perchlorique et le peroxyde d'hydrogène. Les phosphates forment un complexe coloré avec le molybdate et le vanate en présence d'acide nitrique.

### IV.2. EXTRACTION DES LIPIDES MEMBRANAIRES DE GLOBULES ROUGES

La technique d'extraction utilisée est celle préconisée par FOLCH et coll. [55].

Le choix de cette méthode modifiée s'explique par sa simplicité d'exécution mais aussi et surtout par l'obtention de résultats avec une reproductibilité satisfaisante [117].

#### IV.2.1. Matériel et réactifs

- Centrifugeuse
- Rotavapor
- Cyclomixeur
- Chloroforme
- Méthanol
- Solution KCl 0,1N
- Sulfate sodium anhydre
- N-hexane qualité CLHP
- Propanol-2 qualité CLHP
- Eau distillée pour CLHP

#### *IV.1. Mode opératoire*

- Recueillir 0,5 ml de culot de globules rouges lavés dans un tube à essai en pyrex de 100 ml.
- Ajouter 3 ml d'eau distillée et laisser reposer au congélateur (-20°C) pendant 1 heure.
- Sortir le tube et le laisser à l'air ambiant pendant 30 minutes.
- Introduire 15 ml de mélange chloroforme/méthanol (2 : 1, v/v) et agiter vigoureusement au cyclomixeur.
- Ajouter 3 ml de la solution KCl 0,1N puis agiter.
- Centrifuger à 4000 tours/minute pendant 10 minutes.

Le mélange se subdivise alors en deux phases : une phase supérieure à éliminer par aspiration et une inférieure, chloroformique, qui renferme les composés lipidiques. Seule cette phase chloroformique est utilisée.

- Ajouter 5 g de sulfate de sodium anhydre dans cette phase chloroformique.
- Agiter et filtrer, puis passer un courant d'azote pendant une minute.
- Évaporer à sec au rotavapor.
- Répasser un courant d'azote sur le fin film tapissant le fond du tube.
- Prendre ce film lipidique par 250 microlitres d'un mélange n-hexane + isopropanol -2 + Eau distillée (39 : 52 : 9, v/v/v) pour l'analyse par CLHP.

#### *IV.2. Analyse des lipides membranaires par CLHP*

En nous référant à des procédés d'analyse des phospholipides par Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) préconisés par divers auteurs [54, 65, 71, 122], nous avons effectué des essais qui nous ont permis d'apporter les modifications appropriées à nos conditions de travail.

La séparation des lipides est basée sur leur distribution différentielle dans les deux phases mobile et stationnaire avec une variation du temps de rétention selon la classe lipidique. Chaque classe éluée ainsi sera détectée par spectroscopie UV et enregistrée sous la forme d'un pic. La surface de chaque signal (pic) permet de déterminer la concentration de la classe de lipide à l'aide de courbes d'étalonnage établies à partir de standards lipidiques.

#### IV.2.3.1. Instrumentation

Le chromatographe utilisé est de type Jasco modèle 880-PU<sup>®</sup> équipé d'un détecteur UV/visible modèle 870-UV/875-UV<sup>®</sup> et d'un intégrateur Spectra Physics modèle 4270<sup>®</sup>

La colonne montée sur le chromatographe est de type Sphérisorb 5 CN<sup>®</sup> commercialisée par Prolabo<sup>®</sup>. Elle présente les caractéristiques suivantes :

- Longueur : 15 cm
- Diamètre intérieur : 0,8 mm
- Granulométrie : 5  $\mu$  m
- Porosité : 80 Å

#### IV.2.3.2. Solvants

- Acétonitrile pour CLHP
- n-hexane pour CLHP
- Propanol- 2 pour CLHP
- Eau distillée pour CLHP

#### IV.2.3.3. Standards de lipides (sigma chemical Co<sup>®</sup>)

Ces standards s'avèrent être d'excellente qualité avec un pourcentage de pureté avoisinant 100%

- Cholestérol 99%
- Acide phosphatidique 99%
- Phosphatidyléthanolamine 99%
- Lysophosphatidyléthanolamine 99%
- Sphingomyéline 99%
- Phosphatidylcholine 98%
- Lysophosphatidylcholine 99%.

#### IV.2.3.4. Analyse proprement dite

##### a. Conditions expérimentales

Système éluant en gradient : acétonitrile + eau dans les proportions respectives de 90 : 10, v/v pendant 6 minutes puis 10 : 90, v/v pendant 12 minutes et enfin 90 : 10, v/v pendant 27 minutes.

Boucle d'injection 50  $\mu$ l

Débit : 1,2 ml/minute

Vitesse du papier : 0,1

Range : 0,64

Atténuation : 4

Longueur d'onde ( $\lambda$ ) : 206 nm

Température : 25°C (en isocratique)

Pression : 300 kg / m<sup>2</sup>

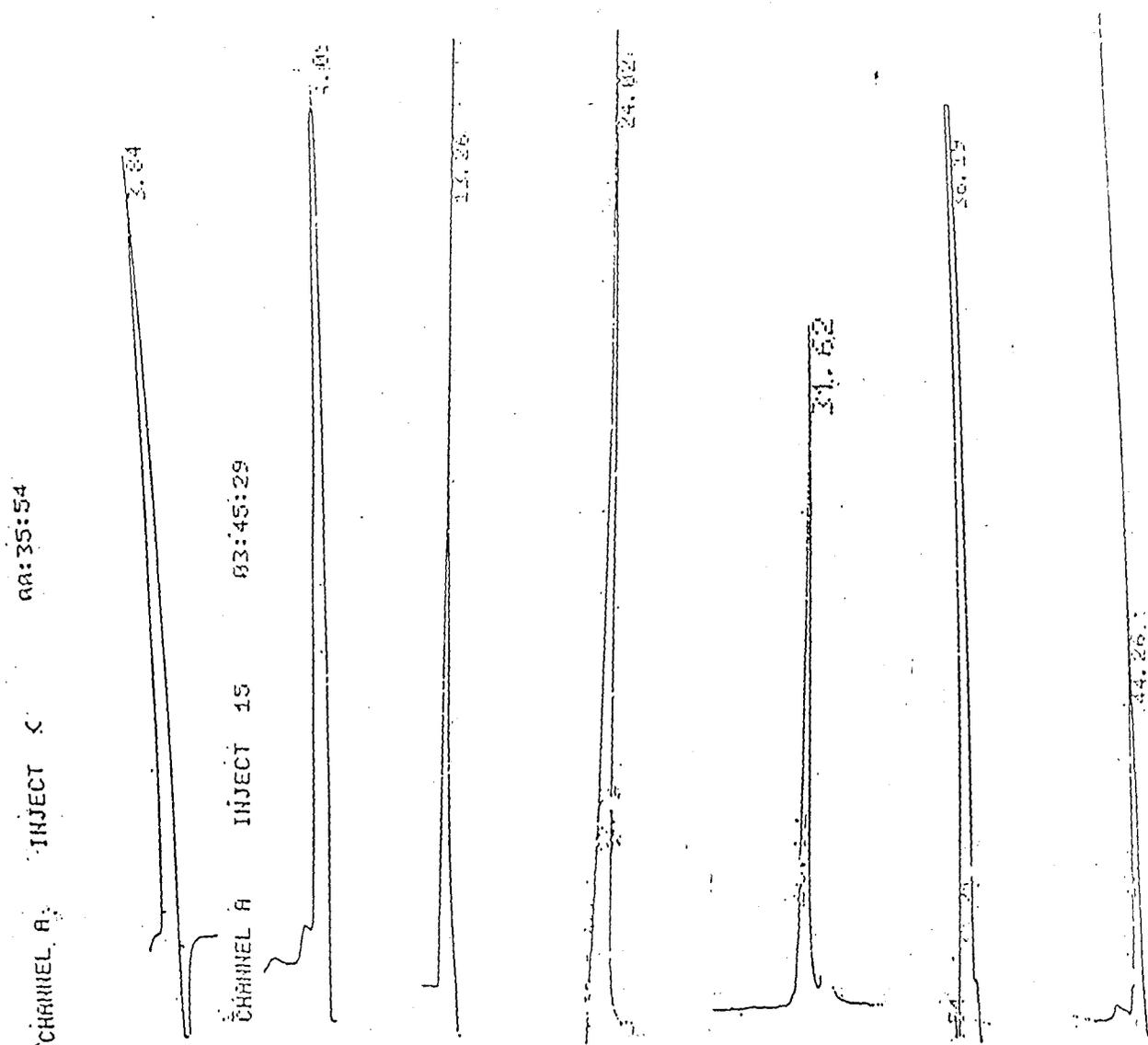
##### b. Procédure

Chaque standard est repris par un mélange n-hexane + propanol-2 + eau (39 : 52 : 9, v/v/v) et a fait l'objet de dilutions appropriées. Ces standards dilués sont ensuite injectés en double essai d'abord individuellement puis en mélange. Leur détection se traduit par l'apparition d'un pic signal dont le temps de rétention est ensuite enregistré.

Chaque extrait lipidique obtenu est analysé dans les mêmes conditions que les standards. Il apparaît alors, après chaque injection d'échantillon, plusieurs pics dont les délais d'apparition permettent d'identifier les classes lipidiques par comparaison aux temps de rétention respectifs des standards.

## IV.2.3.5. Résultats et commentaires

### a. Chromatogrammes des standards.



Cholestérol (TR = 3,84)

Acide phosphatidique (TR = 4,09)

Lysophosphatidyléthanolamine  
(TR = 13,26)

Phosphatidylcholine (TR = 31,62)

Sphingomyéline (TR = 24,02)

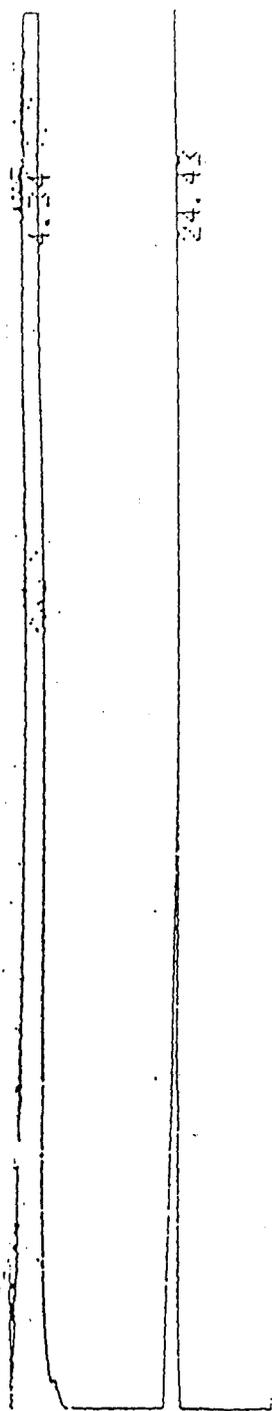
Phosphatidyléthanolamine (TR = 36,19)

Lysophosphatidylcholine (TR = 44,26)

Figure 13 a :

Chromatogramme des standards en simple

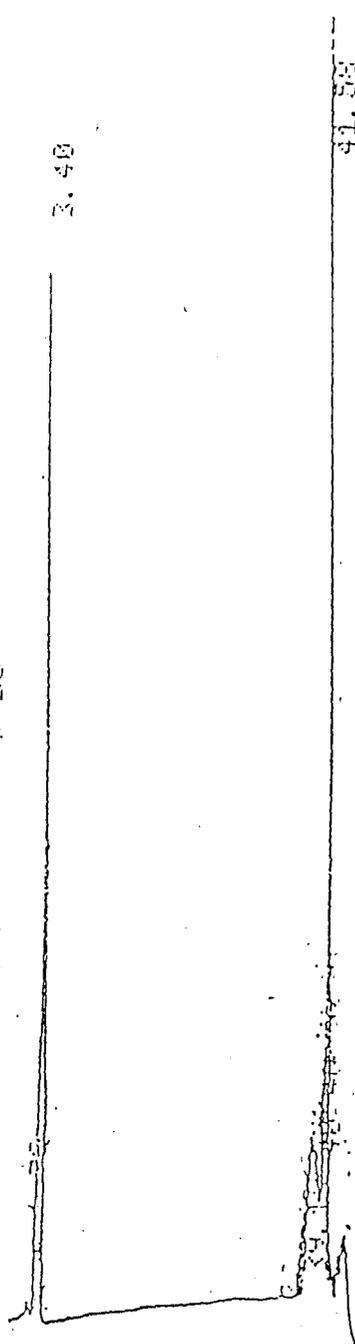
CHANNEL A INJECT 08:24:16



Mélange:

- acide phosphatidique (TR=4,34)
- sphingomyéline (TR=24.43)

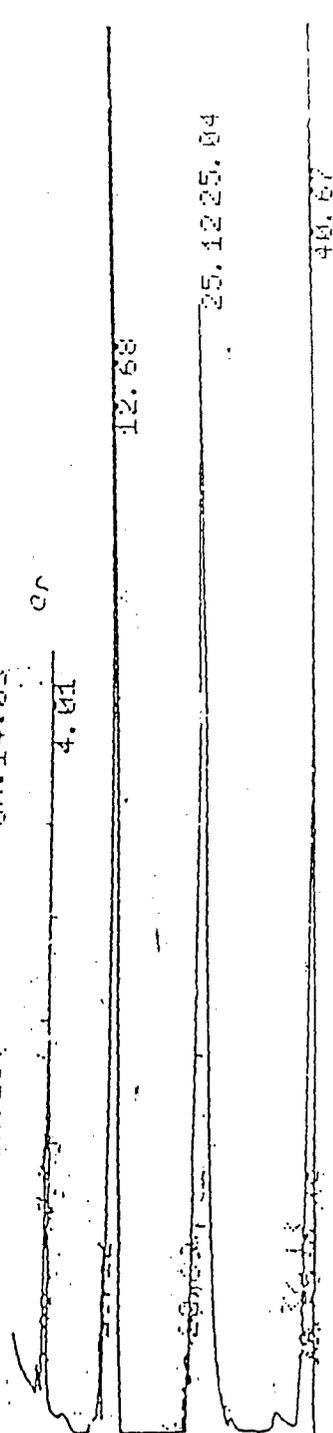
CHANNEL A INJECT 08:04:06 18:29:38



Mélange:

- cholestérol (TR=3,40)
- lysophosphatidylcholine (TR=41,59)

CHANNEL A INJECT 08:14:03



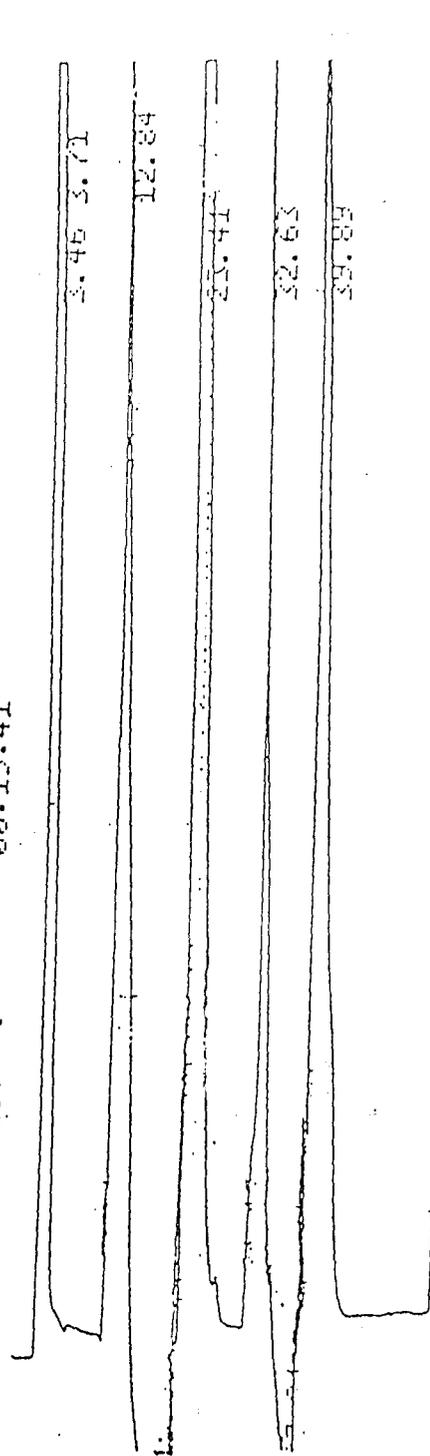
Mélange:

- acide phosphatidique (TR=4,0)
- lysophosphatidyléthanolamine (TR=12,68)
- sphingomyéline (TR=25,12)
- lysophosphatidylcholine (TR=40,67)

Figure 13 b:

chromatogrammes de mélanges de standards.

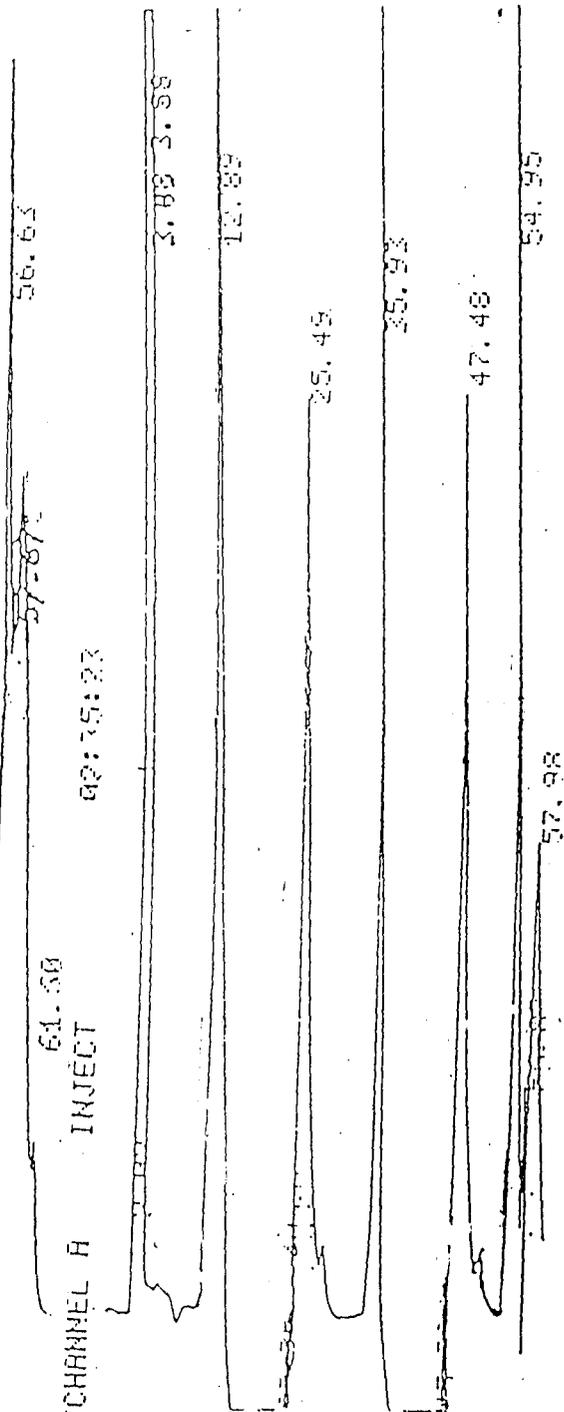
CHANNEL A INJECT < 00:19:41



Mélange:

- cholestérol (TR=3,46)
- acide phosphatidique (TR=3,71)
- lysophosphatidyléthanollamine (TR=12,84)
- sphingomyéline (TR=23,41)
- phosphatidylcholine (TR=32,63)
- phosphatidyléthanollamine (TR=39,89)

CHANNEL A INJECT 02:15:23



Mélange:

- cholestérol (TR=3,08)
- acide phosphatidique (TR=3,89)
- lysophosphatidyléthanollamine (TR=12,8)
- sphingomyéline (TR=25,49)
- phosphatidyléthanollamine (TR=35,93)
- lysophosphatidylcholine (TR=47,48)

Figure 13 C:

Chromatogramme de mélanges de standards

**Tableau V:**  
Temps de rétention des standards

Nature de standards	Temps de rétention (en minutes)
Cholestérol	3
Acide phosphatidique	4
Lysophosphatidyléthanolamine	14
sphingomyéline	25
Phosphatidylcholine	32
Phosphatidyléthanolamine	36
Lysophosphatidylcholine	44

L'apparition des pics correspondant au n-hexane et au propanol -2, au-delà de 50 minutes, permet de faire la différence avec ceux des lipides. Quant à l'acétonitrile du système éluant, il absorbe peu à  $\lambda = 206$  nm (transmission 90 %) ; qui plus est, la forte atténuation écrase le petit pic qui lui correspondrait.

b. Chromatogrammes des sujets AA et AS

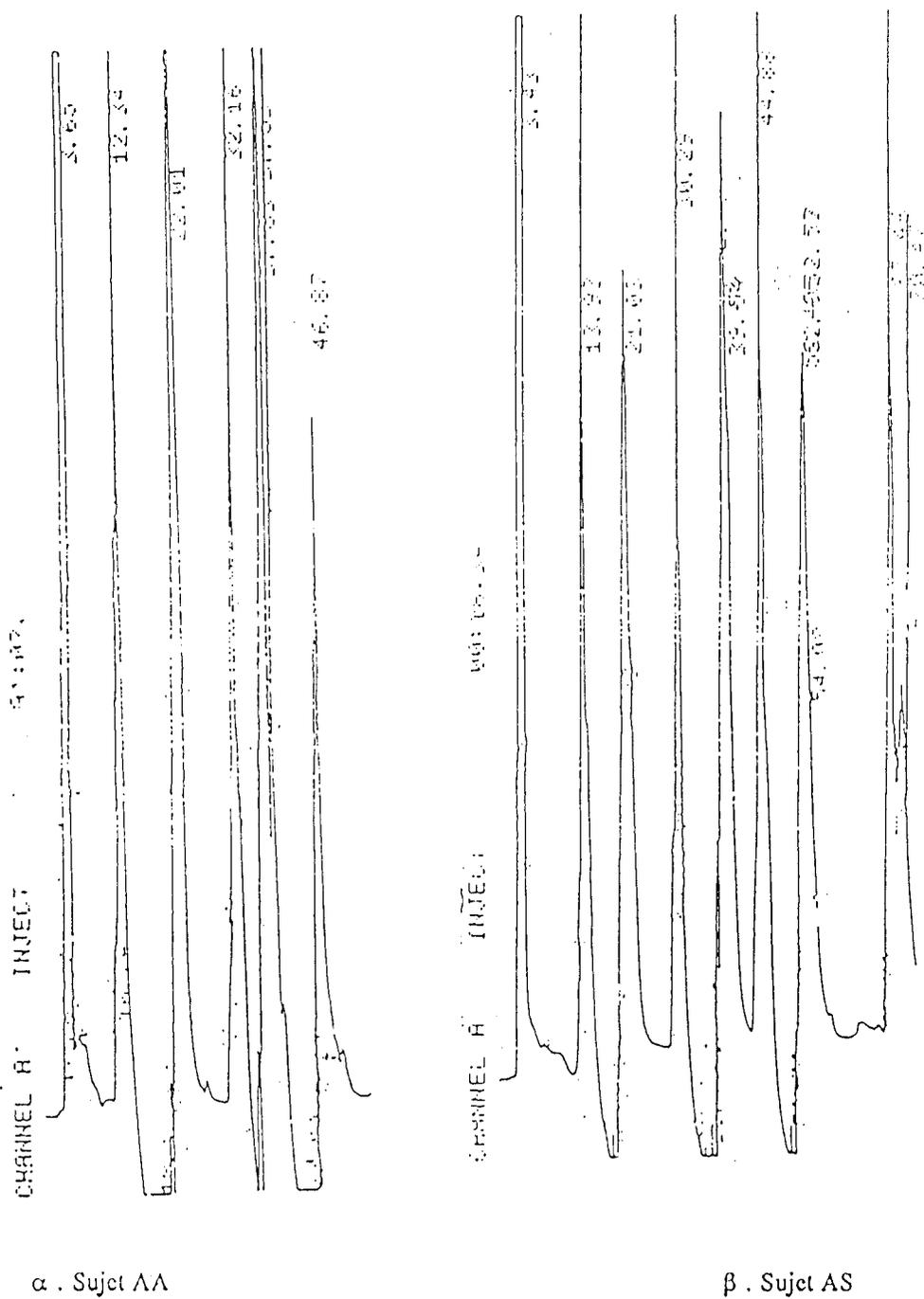


Figure 14 :  
Chromatogrammes des sujets AA et AS

### c. Identification par CLHP

L'identification des différentes classes lipidiques contenues dans les extraits de membranes de globules rouges s'est faite par comparaison aux temps de rétention respectifs des standards lipidiques.

Les classes de lipides identifiées sont répertoriées dans le tableau VI :

Tableau VI :

Classes de lipides identifiées dans les extraits de membranes érythrocytaires

	CT	AP	PE	LPE	PC	LPC	SM
Sujets AA n = 78	+	+	+	+	+	+	+
Sujets AS n = 91	+	+	+	+	+	+	+

Le signe + indique la présence du lipide considéré.

CT = Cholestérol

AP = Acide phosphatidique

PE = Phosphatidyléthanolamine

LPE = lysophosphatidyléthanolamine

PC = Phosphatidylcholine

LPC = Lysophosphatidylcholine

SM = Sphingomyéline

Toutes les classes lipidiques correspondant à nos standards sont donc représentées aussi bien chez les sujets témoins AA que chez les sujets drépanocytaires hétérozygotes AS. L'identification est facilitée par la grande différence des temps de rétention, associée au caractère finement symétrique des pics et surtout à la reproductibilité des signaux. Cependant ces temps ne sont pas superposables à ceux établis par certains auteurs [54, 65, 71, 122].

Cette variation pourrait s'expliquer par la différence des colonnes et des systèmes. En effet, à l'inverse de ces auteurs qui ont utilisé des colonnes non greffées à grande porosité (100 Å en moyenne), nous avons utilisé une colonne greffée (Spherisorb 5 CN) à porosité relativement faible (80 Å). Notre système éluant acétonitrile - eau, différent de ceux de chercheurs cités ci-dessus, contribuerait aussi à expliquer la différence des temps de rétention.

#### d. Analyse quantitative

L'analyse par chromatographie liquide haute pression de chaque standard à différentes dilutions a montré que l'absorption UV était proportionnelle à la concentration. La surface de chaque pic a été exprimée alors en fonction de la concentration en lipides ; cela a permis d'obtenir une droite de calibration pour chaque standard.

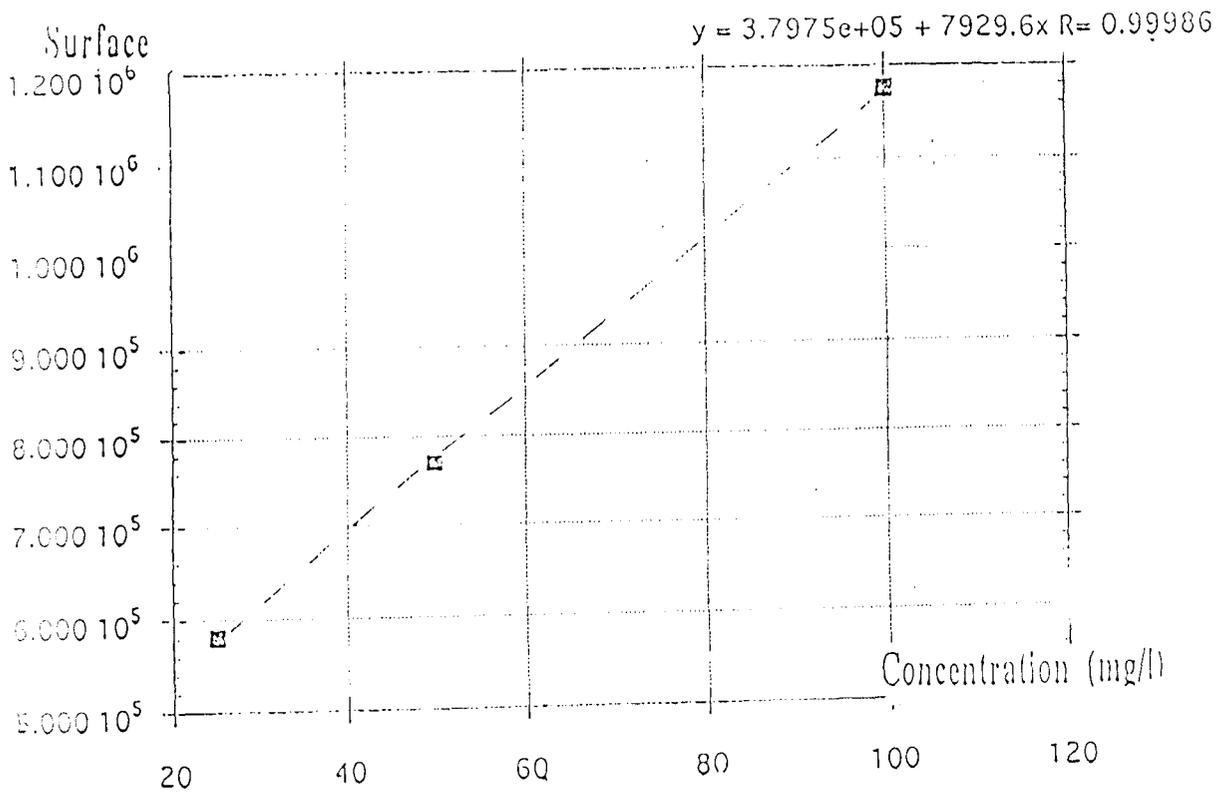


Figure 15 :  
Droite de calibration du cholestérol

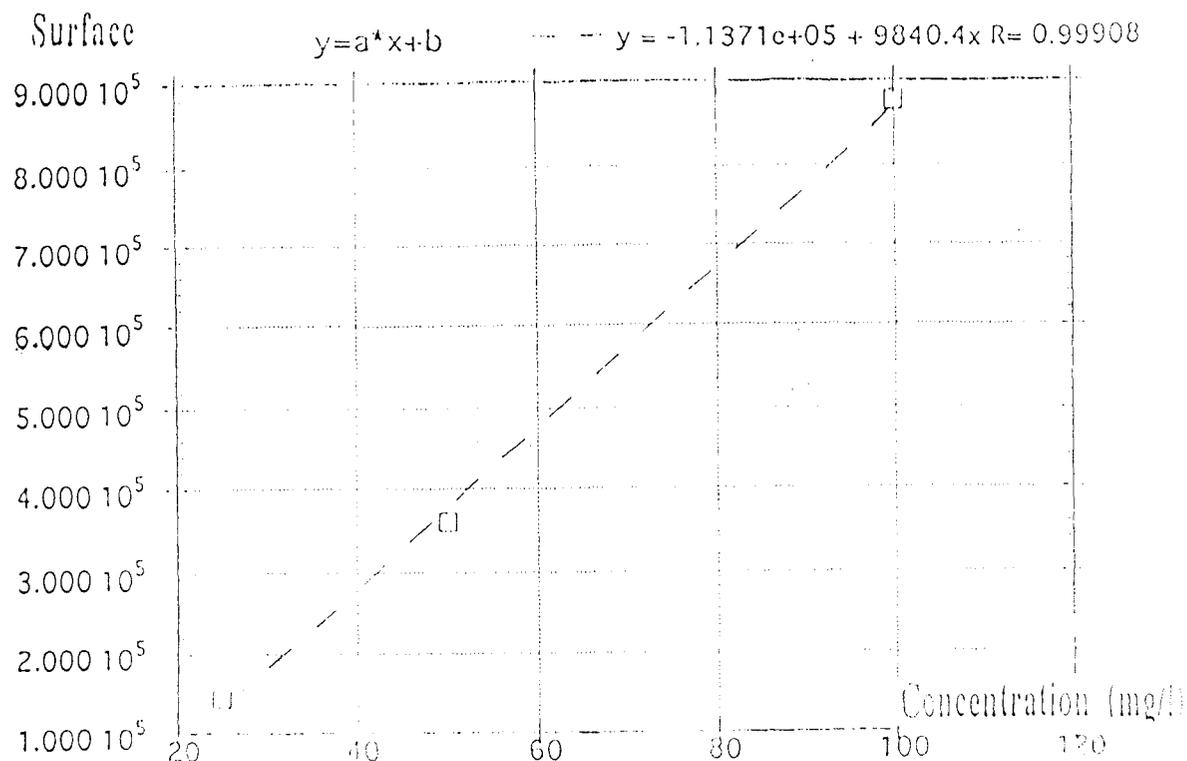


Figure 16 :  
Droite de calibration de la phosphatidylcholine

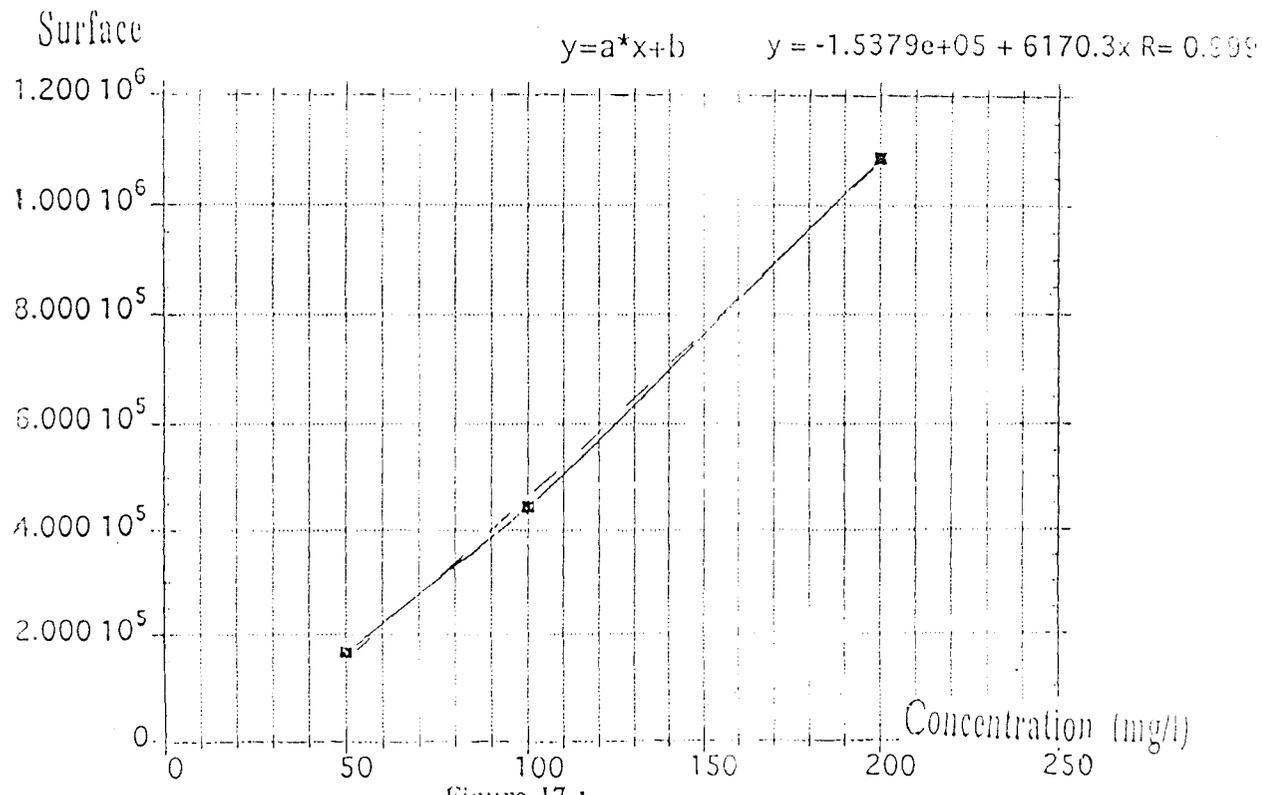


Figure 17 :  
Droite de calibration de la lysophosphatidylcholine

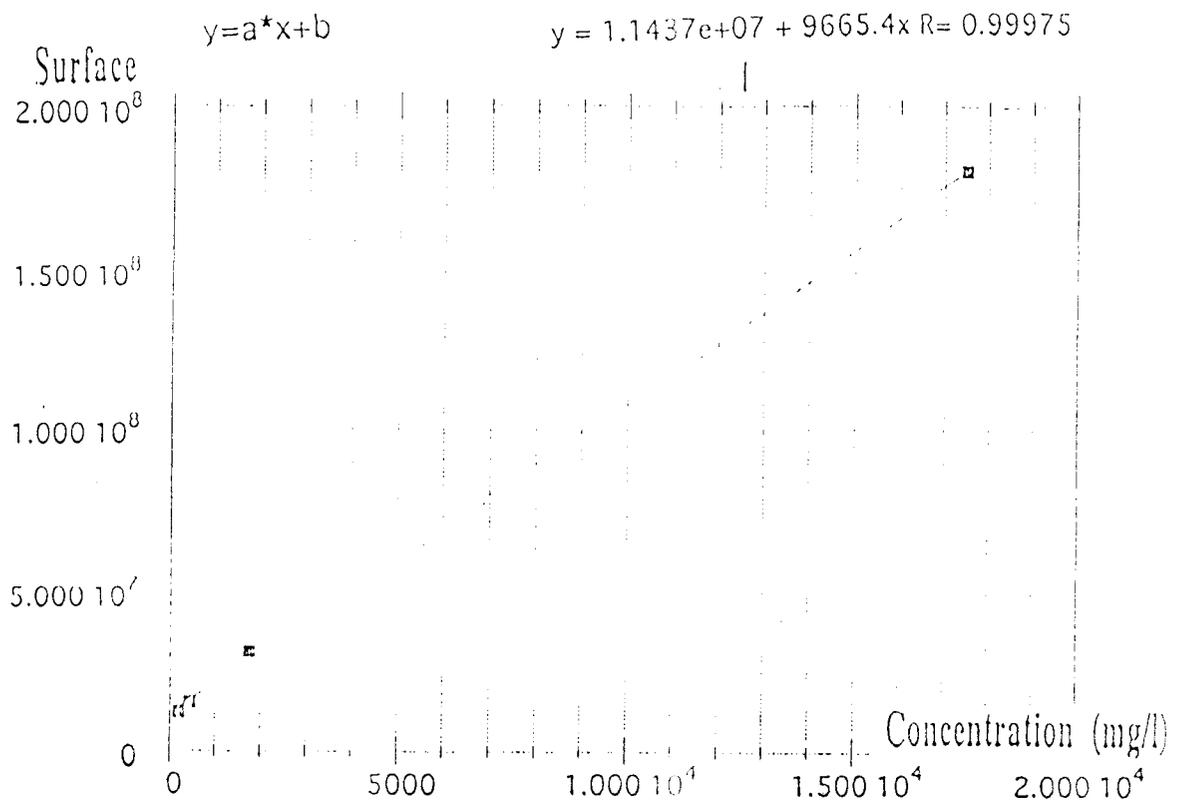


Figure 18 :  
Droite de calibration de la phosphatidylethanolamine

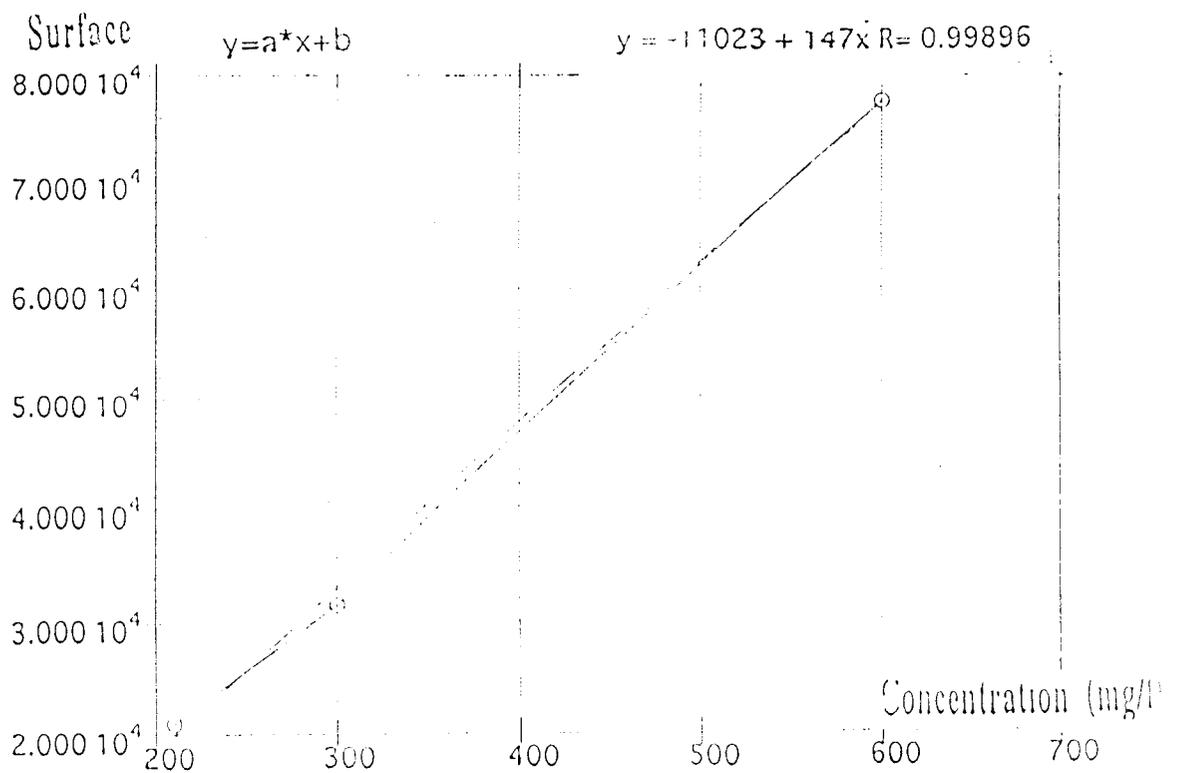


Figure 19 :  
Droite de calibration de la lysophosphatidylethanolamine

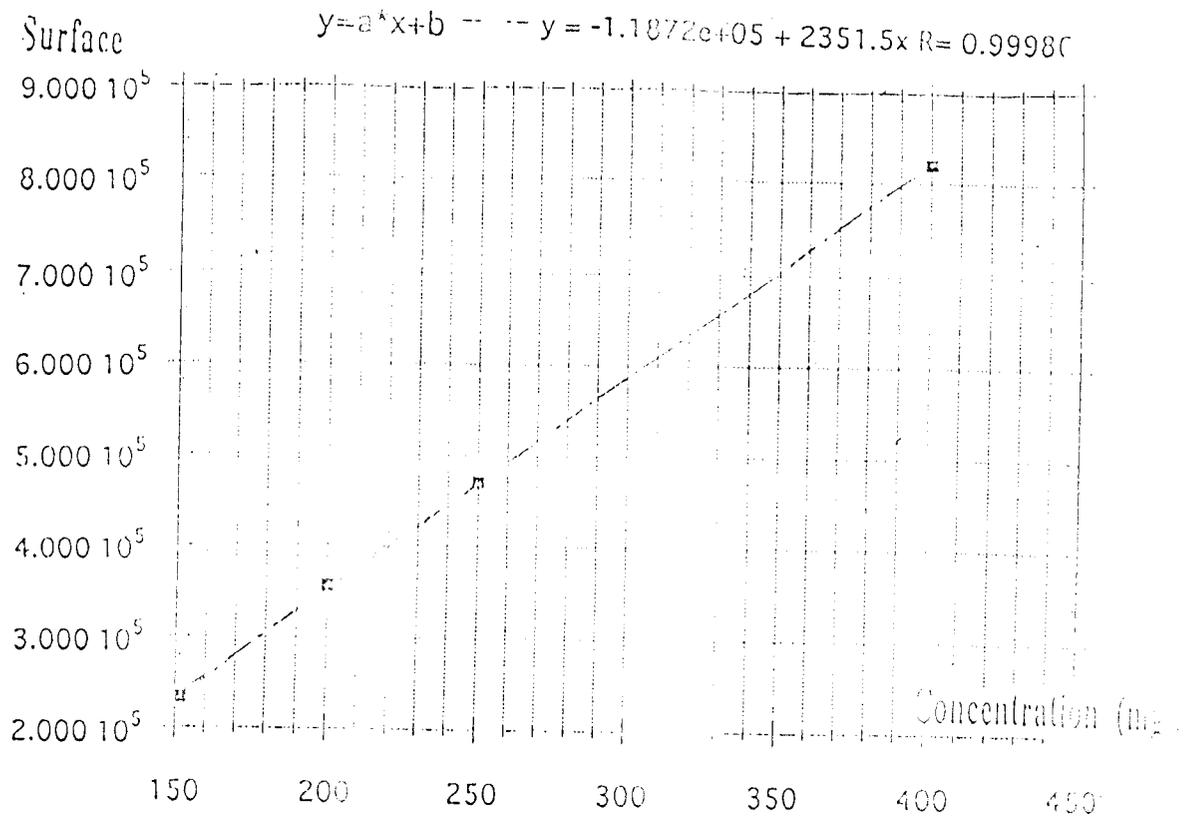


Figure 20 :

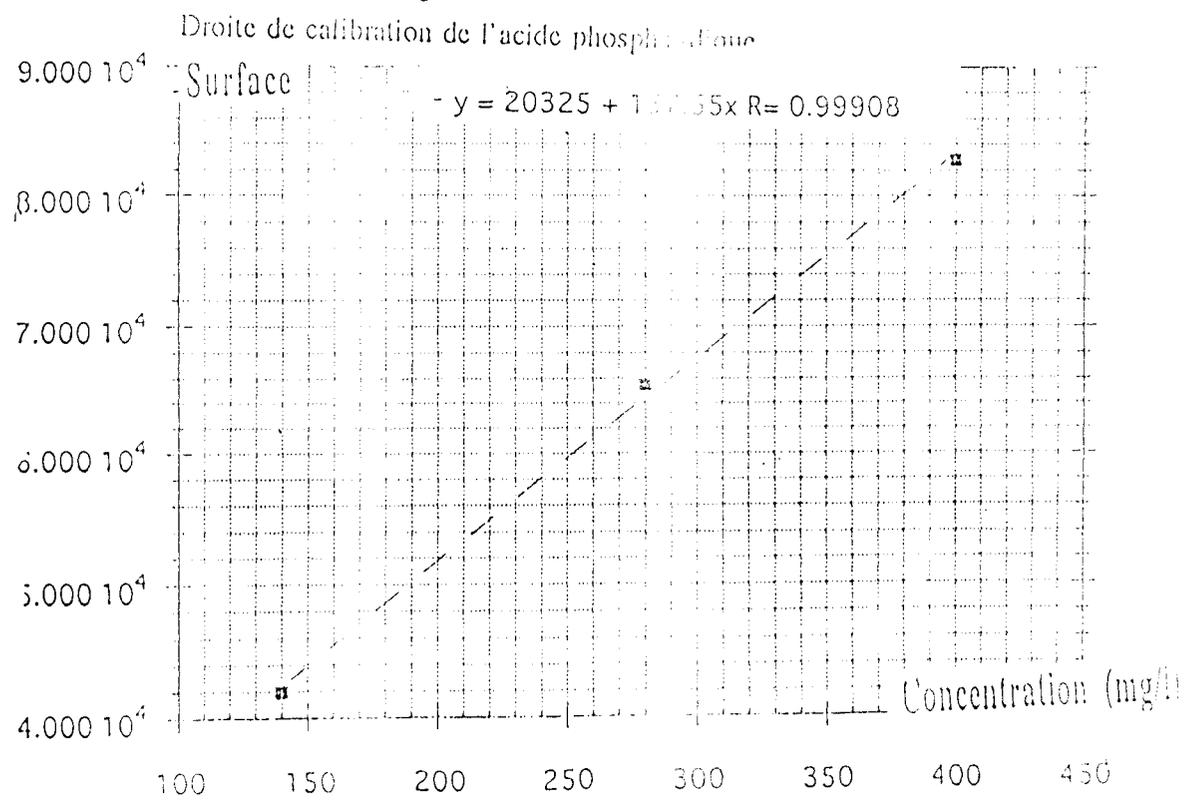


Figure 21 :

Droite de calibration de la sphingomyéline

Ainsi, l'analyse par chromatographie liquide haute pression des extraits de lipides membranaires permet non seulement l'identification de chaque classe lipidique mais aussi de déterminer sa concentration en rapportant la surface du pic signal à la courbe de calibration du standard ayant le même temps de rétention. La teneur ainsi obtenue pour chaque classe de lipide membranaire est résumée dans le tableau VII :

Tableau VII :  
Concentration des lipides étudiés (mg/ml de sérum)

	PLT m ± ET	CT m ± ET	AP m ± ET	PE m ± ET	LPE m ± ET	PC m ± ET	LPC m ± ET	SM m ± ET
sujets AA n = 28	3,566	0,062	0,212	0,062	0,251	0,145	0,069	1,97
sujets AS n = 21	3,5	0,061	0,398	0,060	0,401	0,155	0,079	2,46

m = moyenne ; ET = écart-type.

PLT = phospholipides totaux.

CT = cholestérol

AP = Acide phosphatidique

PE = Phosphatidyléthanolamine

LPE = Lysophosphatidyléthanolamine

PC = Phosphatidylcholine

LPC = Lysophosphatidylcholine

SM = Sphingomyéline

Sujets AA = témoins

Sujets AS = drépanocytaires hétérozygotes

Pour la comparaison des résultats entre sujets témoins AA et drépanocytaires AS, nous avons utilisé le test de student [119].

Nous avons considéré les différences significatives si  $p > 0,05$  et non significatives dans l'autre cas.

Ainsi nous avons observé une différence significative en ce qui concerne les teneurs membranaires en phospholipides totaux, en phosphatidylcholine, en lysophosphatidyléthanolamine, en phosphatidylcholine, en lysophosphatidylcholine, en sphingomyéline et en acide phosphatidique. Les anomalies notables chez le drépanocytaire par rapport au sujet témoin se résument à une baisse de la teneur lipidique de la membrane du drépanocyte contrastant avec une augmentation significative de LPE ( $p = 0,006$ ) et de LPC ( $p = 0,030$ ). Ces données témoigneraient de l'importante sensibilité des lipides membranaires au phénomène de peroxydation, phénomène particulièrement intense au cours de la maladie drépanocytaire [29, 126].

Ce processus pourrait être à l'origine de la formation des lysophosphatides au détriment de PE et PC. Les PC sont en effet abaissées chez le drépanocytaire ( $p = 0,01$ ) et le rapport LPE/PE est plus élevé dans ce groupe que dans celui des témoins. La présence de taux élevés des lysophosphatides chez le drépanocytaire pourrait être le reflet de l'intensité de la lipidoperoxydation membranaire.

L'acide phosphatidique, intermédiaire commun à la synthèse des phosphoglycérides et des triacylglycérols, est également augmenté de façon significative ( $p = 0,01$ ) chez le drépanocytaire. Son augmentation massive dans la drépanocytose pourrait être liée à son défaut d'utilisation par le drépanocyte qui a perdu sa capacité de synthèse.

Comme SARR [117], nous observons une augmentation de la sphingomyéline chez le drépanocytaire, mais dans notre série la différence n'est pas significative.

Ainsi donc grâce à la chromatographie liquide haute pression, nous avons pu identifier sept classes de lipides par comparaison des temps de rétention à ceux de standards connus. Il s'est avéré que tous les lipides présents chez les témoins l'étaient également chez les drépanocytaires.

Par ailleurs nous avons quantifié ces lipides à l'aide de droites d'étalonnage représentant l'expression de la concentration en fonction de la surface. Nous avons pu mettre en évidence deux types de perturbations au niveau de la membrane du drépanocyte: une augmentation des lysophosphatides, redoutables par leur propriété hyperhémolytante, et un appauvrissement concomitant de la membrane cellulaire en phospholipides.

Ces anomalies biochimiques pourraient être, du moins en partie, responsables de l'anémie hémolytique souvent observée chez les drépanocytaires. Elles auraient pour principal déterminisme commun : la lipidoperoxydation.

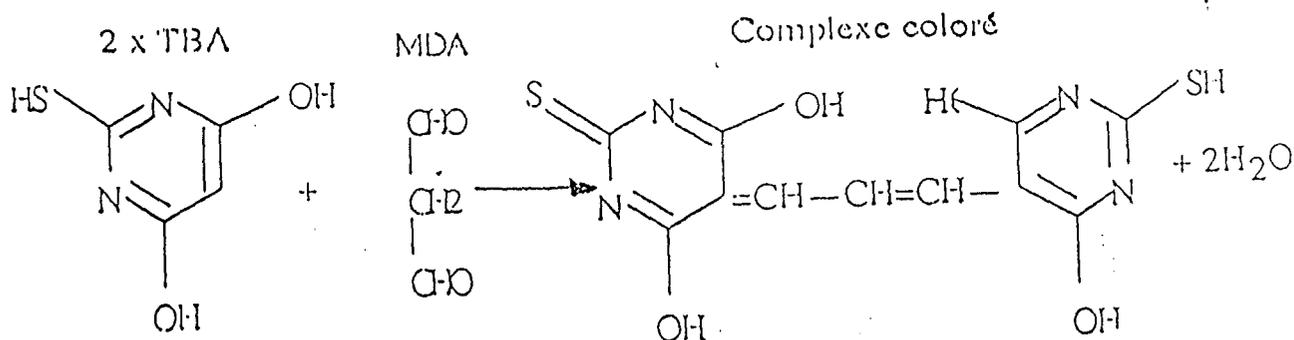
C'est pourquoi l'évaluation de ce processus dans la maladie drépanocytaire nous paraît être une perspective intéressante pour la compréhension de la pathogénie de l'anémie falciforme.

## V. EVALUATION DE LA LIPIDOPEROXYDATION ET DES FACTEURS DE PROTECTION AU SEIN DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE

### V.1. DOSAGE DU MALONDIALDEHYDE (MDA)

#### V.1.1. Généralités

Le malondialdéhyde est l'index d'évaluation de la peroxydation lipidique le plus connu mais aussi le plus utilisé en raison de la simplicité de sa mesure. Depuis que KOHN et LIVERSEDGE [94] ont décrit en 1944 la réaction colorée, donnée par l'acide thiobarbiturique (TBA) avec le MDA, cette réaction est en effet la plus largement utilisée pour évaluer les peroxydes lipidiques dans les milieux biologiques. Le principe de la réaction est le suivant : en milieu acide (pH environ 3,5) à chaud (95 à 100°C), le MDA forme avec deux molécules de TBA un complexe coloré extractible par les solvants organiques (le n-butanol en l'occurrence) absorbant à  $\lambda = 532$  nm. Le mécanisme est le suivant :



La méthodologie utilisée a été celle préconisée par YAGI K. [130] mais appliquée dans notre série à l'analyse du malondialdéhyde de la membrane érythrocytaire.

### V.1.2. Réactifs

- Acide sulfurique 36 N
- Acide phosphotungstique (PTA)
- Acide thiobarbiturique (TBA)
- Acide acétique glacial
- 1,1,3,3-tétra-ethoxypropane (TEP)
- Ethanol
- N-buthanol

Remarque : le TEP se transforme stoechiométriquement en MDA.

### V.1.3. Préparation des réactifs

- Acide sulfurique N/12

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (36 N) -----	2,30 ml
H <sub>2</sub> O, QSP -----	1000 ml

- Acide phosphotungstique 10%

PTA -----	25 g
H <sub>2</sub> O, QSP -----	250 ml

- Solution mère d'acide thiobarbiturique

TBA -----	0,6 g
H <sub>2</sub> O, QSP -----	100 ml

- solution fille d'acide thiobarbiturique

solution mère de TBA-----	15 ml
acide acétique glacial -----	15 ml

- solution mère TEP (1,824 mg/l)

TEP ----- 50  $\mu$ l

Ethanol, QSP ----- 25 ml

- solution fille de TEP

Solution mère TEP ----- 180  $\mu$ l

Ethanol, QSP ----- 100 ml

#### V.1.4. Appareillages et accessoires

- Spectrophotomètre
- Bain-Marie
- Cyclomixeur
- Centrifugeuse

#### V.1.5. Mode opératoire

##### V.1.5.1. Préparation de la gamme d'étalonnage

Concentration TEP ( $\mu$ mole/l)	Volume (en $\mu$ l) de solution fille de TEP	H <sub>2</sub> O (en $\mu$ l)
0	0	1000
1	67	933
3	201	799
6	400	600

### V.1.5.2. Procédure analytique

Nous avons adopté le procédé de YAGI [130].

	Tubes de la gamme d'étalonnage				Tube échantillon
	0	1	3	6	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> N/12	2000 $\mu$ l	1800 $\mu$ l	1400 $\mu$ l	1800 $\mu$ l	1400 $\mu$ l
Gamme MDA (15.10°)	0	---	---	---	---
	1	---	200 $\mu$ l	---	---
	3	---	---	600 $\mu$ l	---
	6	---	---	---	100 $\mu$ l
Suspension de GR diluée au 1/2 avec du sérum physiologique	---	---	---	---	100 $\mu$ l
PTA	---	---	---	---	500 $\mu$ l
TBA	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l

- Mélanger au cyclomixeur
- Placer au Bain-Marie à 95°C pendant 1 heure
- Refroidir dans de la glace pilée
- Ajouter dans chaque tube 4 ml de n-butanol et agiter au vortex pendant 1 minute
- Centrifuger à 4000 tours/minute pendant 5 minutes et récupérer seulement le surnageant pour lecture dans une cuve en pyrex au spectrophotomètre à  $\lambda = 532$  nm.

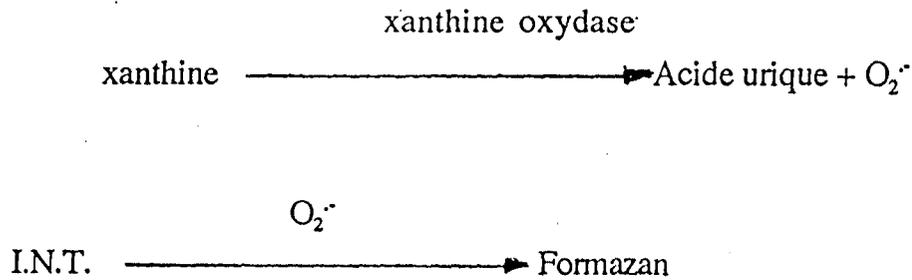
L'évaluation de l'intensité de la lipidoperoxydation par le dosage du MDA, a été suivie de celle de l'équipement enzymatique antioxydant par la mesure des activités de la Superoxyde dismutase (SOD) et de la Glutathion peroxydase (GPX) des membranes érythrocytaires des mêmes spécimens.

### V.2. MESURE DES ACTIVITES SOD ET GPX DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE

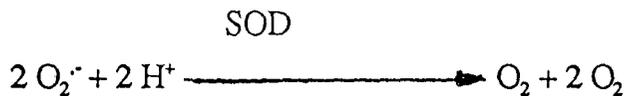
Les activités de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase, enzymes clés de protection membranaire contre la peroxydation lipidique, ont été dosées grâce aux kits RANSOD<sup>®</sup> et RANSEL<sup>®</sup> commercialisés par la firme RANDOX<sup>®</sup>.

Le principe du dosage de l'activité de la SOD repose sur la capacité de cette enzyme à inhiber la formation de formazan par le biais d'une réaction dépendante du radical superoxyde  $O_2^{\cdot -}$ .

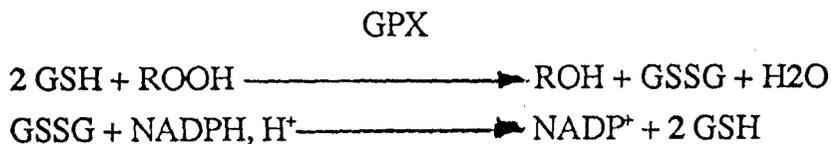
Dans le kit RANDOX, l'oxygène  $O_2$  est généré grâce à l'oxydation de la xanthine par la xanthine oxydase. Il réagit avec le 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phényltetrazolium chloride (ou I.N.T.). Les deux séquences réactionnelles se schématisent comme suit :



La SOD empêche la production de formazan en catalysant la dismutation du radical superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène :



La mesure de l'activité de la superoxyde dismutase est associée à celle de la glutathion peroxydase membranaire. Le principe de celle-là repose sur la capacité de la GPX de catalyser l'oxydation du glutathion réduit en présence de cumène. Ce dosage couplé à la glutathion réductase permet la mesure de la vitesse de formation du glutathion disulfure (GSSG) selon le principe de PAGLIA et VALENTINE [107] :



### V.3. RESULTATS ET COMMENTAIRES

#### V.3.1. Résultats globaux des analytes : Hb , MDA , SOD et GPX des membranes érythrocytaires

Tableau VIII :

Valeurs moyennes des paramètres testés

	SOD UI/l m ± ET	GPX UI/l m ± ET	MDA mg/ml m ± ET	Hb g/l m ± ET	SOD UI/g d'Hb m ± ET	GPX UI/g d'Hb m ± ET	MDA mg/g d'Hb m ± ET
<b>Sujets AA</b> n = 78	146,28 ± 68,777	966,92 ± 385,416	2,503 ± 0,671	127,08 ± 24,714	1181,38 ± 552,029	330,06 ± 162,107	20,9 ± 8,756
<b>Sujets AS</b> n = 91	173,01 ± 115,865	898,78 ± 347,405	3,059 ± 0,737	117,39 ± 27,855	1552,79 ± 1141,797	330,43 ± 141,818	27,87 ± 10,988
<b>Sujets SS</b> n = 44	194,91 ± 97,586	1095,27 ± 319,578	20,19 ± 2,538	86,75 ± 16,422	2352 ± 1331,811	547,341 ± 183,573	56,818 ± 26,643

SOD = Superoxyde dismutase

GPX = Glutathion peroxydase

MDA = Malondialdéhyde

Hb = Hémoglobine

m = moyenne

ET = écart-type

L'évaluation de la qualité de nos dosages a été réalisée grâce à des contrôles titrés : RANSOD control, RANSEL control vendus par les Laboratoires RANDOX® et le contrôle MDA.

Chaque contrôle a été analysé comme un échantillon au début et à la fin des séries de dosages. Seuls les résultats des séries dont les valeurs de contrôle sont restées incluses dans la fourchette des valeurs de référence ont été colligés dans le tableau ci-dessus.

Pour l'analyse comparative des résultats expérimentaux des sujets AA, AS et SS nous avons utilisé le test de student [119].

Nous avons considéré les différences significatives si  $p < 0,05$  et non significatives dans les autres cas.

### *V.3.2. L'hémoglobine totale*

Le taux d'hémoglobine du sujet AS est superposable à celui du sujet témoin AA ( $p = 0,0555$ ). A l'inverse, il est significativement plus bas chez le drépanocytaire homozygote ( $p = 0,0001$ ) avec une moyenne de 86,75 g/l. L'anomalie hématologique ainsi observée dans notre série correspond à l'anémie hémolytique quasi constante au cours de la maladie sicklémiq. Elle serait le témoin de l'hypersplénisme mais aussi des altérations biochimiques de la membrane érythrocytaire notamment celles de ses principaux constituants structuraux que sont les lipides [9, 36].

### *V.3.3. Le malondialdéhyde (MDA)*

Nos résultats montrent une augmentation significative de la teneur en MDA de la membrane du drépanocyte par comparaison à celle de l'hématie non sicklémiq. Cette perturbation biochimique est d'autant plus importante dans notre série que l'hémoglobinoopathie S est à l'état homozygote. Les taux les plus élevés de MDA sont observés chez les sujets SS avec une différence significative  $p = 0,0001$  contre  $p = 0,004$  chez les sujets AS par comparaison aux témoins AA.

Le malondialdéhyde est le marqueur biologique actuellement le plus utilisé pour évaluer l'intensité du phénomène de la peroxydation lipidique. Il est le dernier métabolite formé au décours des attaques radicalaires des lipides et en constitue un index fidèle.

L'élévation significative de MDA dans notre série suggère que l'hémoglobinoopathie S constitue pour les lipides membranaires un facteur de risque peroxydatif. Cette hypothèse expérimentale est compatible avec l'intense lipidoperoxydation décrite par certains auteurs au cours des syndromes hémolytiques en général et de la drépanocytose en particulier [29, 126].

### *V.3.4. Les enzymes superoxyde dismutase et glutathion peroxydase*

L'activité moyenne de la SOD mesurée chez les témoins AA (sains) de notre série est de 1181 UI / g d'Hb. Elle est peu différente des 1098 UI/g d'Hb rapportées par NICOLE A. et SINET P. M. [106].

Ces auteurs ont dosé la SOD par méthode immunologique à partir d'extraits érythrocytaires chez des sujets sains. La similitude des deux résultats constitue un argument en faveur du caractère superposable des deux méthodes.

L'analyse comparative des activités enzymatiques en UI/l de la SOD et de la GPX entre les sujets AS, SS et les témoins AA ne montre pas de différence significative. Il en est de même pour les valeurs corrigées de GPX correspondant au rapport  $UI.l^{-1}/\text{taux d'Hb en } g.l^{-1}$ . Par contre, celle de la SOD est plus intense chez les sujets AS ( $p = 0,0368$ ).

En ce qui concerne les activités corrigées des enzymes SOD et GPX chez les drépanocytaires homozygotes SS, elles sont toutes les deux significativement plus intenses comparativement aux sujets témoins ( $p = 0,0001$  pour SOD et GPX).

Ces données expérimentales suggèrent que les drépanocytaires hétérozygotes (AS) disposeraient d'un potentiel antioxydant globalement équivalent à celui des sujets témoins (AA). Seule l'activité de la superoxyde dismutase paraît relativement plus importante chez les sujets à trait drépanocytaire.

Cette enzyme accélère la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène [61]. Elle catalyse l'étape inaugurale de la lutte contre la peroxydation lipidique et serait seule sollicitée chez les sujets AS. Elle est ensuite couplée de l'hyperactivité de la glutathion peroxydase chez l'homozygote SS.

Le recrutement fonctionnel de la GPX dans le cas de l'hémoglobinopathie SS serait une réponse de l'organisme au stress oxydatif particulièrement intense dans cette affection [29].

Ainsi donc, selon nos résultats, le capital antioxydant du drépanocyte serait fonctionnel voire nettement au-dessus de la moyenne observée chez les témoins.

L'enquête bibliographique est caractérisée par le peu d'études concernant les enzymes SOD et GPX dans le cas précis de l'anémie falciforme.

DAS et NAIR [41] ont rapporté en 1980 une activité SOD significativement plus intense chez les drépanocytaires que chez les témoins. Cependant selon les mêmes auteurs l'activité de la glutathion peroxydase serait plutôt faible chez les malades contrairement à nos résultats. L'hypothèse formulée était alors l'inactivation de la GPX par l'accumulation de l'ion peroxyde chez les drépanocytaires. L'effet inhibiteur de ce radical est ensuite confirmé par BLUM J. et FRIDOVITCH I. [16].

Par ailleurs, SINET P.M. et GARBER P. avaient décrit 5 ans auparavant une inhibition de la superoxyde dismutase (SOD) par l'eau oxygénée [124].

Cependant, les inhibitions de la SOD ou de la GPX rapportées par ces auteurs sont remises en cause par la synergie fonctionnelle des deux enzymes ; l'inhibiteur présumé de l'une est le substrat de l'autre [25, 102].

Ces caractéristiques fonctionnelles pourraient alors expliquer les hyperactivités concomitantes SOD et GPX dans notre série; chaque enzyme recouvre son activité après consommation de son inhibiteur.

Les multiples lavages des spécimens suggèrent que le MDA, la SOD et la GPX dosés dans notre série sont exclusivement d'origine membranaire. Aussi nos résultats expérimentaux constituent-ils, s'ils sont confirmés par des études ultérieures, un maillon important pour la compréhension de la pathogénie de la drépanocytose.

. Ce contraste biologique pourrait signifier l'existence d'un dépassement du potentiel antioxydant, pourtant non déficitaire, par un stress oxydatif particulièrement intense au cours de la drépanocytose.

**CONCLUSION GÉNÉRALE**

La drépanocytose constitue encore au Sénégal un réel problème de santé publique par sa morbidité. En dehors de l'anomalie par mutation génétique au niveau de la chaîne bêta de l'hémoglobine, d'autres facteurs notamment membranaires semblent intervenir.

L'hyperhémolyse, maître-symptôme de la drépanocytose pourrait expliquer elle seule l'intérêt physiopathologique de la biochimie des lipides. Ceux-là assurent l'essentiel de la stabilité structurale et fonctionnelle des membranes biologiques en général, de l'hématie en particulier.

Le thème de notre travail a concerné les lipides et l'équilibre du couple lipidoperoxydation-facteurs antioxydants de la membrane du drépanocyte. L'étude s'était fixée deux objectifs principaux :

- identifier et quantifier les principaux lipides présents dans la membrane érythrocytaire,
- évaluer la peroxydation lipidique par le dosage de malondialdéhyde et son contrôle par les enzymes superoxyde dismutase et glutathion peroxydase.

Cette démarche pourrait sans doute contribuer à préciser le rôle de la désorganisation peroxydative de la membrane érythrocytaire dans la pathogénie de l'anémie falciforme.

L'échantillonnage a concerné 213 sujets répartis en trois groupes :

- sujet témoins AA (n = 78)
- sujets drépanocytaires AS (n = 91)
- sujets drépanocytaires SS (n = 44).

Grâce à la chromatographie liquide haute pression (CLHP), nous avons pu identifier sept classes de lipides par comparaison des temps de rétention à ceux de standards connus. Il s'est avéré que tous les lipides présents chez les témoins l'étaient également chez les drépanocytaires.

Par ailleurs, nous avons quantifié ces lipides à l'aide de droites d'étalonnage représentant l'expression de la concentration en fonction de la surface des pics chromatographiques. Nous avons pu mettre en évidence, au sein de la membrane du drépanocyte, deux types de perturbations :

- une augmentation significative des lysophosphatides, redoutés pour leur propriété hyperhémolytante,
- une baisse concomitante de la teneur en lipides des membranes.

Nous nous sommes intéressés également aux paramètres suivants : malondialdéhyde (MDA) , superoxyde dismutase (SOD) et glutathion peroxydase (GPX) de la membrane érythrocytaire.

A l'heure actuelle le malondialdéhyde est le marqueur biochimique le plus utilisé pour évaluer la lipidoperoxydation ; il en reflète l'intensité. Son taux est significativement plus important chez les drépanocytaires AS de notre série et davantage chez les homozygotes SS comparativement aux sujets témoins AA.

L'augmentation du MDA, observée dans notre étude, suggère que la peroxydation lipidique est particulièrement intense au cours de la drépanocytose. Elle est paradoxalement associée à l'hyperactivité antioxydante de la SOD et de la GPX. Les deux enzymes en effet, dans les conditions physiologiques normales, régulent les attaques radicalaires des lipides de l'érythrocyte. Leur hyperactivité chez nos malades ne semblent pas contrôler la lipidoperoxydation. Il y aurait donc au cours de la drépanocytose un dépassement du potentiel antioxydant enzymatique, pourtant fonctionnellement normal, par un stress oxydatif particulièrement intense.

Les troubles biochimiques observés dans notre étude expérimentale pourraient avoir un déterminisme commun : la peroxydation lipidique. Celle-là par son intensité déborderait les facteurs de régulation au cours de la drépanocytose.

Il en résulte des pertes en lipides mais aussi et surtout l'apparition de métabolites toxiques : les lysophosphatides et le malondialdéhyde au sein de la membrane du drépanocyte.

Ces anomalies biochimiques associées à la gélification intraérythrocytaire de l'hémoglobine S sous-tendraient certains phénomènes physiopathologiques qui caractérisent la drépanocytose. Il s'agit entre autres de la falciformation, des troubles hémorhéologiques et surtout de l'hyperhémolyse.

Nos résultats devraient contribuer à établir un maillon supplémentaire dans l'explication de la pathogénie de l'anémie falciforme. Ils devraient également permettre d'asseoir une stratégie thérapeutique orientée notamment vers l'utilisation d'antioxydants et / ou la supplémentation en acides gras polyinsaturés (AGPI) pour la protection et la restauration de la membrane des drépanocytes.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

1. **ALTIMIMI D. J., DORMANDY T.L.**  
The inhibition of lipid autoxidation by human coeruloplasmin.  
*Biochem. J.*, 1977 ; **168** : 283-288.
2. **ALVAREZ J.G.**  
Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity.  
*J. Androl.*, 1987 ; **8**, 5 : 338-348.
3. **AMES B.N., CATHCART N., SCLUVIER E.**  
Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer : an hypothesis.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 1981 ; **78** : 6858-6862.
4. **ANDERSON W.F.**  
Gene therapy.  
*JAMA*, 1981 ; **246** : 2737.
5. **ANDERSON W.F.**  
Prospects for human gene therapy.  
*Science*, 1984 ; **226** : 401.
6. **APOVO M.**  
Rôle du calcium intra-érythrocytaire dans la physiopathologie de la drépanocytose.  
*Th. Méd. Paris 1*, 1991 ; 91 PA : 22-23.
7. **AUST S.D., SVINGEN B.A.**  
The role of iron in enzymatic lipid peroxidation.  
In free radicals in biology.  
Edited by W.A. New York Academic, 1982 ; 5 : 1-28.
8. **BACHIR D., BEAUVAIS P.**  
Prise en charge des patients drépanocytaires.  
*Rev. Prat.*, 1992 ; **42**, 15 : 1900-1907.

9. **BEAUVAIS P.**  
Drépanocytose et séquestration splénique chronique.  
*Nouv. Presse Méd.*, 1981 ; **10** : 1844.
10. **BEGUE P.**  
La maladie drépanocytaire.  
Sandoz Ed. Paris, 1984.
11. **BENESCH E., YUNG S., SUZUKI T.**  
Pyridoxal compounds as specific reagents for the  $\alpha$  and  $\beta$  - N termini of hemoglobin.  
*Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 1973 ; **70** : 2595-2599.
12. **BENSINGER T.A., GILLETE P.N.**  
Hémolysis in sickle cell disease.  
*Arch. Intern. Med.*, 1974 ; **133** : 624-631.
13. **BERCHEL C., DIARA J.P., LORET H.**  
Histoire naturelle de la drépanocytose.  
*Revue du praticien*, 1992 ; **42**, 15 : 1885-1891.
14. **BERNARD J., RUFFIC J.**  
Hématologie géographique.  
Collection médico-chirurgicale, Tome II, Paris, 1972, Masson Ed.
15. **BEUGARD Y.**  
Perspectives thérapeutiques de la drépanocytose.  
*Rev. Prat.*, 1992 ; **42**, 15 : 1908-1911.
16. **BLUM J., FRIDOVITCH I.**  
Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 1985 ; **240** : 500-508.

17. **BREWER G.J., BREWER L.F., PRASAD A.S.**  
Suppression of irreversibly sickled erythrocytes by zinc therapy in sickle cell anemia.  
*J. Lab. Clin. Med.*, 1977 ; **90** : 549-554.
18. **BREWER G.J., OELSHLEGEL F.J.**  
Antisickling effects of zinc.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974 ; **58** : 854-861.
19. **BUCHANAN G.R.**  
Sickle cell disease : recent advances.  
*Curr. Probl. Pediatr.*, 1993 ; **23**, 6 : 219-229.
20. **CARRUTHERS A., MELCHIOR A.L.**  
How bilayer lipids affect membrane protein activity.  
*Trends Biochem. Sci.*, 1986 ; **11** : 331-335.
21. **CERAMI A., MANNING J.M.**  
Potassium cyanate as an inhibitor of the sickling of erythrocytes in vitro.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981 ; **68** : 1180-1183.
22. **CHAPMAN D., HARRIS P.L.**  
How bilayer lipids affect biomembrane components.  
*Prog. Membr. Biotechnol.*, 1991 : 1-11.
23. **CHARACHE S., DOVER G.J., MOORE R.D.**  
Hydroxyurea : effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia.  
*Blood*, 1992 ; **79** : 2555-2565.
24. **CHAUDIERE J.**  
Glutathion peroxydase : un élément central du système de protection de nos cellules.  
*Technique et documentation Lavoisier*, Paris, 1988 : 137-154.

25. **CHAUDIÈRE J., CLEMENT M., GERARD D.**  
Induction of selenium-glutathione peroxidase by stimulation of metabolic hydrogen peroxide production in vitro.  
*Bioelectrochem. Bioenerget.*, 1988 : 148-153.
26. **CHAZAN J.B., SZULC M.**  
Radicaux libres et vitamine E.  
*Cah. Nutr. Diét.*, 1987 ; XXII, 1 : 66-76.
27. **CHIEN S., USAMI S., BERTLES J.F.**  
Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia.  
*The Journal of Clinical Investigation*, 1970 ; 49 : 623-629.
28. **CHIO K.S., TAPPEL A.L.**  
Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malonaldehyde.  
*Biochemistry*, 1969 ; 8 : 2827-2832.
29. **CHIU D., LUBIN B., SHOHET S.B.**  
Susceptibility of sickle erythrocytes to lipid peroxydation.  
*British Journal of Haematology*, 1979 ; 41 : 225-232.
30. **CLARK M.R., ROSSI M.E.**  
Permeability characteristics of deoxygenated sickle cells.  
*Blood*, 1990, 76 : 2139-2145.
31. **CLAVEL J.P., EMERIT J., THUILLIER A.**  
Lipidoperoxydation et radicaux libres. Rôle en biologie cellulaire et en pathologie.  
*Path. Biol.*, 1985, 33, 1 : 1908-1917.
32. **CLINE M.J.**  
Genetic engineering of mammalian cells : its potential application of genetic disease of man.  
*J. Lab. Clin. Med.*, 1982, 99 : 299.

33. **CLOSTRE F.**  
Physiopathologie de la drépanocytose.  
L'objectif médical magazine n° 121-122. Octobre 1993 : 37-43.
34. **COHEN G., HOCHSTEIN P.**  
Glutathione peroxidase : the primary agent for the elimination of hydrogen peroxides in erythrocytes.  
*Biochemistry*, 1963 ; 2, 6 : 1420-1428.
35. **COOPER R.A., JANDL J.A.**  
The role of membrane lipids in the survival of red cells in hereditary spherocytosis.  
*J. Clin. Invest.* 1969, 48 : 736.
36. **COOPER R.A., SANFORT J., SHATTIL M.D.**  
Mechanisms of hemolysis. The minimal Red cell defect.  
*The New England Journal of Medicine*, 1971 ; 285, 27 : 1514-1520.
37. **COOPER R.A., SHATTIL S.J.**  
The red cell membrane in hemolytic anemia.  
*Mod. Treat.*, 1971, 8, 2 : 329-351.
38. **COOPERATIVE UREA TRIALS GROUPS**  
Treatment of sickle cell crisis with urea in invest sugar.  
*J. Am. Med. Assoc.*, 1974 ; 228 : 1125.
39. **CRASTES DE PAULET A.**  
Les lipides membranaires : une cible privilégiée des radicaux libres.  
*Cah. Nutr. Diet.*, 1983 ; XXII : 23-33.
40. **DARNELL J. LODISH H., BALTIMORE D.**  
Molecular cell biology.  
Scientific American Books, 1986 : 57.

41. **DAS S.K., NAIR R.C.**  
Superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes.  
*Br. J. Haematol.*, 1980 ; **44** : 87-92.
42. **DEAN J., SCHECHTER A.N.**  
Sickle cell anemia molecular and cellular bases of therapeutic approaches.  
*N. Engl. J. Med.*, 1978, **299** : 752-753.
43. **DEBY C.**  
La biochimie de l'oxygène.  
*Recherche*, Janv. 1991 ; **22**, 228 : 57-64.
44. **DEBY C., PINCEMAIL J.**  
Toxicité de l'oxygène, radicaux libres et moyens de défense.  
*Presse Médicale*, 1986 ; **15**, 31 : 1468-1474.
45. **DEISSEROTH A., NIENHUIS A., LAURANCE J.**  
Chromosomal localization of human  $\beta$ -globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978 : **75** : 1456-1460.
46. **DE SIMONE P.J., HELLER P., HALL L.S.**  
5-azacytidine stimulates fetal hemoglobin (Hb F) synthesis in anemic baboons.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982 ; **78** : 6290-6294.
47. **DIBY C., PINCEMONT J.**  
Toxicité de l'oxygène, radicaux libres et moyens de défense.  
*Presse Médicale*, 1986 ; **15**, 31 : 1468-1474.
48. **DOBBRETSOR G.E., BORSCHEVSKAYA T.A., PETROV V.A.**  
The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation.  
*FEBS Lett.*, 1977 ; **84** : 125-128.

49. **EATON J.W., SKELTON T.D., SWOFFORD H.S.**  
Elevated erythrocyte calcium in sickle cell disease.  
*Nature*, 1973 ; 246 : 105-106.
50. **EMERIT J., KLEIN J.M., COUTELLIER A.**  
Radicaux libres et peroxydation lipidique en biologie cellulaire : perspectives  
physiopathologiques.  
*Path. Biol.*, 1991 ; 39, 4 : 316-327.
51. **EVANS E.A., MOHANDAS N., LENG A.**  
Static and dynamic rigidities of normal and sickle erythrocytes.  
*J. Clin. Invest.*, 1984 ; 73 : 477.
52. **FERRADINI C.**  
Espèces activées radicalaires de l'oxygène.  
*Biochimie*, 1986 ; 68 : 779-785.
53. **FERRONE F.A.**  
The polymerization of sickle hemoglobin in solutions and cells.  
*Experientia*, 1993 ; 42, 2 : 110-117.
54. **FIROZE B.J., JAMES E.E., MC CHIER R.H.**  
High performance liquid chromatographic analysis of phosphatidylcholine  
and sphingomycline with detection in the region of 200nm.  
*Biochem. J.*, 1976 ; 155 : 55-60.
55. **FOLCH J., LESS M., SLOANE S.G.H.**  
A simple method for isolation and purification of total lipids from animal  
tissues.  
*T. Biochem.*, 1957 ; 226 : 497-509.
56. **FRAGA C.G., TAPPEL A.L., LEIBOVITZ B.E.**  
Lability of Red blood cell membranes to lipid peroxidation : application to  
human fed polyunsaturated lipids.  
*Lipids*, 1990 ; 25, 2 : 11-114.

57. **FRANCIS R.B., JOHNSON C.S.**  
Vascular occlusion in sickle cell disease : current concepts and unanswered questions.  
*Blood*, 1991 ; 77 : 1405-1414.
58. **FRANKEL E.N.**  
Lipid oxidation : mechanisms, products and biological significance.  
*J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 1984 ; 61 : 1908-1917.
59. **FRANKLIN I.M., LINCH D.C.**  
Dexamethazone and in vitro sickling.  
*Lancet*, 1979 ; 2 : 654-646.
60. **FREDERIK J., VAN K., SEVANI A.**  
A new role for phospholipase A<sub>2</sub> : protection of membrane from lipid peroxidation damage.  
*TIBS*, 1987 ; 12 : 31-34.
61. **FRIDOVITCH I.**  
Superoxyde dismutase.  
*Adv. Enzym.*, 1974 ; 41 : 35-98.
62. **FRIDOVITCH I.**  
Les superoxydes ou les dangers de la vie aérobie.  
*Recherche*, Sept. 1978 ; 9, 92 : 743-749.
63. **GALECTOEROS F., DORMONT S.**  
Drépanocytose et santé publique.  
Colloque / Paris 1990 : 253.
64. **GERLI G.C., BERETTA L., BIANCHI M.**  
Erythrocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in  $\beta$ -thalassemia.  
*Scand. J. Haematol.*, 1980 ; 25 : 87-92.

65. **GEURTS VAN KESSEL W.S.M., HAX W.M.A.**  
High performance liquid chromatographic separation and direct ultraviolet detection of phospholipids.  
*Biochemica et Biophysica Acta*, 1977 ; **486** : 524-534.
66. **GIROT R., DE MONTALEMBERT M.**  
La drépanocytose est une maladie thrombo-embolique.  
*STV*, 1992 ; **4, 2** : 113-118.
67. **GOLDBERG B., STERN A.**  
The role of superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 1977 ; **178** : 218-225.
68. **GOLDSTEIN IRA M., KAPLAN HAWARD B., EDELSON H.S., WEISSMAN G.**  
Coeruloplasmin : a scavenger of superoxide anion radicals.  
*T. Biol. Chem.*, 1979 ; **254, 10** : 4040-4045.
69. **HALLIWEL B.**  
Biochemical mechanisms accounting for the toxicity of oxygen on living organisms : the key role superoxide dismutase.  
*Cell. Biol. Int. Rep.*, 1978 ; **2** : 113-128.
70. **HALLIWEL B., GUTTERIDGE J.M.C.**  
Lipid peroxidation oxygen radicals, cell damage and anti-oxidant therapy.  
*The lancet*, June 23, 1984 : 1396-1397.
71. **HANSENS V.L., PARK J.Y., OSBORN T.W.**  
High performance liquid chromatographic analysis of egg yolk phospholipid.  
*Journal of chromatography*, 1981 ; **205** : 393-400.
72. **HASSAN H.M., SCHELLRORN H.E.**  
Superoxide dismutase : an antioxidant defense enzyme.  
*Molecular Biology and pathologie*, 1988 : Man R. Liss, Inc : 183-193.

73. **HEBBEL R.P.**  
Autoxidation and a membrane-associated "fenton reagent" : a possible implanation for the development of membrane lesions in sickle cells.  
*Clinic haemat.*, 1985, **14** : 129-140.
74. **HEBBEL R.P., YAMADA O., MOLDOW C.F.**  
Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium.  
*J. Clin. Invest.*, 1980 ; **65** : 154.
75. **HEMLER M.E., COOK H.W., LANAS W.E.M**  
Prostaglandin synthesis can be triggered by lipid peroxides.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 1979 ; **193** : 340-345.
76. **HERNANDEZ P., CRUZ C., SANTOS M.N.**  
Immunologie dysfunction in sickle cell anaemia.  
*Acta Haematol.*, 1980 ; **63** : 156-161.
77. **HIGGS D.R., ALDRIDGE B.E., LAMB J.**  
The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle cell disease.  
*N. Engl. T. Med.*, 1982 ; **306** : 1441-1446.
78. **HORNE M.C., DONALD K.**  
Sickle cell anemia as a rheologic disease.  
*Am. J. Med.*, 1981 ; **70** : 288-298.
79. **HORTON A.A.**  
Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity.  
*CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 1987 ; **18**, 1 : 27-79.
80. **INGRAM V.M.**  
Gene mutation in human hemoglobin : chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin.  
*Nature*, 1957 ; **180** : 326-328.

81. **INGRAM V.M.**  
Sur la nature des hémoglobines anormales.  
Exposés annuels de Bioch. Méd. Paris Masson, 1958 ; 20 : 123.
82. **ISAACS W.A., EFFIONG C.E., AYENI O.**  
Steroid treatment in the prevention of painful episodes in sickle-cell disease.  
The Lancet, March 11, 1972 : 570-573.
83. **IZUMO H.S., LEAR M., WILLIAM R.**  
Sodium-potassium pump, ion fluxes and cellular dehydration in sickle cell anemia.  
*J. Clin. Invest.*, 1987 ; 79 : 1621-1630.
84. **JACKSON J.F., ODOM J.L., BELL W.N.**  
Amelioration of sickle cell disease by persistent fetal hemoglobin.  
*JAMA*, 1961 ; 177 : 867-869.
85. **JAIN S.K.**  
The accumulation of malondialdehyde of fatty acide peroxidation can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes.  
*The Journal of Biological Chemistry*, 1984 ; 259, 6 : 3391-3394.
86. **JAIN S.K., SHOLET S.B.**  
Calcium potentiates the peroxidation of erythrocyte membrane lipids.  
*Biochem. Biophys. Acta*, 1981, 642 : 46-54.
87. **JOINER C.H., MORRIS C.L., COOPER E.S.**  
Deoxygenation induced cation fluxes in sickle cells.  
*Am. J. Physiol.*, 1993 ; 264, 3 : C734-C744.

88. **KARK J.A., TARASSOFF P.G.**  
Pyridoxal phosphate as an antisickling agent in vitro.  
Workshop on development of therapeutic agents for sickle cell disease.  
Bethesda, 1983 ; 18 (Abstr).
89. **KAUL D.K., NAGEL R.L.**  
Sickle cell vaso-occlusion : many issues and some answers.  
*Experientia*, 1993 ; 49, 1 : 5-15.
90. **KAUL D.K., NAGEL R.L., CHEN D.**  
Sickle cell adhesion to the endothelium in flow conditions : the role of Von  
willebrand factor.  
*Blood*, 1991; 78 : 369 a.
91. **KENNY M.W., MEAKIN M., WORTTHINGTON D.J.**  
Erythrocyte deformability in sickle-celle crisis.  
*British Journal of Haematology*, 1981 ; 49 : 103-109.
92. **KINELBERG H.K.**  
The influence of membrane fluidity on the activity of membrane bound  
enzymes.  
*Cell Surface Reviews*, 1977 ; 3 : 205-293.
93. **KLOTZ I.M., HANEY D.N., KING L.C.**  
Rational approaches to chemotherapy : antisickling agents.  
*Science*, 1981 ; 213 : 724-731.
94. **KOHN H.I., LIVERSEDGE M.J.**  
*Pharmacol. Exp. Ther.*, 1944 ; 84 : 292-300.
95. **LAVELLE F., MICHELSON A.M., DIMITRIJEVIC L.**  
Biological protection by superoxide dismutase.  
*Biochem. Biophys., Res. Commun.*, 1973 ; 55 : 350-357.

96. **LEIKIN S., GALLAGHER D., KINNELY T.R.**  
Mortality in children and adolescents with sickle cell disease.  
*Pediatrics*, 1989 ; **84** : 500-508.
97. **LEMERCIER Y., MECHALI D., COULAUD J.P.**  
Physiopathologie de la sensibilité des drépanocytaires à l'infection pneumococcique.  
*Méd. Mal. Inf.*, 1979 ; **9**, 12 : 704-706.
98. **LEY T.J., DE SIMONE F.L., NOGUCHI C.T.**  
5-Azacytidine increases  $\gamma$ -globin synthesis and reduces the proportion of dense cells in patients with sickle cell anemia.  
*Blood*, 1983 ; **62** : 370-380.
99. **LUBIN B.**  
Abnormalities in membran phospholipid organization in sickled erythrocytes.  
*J. Clin. Invest.*, 1981 ; **67** : 1643-1649.
100. **LYNCH R., FRIDOVICH I.**  
Effects of superoxide on the erythrocyte membrane.  
*J. Biol. Chem.*, 1978 ; **253** : 1838-1845.
101. **Mc CAY R.**  
Vitamin E : interaction with free radical and ascorbate.  
*Ann. Rev. Nutr.*, 1985 ; **5** : 323-340.
102. **Mc CORD J.M., FRIDOVITCH I.**  
Superoxide dismutase : enzymatic functions for erythrocyte.  
*J. Biol. Chem.*, 1969 ; **244**, 22 : 6049-6055.
103. **MINOTTI G.**  
The role of iron in the initiation of lipid peroxidation.  
*Chem. Phys. Lipids*, 1987 ; **44**, 2-4 : 191-208.

104. **NAGEL R.L., JOHNSON J., BOOCHIM R.M.**  
β- Chain contact sites in the haemoglobin S polymer.  
*Nature*, 1980 ; **283** : 832-834.
105. **NEY P., CHRISTOPHER M., HEBBEL R.P.**  
Synergistic effects of oxidation and deformation on erythrocyte monovalent cations leak.  
*Blood*, 1990 ; **75** : 1192.
106. **NICOLE A., SINET M.**  
Mesures des activités des superoxydes dismutases et valeurs physiopathologiques.  
In : Biologie des lipides chez l'Homme de la physiologie à la pathologie.  
Technique et Documentation Lavoisier 1988 : 273.
107. **PAGLIA D.E., VALENTINE W.N.**  
Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase.  
*J. Lab. Clin. Med.*, 1967 ; **70** : 158-169.
108. **PAIN R.H.**  
Dressing the SOD.  
*Nature*, 1983 ; **306** : 228.
109. **PAULING L., ITANO H.A., SINGERS J.**  
Sickle cell anemia : a molecular disease.  
*Science*, 1949 ; **110** : 543-548.
110. **PEARSON H.A., SPENCER R.P., CORNELIUS E.D.**  
Functional asplenia in sickle cell anaemia.  
*New. Engl. J. Med.*, 1969 ; **281** : 923-926.
111. **PERUTZ M.F.**  
Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxid.  
*Ann. Rev. Physiol.*, 1990 ; **52** : 1-25.

112. **PFAFFEROTT C., NEIRELMAN J., HOCHSTEIN P.**  
The effect of malondialdehyde on erythrocyte deformability.  
*Blood*, 1982 ; **59** : 12-15.
113. **RICE EVANS C., OMORPHOS S., BAYSAL E.**  
Sickle cell membranes and oxidative damage.  
*Biochem. J.*, 1986 ; **237** : 265.
114. **RICHTER C.**  
Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes.  
*Chemistry and physics of lipids*, 1987 ; **44** : 175-189.
115. **ROSTRUCH J.T., POPE A.L., GAUTHIER H.E.**  
Selenium : biochemical role as a component of glutathione peroxidases.  
*Science*, 1973 ; **179**, 4073 : 588-590.
116. **ROTH E.F., ARNONE A., BOOKCHIN R.M.**  
Chemical modification of human hemoglobin by antisickling concentration of nitrogen mustard.  
*Blood*, 1981 ; **58** : 300-308.
117. **SARR N.G.**  
Contribution à l'étude de la composition et de la teneur en phospholipides de la membrane du drépanocyte.  
Mem. DEA : Chimie-biochimie des produits naturels, Dakar, 1994, 37p.
118. **SATGE P., OUDART J.L., DAN V.**  
Les hémoglobines chez l'enfant au Sénégal. Les hémoglobines africaines.  
Rapports V<sup>es</sup> Journées Médicales de Dakar, (Janvier 1967).
119. **SCHWARTZ D.**  
Methodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.  
Flammarion, Médecine-Sciences, Paris, 1963.

120. **SEVANIAN A., KIM E.**  
Phospholipase A<sub>2</sub> dependent release of fatty acids from peroxidized membranes.  
*J. Free Rad. Biol. Med.*, 1985 ; 1 : 263-271.
121. **SHEETZ M.P., SINGER S.J.**  
Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug erythrocyte interactions.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974 ; 71 : 4457-4461.
122. **SHI-HUA CHEN S., KOU Y.A.**  
Improved procedure for the separation of phospholipids by high performance liquid chromatography.  
*Journal of chromatography*, 1982 ; 227 : 25-31.
123. **SHOHET S.B.**  
Hemolysis and changes in erythrocyte membrane lipids.  
*New Engl. J. Med.*, 1972 ; 286 : 577-587.
124. **SINET P.M., GARBER P.**  
Inactivation of human Cu Zn superoxide dismutase during exposure to O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  
*Arch. Biochem. Biophysics*, 1981 ; 212 : 411-416.
125. **SINGER S.J., NICOLSON G.L.**  
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.  
*Science*, 1972 : 175 : 720-731.
126. **STOCKS J., KEMP M., DORMANDY T.L.**  
Increased susceptibility of red-blood-cell lipids to autoxidation in haemolytic states.  
*The Lancet*, 1971 : 266-269.

127. **STOCKER R., YAMAMOTO Y., MC DONAGH A.F.**  
Bilirubin is an antioxidant of possible physiologic importance.  
*Science*, 1987 ; **235** : 1043-1046.
128. **TRAINER J.A., GETZOFF E.D., RICHARDSON J.S.**  
Structure and mechanism of Cu Zn superoxide dismutase.  
*Nature*, 1983 ; **306** : 284-287.
129. **THO L.L.**  
Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes  
as indices of oxygen loading in disease : a survey of one hundred cases.  
*Biochem. Med. Metab. Biol.*, 1987 ; **38**, 1 : 74-80.
130. **YAGI K.**  
Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma.  
*Biochem. Med.*, 1976 ; **15** : 212-216.

# SERMENT D'HIPPOCRATE

---

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la Probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et je n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

VU  
LE PRESIDENT DU JURY

VU  
LE DOYEN

VU ET PERMIS D'IMPRIMER  
LE RECTEUR DE L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR