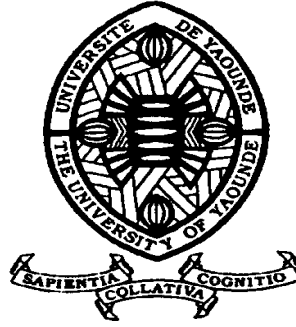


REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

CENTRE DE RECHERCHE DE
FORMATION DOCTORALE SCIENCE
DE LA VIE, SANTE
ET ENVIRONNEMENT



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF
BIOCHEMISTRY

CENTRE FOR RESEARCH AND
DOCTORAL TRAINING IN
GRADUATE STUDIES IN LIFE
SCIENCE, HEALTH AND
ENVIRONMENT

**Évaluation des marqueurs du stress oxydant et de
la dyslipidémie chez les patients en hémodialyse
chronique au Cameroun et étude de la qualité
bactériologique de l'eau pour hémodialyse**

THÈSE

Soutenue en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat/Ph.D en
Biochimie

Par : GUEGUIM Cédric
Master en Biochimie

Sous la direction de
NNANGA NGA
Maître de Conférences
FMSB-UY1
MBACHAM FON Wilfred
Professeur
FS-UYI

Année Académique : 2018





DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION DE LA THÈSE DE
DOCTORAT/Ph.D

Nous soussignés : Professeur **PENLAP BENG Véronique**, Professeur **FOKOU Elie** et Professeur **NJAYOU Frédéric Nico**, respectivement Président du jury et Examineurs de la Thèse de Doctorat/Ph.D de Monsieur **GUEGUIM Cédric**, Matricule **07R314**, préparée sous la direction du Professeur **NNANGA NGA** et la supervision du Professeur **MBACHAM FON Wilfred**, intitulée : « **Evaluation des marqueurs du stress oxydant et de la dyslipidémie chez les patients en hémodialyse chronique au Cameroun et étude de la qualité bactériologique de l'eau pour hémodialyse** », soutenue le Mercredi, 31 Octobre 2018 dans la salle S01/S02 du bloc pédagogique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, en vue de l'obtention du diplôme de Docteur/Ph.D en Biochimie, Option Biotechnologie et Développement, attestons que toutes les corrections demandées par le jury de soutenance ont été effectuées.

En foi de quoi, la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé le **27 NOV 2018**

Examineurs

Le Président du jury


Le Chef de Département


Pr. Elie Fokou
Dr. d'Etat en Biochimie
Nutrition et Sciences Alimentaires


Pr. Véronique N. PENLAP BENG
Professeur


Paul D3C.D. Etal
Professor
Enzymology-Toxicology

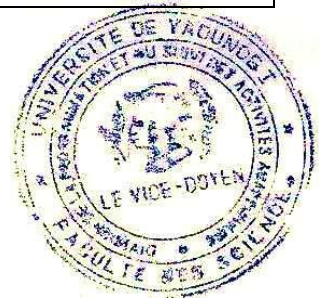

Prof. Njayerou Frédéric Nico
Professeur - Maître de Conférences
Université de Yaoundé I

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I FACULTÉ DES SCIENCES Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		The University of Yaoundé I Faculty of Science Division of Programming and follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF	

ANNÉE ACADÉMIQUE 2017/2018

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION : (10 Mars 2018)



ADMINISTRATION

DOYEN : AWONO ONANA, Professeur

VICE-DOYEN / DPSAA : DONGO Etienne, Professeur

VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM, Maître de Conférences

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, Maître de Conférences

Chef Division Affaires Académiques, Scolarité et Recherche : MBAZE MEVA'A Luc
Professeur

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., Maître de
Conférences

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (39)			
N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BENG née NINTCHOM PENLAP V.	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	MBACHAM Wilfried	Professeur	En poste
4	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
5	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
6	BIGOGA DIAGA Jude	Maître de Conférences	En poste
7	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
8	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste

9	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
10	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
11	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
12	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
1	WAKAM née NANA Louise	Maître de Conférences	En poste
14	BELINGA née NDOYE FOE Marie C. Florentine	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
15	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
17	ACHU Merci BIH	Chargé de Cours	En poste
18	AZANTSA Boris	Chargé de Cours	En poste
19	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Chargé de Cours	En poste
20	DJUJKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
21	DJOKAM TAMO Rosine	Chargé de Cours	<i>En disponibilité</i>
22	EVEHE BEBANDOUÉ Marie –Solange	Chargé de Cours	<i>En disponibilité</i>
23	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
24	KOTUE TAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
25	MBONG ANGIE MOUGANDE Mary Ann	Chargé de Cours	En poste
26	MOFOR née TEUGWA Clautilde	Chargé de Cours	<i>IA4/MINESUP</i>
27	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
28	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste
29	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KAILAH	Chargé de Cours	En poste
31	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
32	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
33	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
34	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
35	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
36	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargé de Cours	En poste
37	BEBEE FADIMATOU	Assistant	En poste
38	MBOUCHE FANMOE Marcelline Joëlle	Assistant	En poste
39	TIENTCHEU DJOKAM Léopold	Assistant	<i>En disponibilité</i>

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (B.P.A.) (44)

1	BILONG BILONG Charles Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
4	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
5	MIMPFOUNDI REMY	Professeur	En poste

6	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
7	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
8	NOLA Moïse	Professeur	En poste
9	TAN Paul Vernyuy	Professeur	En poste
10	TCHUEM TCHUENTE Louis	Professeur	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
11	AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM	Maître de Conférences	V/DSSE
12	DJIETO Lordon Champlain	Maître de Conférences	En poste
13	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
14	ESSOMBA née NTSAMA MBALLA	Maître de Conférences	<i>VDRC/Chef dépt FMSB</i>
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	En poste
16	KAMGANG René	Maître de Conférences	<i>C.E. MINRESI</i>
17	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
18	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
19	MONY NTONE Ruth	Maître de Conférences	En poste
20	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste
20	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. /MINSUP</i>
21	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
22	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
23	BILANDA Danielle Claude	Chargé de Cours	En poste
24	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
25	GOUNOU KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
26	JATSA MEGAPTCHE Hermine	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
27	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
28	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
29	MOUGANG NGAMENI Luciane	Chargé de Cours	En poste
30	LEKEUFACK FOLEFACK Guy Benoît	Chargé de Cours	En poste
31	NGOUATEU KENFACK Omer BEBE	Chargé de Cours	En poste
32	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Chargé de Cours	En poste
33	NGUEMBOCK	Chargé de Cours	En poste
34	NJUA Clarisse YAFI	Chargé de Cours	En poste
35	TADU Zéphirin	Chargé de Cours	En poste
36	TOMBI Jeannette	Chargé de Cours	En poste
37	YEDE	Chargé de Cours	En poste
38	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
39	KANDEDA KAVAYE Antoine	Assistant	En poste
40	KOGA MANG'Dobara	Assistant	En poste
41	METCHI DONGFACK Mireille Flore	Assistant	En poste
40	NOAH E. O. Vivien	Assistant	En poste
41	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Assistant	En poste

3-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES (B. P. V.) (27)			
1	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
2	AMBANG Zachée	Professeur	DAARS / UYII
3	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
4	BELL Joseph Martin	Maître de Conférences	En poste
5	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
6	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
7	MBOLO Marie.	Maître de Conférences	<i>Coordo. Programme MINFOF</i>
8	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
9	ZAPFACK Louis	Maître de Conférences	En poste
10	ANGONI Hyacinthe	Chargé de Cours	En poste
11	BIYE Elvire Hortense	Chargé de Cours	En poste
12	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Chargé de Cours	En poste
13	MALLA Armand William	Chargé de Cours	En poste
14	MBARGA BINDZI Marie Alain.	Chargé de Cours	<i>Inspecteur académ. N°1 MINESUP</i>
15	NGALLE Hermine BILLE	Chargé de Cours	En poste
16	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Chargé de Cours	En poste
17	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy Léonard	Chargé de Cours	En poste
18	NGOOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
19	NSOM ZAMO Annie Claude ép. Pial	Chargé de Cours	<i>Expert national./UNESCO</i>
20	ONANA Jean Michel	Chargé de Cours	En poste
21	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
22	TSOATA Esaïe	Chargé de Cours	En poste
23	DJEUANI Astride Carole	Assistant	En poste
24	GONMADGE Christelle	Assistant	En poste
25	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Assistant	En poste
26	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistant	En poste
27	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Assistant	En poste
4-DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (C.I.) (35)			
1	KETCHA MBADCAM Joseph	Professeur	Chef de Département
2	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
3	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen/ UD</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Directeur Cabinet PM</i>
5	LAMINSI Samuel	Professeur	En poste
6	MELO née CHINJE Uphie F.	Professeur	<i>Recteur/UN</i>
7	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice-Recteur/ Ubda</i>
8	NANSEU Charles Péguy	Professeur	En poste

9	NENWA Justin	Professeur	En poste
10	BABALE DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	En poste
11	DJOUFAC WOUUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	ELIMBI Antoine	Maître de Conférences	En poste
13	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
14	NDIKONTAR Maurice KOR	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen/Ubda</i>
15	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>Recteur /UB</i>
16	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
17	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
18	CHEUMANI YONA Arnaud	Chargé de Cours	En poste
19	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
20	GWET Simon – Pierre	Chargé de Cours	En poste
21	KAMGANG YOUBI Georges	Chargé de Cours	En poste
22	KEUMEGNE MBOUGUEM Jean Claude	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO Gustave	Chargé de Cours	En poste
24	MBEY Jean Aimé	Chargé de Cours	En poste
25	NDI Julius NSAMI	Chargé de Cours	En poste
26	NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargé de Cours	En poste
27	NJIOMOU Chantale épouse DJANGANG	Chargé de Cours	En poste
28	NJOYA Dayirou	Chargé de Cours	En poste
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE Awaou	Chargé de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Assistant	En poste
33	KOUOTOU DAOUDA	Assistant	En poste
34	MAKON Thomas Beauregar	Assistant	En poste
35	NCHIMI NONO Katia	Assistant	En poste

5-DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (C.O.) (33)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/ DPSSA
2	GHOGOMU TIH ROBERT RALPH	Professeur	<i>Directeur I.B.A. Foumban</i>
3	MBAFOR Joseph	Professeur	En poste
4	NGADJUI TCHALEU B.	Professeur	<i>Chef de dépt FMBS</i>
5	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de dépt. UDs</i>
6	NKENGFACK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
7	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Directeur /UN</i>
8	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur au MINESUP</i>
9	WANDJI Jean	Professeur	En poste

10	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ UYI</i>
11	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
15	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
16	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Vice-Recteur/ UYII</i>
17	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
18	TCHUENDEM KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
19	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
20	AMBASSA Pantaleon	Chargé de Cours	En poste
21	EYONG Kenneth OBEN	Chargé de Cours	En poste
22	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
23	KAMTO Eutrophe Ledoux	Chargé de Cours	En poste
24	MKOUNGA Pierre	Chargé de Cours	En poste
25	NGO MBING Joséphine	Chargé de Cours	En poste
26	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	Chef Cell/ MINRESI
27	NOTE LOUGBOT Olivier	Chargé de Cours	CEA/MINESUP
28	OUAHOUE WACHE Blandine Marlyse	Chargé de Cours	En poste
29	TABOPDA KUATE Turibio	Chargé de Cours	En poste
30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDEGOUNBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
32	NGINTEDO Dominique	Assistant	En poste
33	NGOMO Orléans	Assistant	En poste

6-DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (30)

1	FOUDA NDJODO Marcel	Professeur	<i>IGA-MINESUP/Chef Dpt ENS</i>
2	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	Chef de Département <i>Chef Division MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	CHEDOM FOTSO Donatien	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera Youth KIMBI	Chargé de Cours	En poste
6	KOUOKAM KOUOKAM Etienne Appolin	Chargé de Cours	En poste
7	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
8	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
10	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
11	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

12	ABESSOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
13	AMINOOU Halilou	Assistant	En poste
14	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
15	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
16	EBELE Serge	Assistant	En poste
17	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
18	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistant	En poste
19	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
20	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
21	MAKEMBE S. Fritz Oswald	Assistant	En poste
22	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistant	En poste
23	MONTHE DJIADEU Valery Martial	Assistant	En poste
24	NKONDOCK MI BAHANACK Nicolas	Assistant	En poste
25	OLE OLE David Claude	Assistant	En poste
26	TAPAMO KENFACK Hyppolite	Assistant	En poste

7-DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUES (MA) (33)

1	BEKOLLE David	Professeur	<i>Vice-Recteur UN</i>
2	BITJONG NDOMBOL	Professeur	En poste
3	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
4	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
5	EMVUDU WONO Yves S.	Maître de Conférences	Dir.MINESUP
6	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
7	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
8	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	C.E. MINEPAT
9	BOGSO Antoine M	Chargé de Cours	En poste
10	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
11	DOUANLA YONTA Hermann	Chargé de Cours	En poste
12	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
13	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
14	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
15	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
16	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
17	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
18	MBELE BEDIMA Martin	Chargé de Cours	En poste
19	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
20	NGUEFACK Bertrand	Chargé de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste

23	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
24	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne- Marie	Chargé de Cours	En poste
26	DJIADEU NGAHA Michel	Assistant	En poste
27	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
28	NIMPA PEFOUKEU Romain	Assistant	En poste
29	TANG AHANDA Barnabé	Assistant	<i>Chef Serv. MINPLAMAT</i>
30	TETSADJIO TCHILEPECK Mesmin Erick	Assistant	En poste

8-DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MB) (12)

1	ETOA François-Xavier	Professeur	Recteur UDO/ Chef de Département
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	ESSIA NGANG Jean Justin	Maître de Conférences	<i>Chef de Division recherche IMPM</i>
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	ESSONO OBOUGOU Germain Gabriel	Chargé de Cours	En poste
10	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Assistant	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Assistant	En poste

9-DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (41)

1	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
2	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
3	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
4	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen/Ubda</i>
5	WOAFO Paul	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
8	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
9	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>Dir.Gén. B. MEKIM</i>
10	BEN- BOLIE Germain Hubert	Maître de Conférences	En poste
11	DJUIDJE KENMOE Gemaine épouse ALOYEM KAZE	Maître de Conférences	En poste
12	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Dépt UN</i>
13	EYEBE FOU DA Jean Sire	Maître de Conférences	En poste
14	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste

15	MBANE BIOUELE	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
16	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
17	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. MINRESI</i>
18	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
19	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
20	SAIDOU	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
21	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
22	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
23	BODO Bernard	Chargé de Cours	En poste
24	ENYEGUE A NYAM Françoise épouse BELINGA	Chargé de Cours	En poste
25	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
26	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINADER</i>
27	HONA Jacques	Chargé de Cours	En poste
28	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En Poste
29	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
30	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
31	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	<i>Dir.acad/Univ.Int.Etat Cam-Congo</i>
32	SIMO Elie	Chargé de Cours	En poste
33	TABI Conrad Bertrand	Chargé de Cours	En poste
34	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
35	VONDOU DERBETINI Appolinaire	Chargé de Cours	En Poste
36	WAKATA née BEYA Annie	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. MINESUP</i>
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
38	ABDOURAHIMI	Assistant	En Poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En Poste
40	MELI'I Jorelle Larissa	Assistant	En Poste
41	MVOGO Alain	Assistant	En Poste

10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (S.T.) (44)

1	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	Chef de Department
2	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
3	BITOM Dieudonné Lucien	Professeur	Doyen FASA/ U D
4	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
5	KAMGANG Pierre	Maître de Conférences	En poste
6	MEDJO EKO Robert	Maître de Conférences	Conseiller Technique/UYII
7	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINMIDT</i>
8	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
9	NGOS III Simon	Maître de Conférences	<i>D.A.A.C./UM</i>

10	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
11	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
12	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
13	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef de Divi/ MINTP</i>
14	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Chargé de Cours	Chef DAASR FS/UYI
15	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
16	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Dir.Projet Barage Memve'ele</i>
17	EKOMANE Emile	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
18	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
19	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
20	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Serv D'ETAT /MINMIDT</i>
21	GANNO Sylvestre	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
22	GHOGOMU Richard TANWI	Chargé de Cours	<i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i>
23	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
24	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
25	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i>
26	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
27	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
28	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
29	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	CEA MINRESI
30	NYECK Bruno	Chargé de Cours	En poste
31	ONANA Vincent	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAKOUNTE Jacqueline ép. NUMBEM	Chargé de cours	<i>CEA MINRESI</i>
33	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Chargé de Cours	En poste
34	ZO'O ZAME Philémon	Chargé de Cours	<i>DG ART</i>
35	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
36	ANABA ONANA Achille Basile	Assistant	<i>En Poste</i>
37	BINELI BETSI Thierry Olivier	Assistant	<i>En Poste</i>
38	METANG Victor	Assistant	<i>En poste</i>
39	NOMO NEGUE Emmanuel	Assistant	En poste
40	SABABA Elisé	Assistant	En Poste
41	TCHAPTCHET TCHATO De Pesquidoux I	Assistant	En poste
42	TEHNA Nathanaël	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des enseignants permanents par Département
(14 Septembre 2018)

Département	Nombre d'enseignants				
	Pr	MC	CC	ASS	Total
BC	5 (1)	11 (5)	20 (9)	03 (2)	39 (17)
BPA	10 (0)	9 (1)	14 (6)	11 (4)	44 (11)
BPV	03 (0)	13 (4)	12 (3)	05 (5)	33 (9)
C.I.	9 (1)	7 (0)	15 (3)	4 (1)	35 (5)
C.O.	9 (0)	10 (3)	12 (3)	2 (0)	33 (6)
IN	2 (0)	1 (0)	8 (0)	15 (2)	26 (2)
MA	3 (0)	4 (0)	18 (1)	5 (0)	30 (1)
MB	1 (0)	6 (1)	3 (1)	2 (0)	12 (2)
PH	8 (0)	10 (1)	18 (2)	5 (2)	41 (5)
ST	3(0)	10 (1)	22 (4)	7 (0)	44 (5)
Total	54 (2)	81 (16)	142 (32)	60 (16)	337 (63)

Soit un total de :

337 (63) dont

- Professeurs 54 (2)
- Maîtres de Conférences 81 (16)
- Chargés de Cours 142 (32)
- Assistants 60 (16)
- () = Nombre de femmes.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

DÉDICACE

A :

Ma grande sœur feu Madame DONGMO SOUGNING Elisa ;

REMERCIEMENTS

Notre profonde reconnaissance pour la réalisation de ce travail, s'adresse au:

Pr. MBACHAM FON Wilfred, chef de Département de Biochimie, Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I, pour avoir accepté de superviser les travaux de cette thèse ;

Pr. NNANGA NGA Emmanuel, Chef de Département de Pharmacie Galénique et Législation Pharmaceutique de l'Université de Yaoundé I, Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, qui a bien voulu me confier ce travail et qui n'a ménagé aucun effort pour me suivre, me conseiller et m'encourager tout au long de ce travail.

Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul, Chef de Département de Biochimie, Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I et l'ensemble du corps enseignant dudit Département pour la formation académique ;

Pr. KAZE FOLECFACK François, chef de service d'hémodialyse du CHUY et tout le personnel de ce service, pour leur disponibilité afin que l'échantillonnage soit une réussite ;

Dr. HALLE Marie Patrice, Chef de Service d'Hémodialyse (HD) de l'Hôpital Général de Douala (HGD) qui, malgré ses multiples occupations a bien voulu me guider dans la collecte des échantillons au service d'hémodialyse de l'Hôpital Général de Douala ;

Pr. GONSU KAMGA Hortense, Chef de laboratoire de bactériologie du CHUY, pour sa contribution scientifique dans l'analyse et l'interprétation des résultats microbiologiques ;

Pr. PIEME Constant Anatole, chef de laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I, qui par ses qualités et ses compétences a contribué à la réussite de ce travail. Les mots ne suffisent pas pour traduire ma reconnaissance ;

Dr. Alain RAGON, Chef de service du laboratoire de contrôle des eaux d'hémodialyse, Pôle Uro-Néphrologie Hôpital de la Conception de Marseille en France, qui par son expérience, ses compétences et sa collaboration, a contribué à l'analyse et l'interprétation des résultats microbiologiques.

Dr. ETAME SONE Lucien, Chargé de Recherche à l'IMPM et Chef de la Cellule de la Programmation et de la Planification au Ministère de la Recherche Scientifique et de

l'Innovation dont les remarques et les critiques apportées pendant ce travail ont contribué à le rendre meilleur ;

Dr. DIMODI Henriette épouse ONTCHA, Chargé de Recherche à l'IMPM dont les remarques et suggestions apportées pendant ce travail ont contribué à le rendre meilleur ;

Dr. MANGA Marie Julie, Présidente de la Société Camerounaise de Biologie Clinique (SCBC) pour son soutien moral et financier dans la réalisation de ce travail ;

Tous les membres du Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé 1 pour leurs assistances techniques;

Le personnel du Centre de Recherche en Alimentation et Nutrition (CRAN) de l'Institut de Recherche Médicale et d'Etudes de Plantes Médicinales (IMPM) pour leur aide matérielle ;

Ma mère **Madame DONGMO Charlotte** pour tout son amour et ses efforts consentis pour ma formation.

Mon oncle **Monsieur DONGMO Jean** et son épouse **Madame MA'AFOUO Joséphine Jodelle** pour tout le soutien familial, moral et financier.

Mes frères et sœurs : **Laura, Christelle, Franck et Génoni**. Mes cousins et cousines **Armand, Vedette, Franklin, Brunelle, Aurelle, Pierre, Brandonne, Stive** et **José** pour leurs soutien moral et familial.

Monsieur **NOUDEM Josué, SESSO Guillaume, KANA Grégoire**, ainsi que leurs épouses et leurs enfants pour tout le soutien familial et moral.

Mes collègues du Laboratoire d'Analyses Médicales LAMA : **Nzeko'oh Patrick, Tatiague Mirabelle, Ninla Avie, Konguep Germaine**, et **NEBA Irine** pour leurs encouragements.

Mes camarades de promotion pour le lien de fraternité qui a été conservé entre nous.

Mes ami(e)s : **GUEFACK Carine, TANGA Cédric, TIOFACK Yannick, KOUEKAM Arnaud, TCHIDJOU Steve, KENNE Lydiane, MAKAMTA Viviane** et **DJIMAFO Nathalie** pour leur encouragement.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, je vous adresse mes sincères remerciements.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	xiii
REMERCIEMENTS	xiv
TABLE DES MATIÈRES	xvi
LISTE DES ABREVIATIONS	xxii
LISTE DES TABLEAUX	xxiii
LISTE DES FIGURES	xxv
RÉSUMÉ	xxvi
ABSTRACT	xxviii
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE	6
I. REIN ET PATHOLOGIE RÉNALE	7
I.1 Anatomie macroscopique du rein	7
I.2. Fonctions du rein	8
I.3. Evaluation de la fonction rénale	9
I.3.1. Créatinine sérique.....	10
I.3.2. L'urée.....	10
I.4. Insuffisance rénale	11
I.4.1. Physiopathologie	11
I.4.2. Épidémiologie de l'insuffisance rénale chronique terminale	12
I.4.3. Prévalence de l'insuffisance rénale chronique au Cameroun	12
I.4.4. Causes de l'insuffisance rénale chronique	12
I.5. Surveillance biologique	14
I.5.1. Traitement de suppléance : La dialyse.....	14
I.5.1.1. Dialyse péritonéale	14
I.5.1.2. Hémodialyse	15
I.6. Efficacité et complications de l'hémodialyse.....	17
I.6.1. Insuffisance rénale chronique et risque cardiovasculaire.....	17
I.6.2. La dyslipidémie.....	18
II. STRESS OXYDATIF ET HÉMODIALYSE	18
II.1. Le stress oxydant : origines et conséquences	18
II.1.1. Origines des espèces réactives.....	18

II.1.2. Rôles des espèces réactives dans des situations physiologiques	20
II.1.3. Le déséquilibre : origines et conséquences	21
II.1.4. Les effets du stress oxydant sur les structures moléculaires	22
II.1.5. Les pathologies liées au stress oxydant	23
II.2. Les défenses antioxydantes.....	26
II.2.1. Les mécanismes de défense enzymatique	27
II.2.1.1. Les SOD.....	27
II.2.1.2. Les catalases	28
II.2.1.3. Les glutathion peroxydases (GSH-Px)	28
II.2.2. Les mécanismes de défense moléculaire	28
II.2.2.1. La vitamine E.....	29
II.2.2.2. La Vitamine C.....	29
II.2.2.3. Glutathion réduit	31
II.3. Les antioxydants, des agents préventifs dans les apports nutritionnels	32
II.3.1. Cancer.....	32
II.3.2. Maladies cardiovasculaires	33
II.3.3. Vieillesse cutané	33
II.4. Méthodes d'évaluation du stress oxydant et applications médicales	34
II.4.1. Evaluation directe des radicaux libres	34
II.4.2. Evaluation indirecte de l'action des ERO	34
II.4.2.1. Dérivés de la peroxydation des lipides	34
II.4.2.2. Dérivés de l'oxydation de l'ADN	35
II.4.3. Evaluation des systèmes de défense antioxydants	35
II.4.3.1. Dosage des enzymes antioxydantes.....	35
II.4.3.2. Dosage des molécules antioxydantes.....	35
II.4.3.3. Evaluation du statut antioxydant total	35
II.5. Stress oxydant chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique.	36
II.5.1. Rôle de l'urémie.....	36
II.5.2. Rôle de la Glycation.....	36
II.5.3. Rôle de la dialyse	37
II.5.4. Rôle de l'inflammation.....	37
II.5.5. Rôle de la contamination microbienne de l'eau d'hémodialyse.	39
II.5.5.1. Contamination par les bactéries	40
II.5.5.2. Les sources de contamination de l'eau d'hémodialyse.....	41

II.5.5.3. Exigence bactériologique du dialysat	41
II.5.5.4. Exigence bactériologique du dialysat ultra pur.....	42
II.5.5.5. Méthode de détection des contaminants microbiens des eaux pour hémodialyse	42
II.5.5.6. Effet d'une mauvaise qualité bactériologique d'eau pour hémodialyse	45
II.5.6. Déficit chronique en défense anti-oxydante :	45
II.5.7. Implication clinique du stress oxydant chez l'hémodialysé.....	45
II.5.7.1. Athérosclérose et complications	46
II.5.7.2. Malnutrition.....	46
II.5.7.3. Amylose à β 2-microglobuline	46
II.5.7.4. Anémie.....	47
CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES	48
I. TYPE D'ÉTUDE.....	49
II. LIEU DE L'ÉTUDE	49
III. DURÉE DE L'ÉTUDE	49
IV. POPULATION CIBLE.....	49
V. CRITÈRE DE SELECTION	49
V.1. Critère d'inclusion	49
V.2. Critère de non inclusion	49
VI. CONSIDÉRATION ÉTHIQUE.....	49
VII. ÉCHANTILLONNAGE	50
VIII. PROCÉDURE DE COLLECTE DES ÉCHANTILLONS	50
VIII.1. Recueil, transport et stockage des échantillons	50
IX. ANALYSES DES ÉCHANTILLONS	51
IX.1. Détermination des paramètres reflétant les capacités épuratives de la membrane d'hémodialyse	51
IX.1.1. Dosage de l'urée.....	51
IX.1.2. Dosage de la créatinine	52
IX.1.3. Débit de filtration glomérulaire.....	52
IX.2. Analyse du profil lipidique.....	53
IX.2.1. Détermination des teneurs sériques en cholestérol total	53
IX.2.2. Détermination des teneurs sériques en Triglycérides	54
IX.2.3. Détermination des teneurs sériques en HDL	55
IX.2.4. Détermination des teneurs sériques en LDL.....	55
IX.2.5. Détermination de l'indice d'arthérogénicité	56

IX.3. Recherche des marqueurs de l'inflammation et du statut oxydant avant et après une séance d'hémodialyse.	56
IX.3.1. Recherche des marqueurs de l'inflammation.....	56
IX.3.1.1. Dosage de l'Acide urique	56
IX.3.1.2. Dosage de l'albumine.....	57
IX.3.1.3. Détermination de la protéine réactive C (CRP).....	57
IX.3.2. Evaluation du niveau d'oxydation des lipides sériques : dosage du MDA	58
IX.3.3. Détermination de la défense antioxydant	59
IX.3.3.1. Détermination de la capacité antioxydant totale du sérum par la méthode de Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).....	59
IX.3.3.2. Dosage du superoxyde dismutase (SOD)	60
IX.3.3.3. Dosage du glutathion peroxydase	61
IX.3.3.4. Dosage du glutathion réduit	62
IX.3.3.5. Détermination de l'activité de la catalase sérique.....	63
IX.3.3.6. Estimation du taux plasmatique en vitamine C	64
IX.3.3.7. Estimation du taux plasmatique en vitamine E	64
IX.4. Analyse bactériologique de l'eau utilisée pour hémodialyse.....	65
IX.4.1. Filtration de l'échantillon sur membrane.....	65
IX.4.2. Repiquage des colonies et identification.	66
IX.4.2.1. Repiquage des colonies sur différents milieux	66
IX.4.2.2. Examen microscopique après coloration de Gram	66
IX.4.2.3. Identification de bactéries	66
IX.5. Analyses statistiques des résultats	67
CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION	68
I. RÉSULTATS	69
I.1. Caractères généraux de la population d'étude.....	69
I.2 Évaluation des paramètres reflétant les capacités épuratives de la membrane d'hémodialyse	70
I.2.1. Concentration sérique en urée des groupes expérimentaux	70
I.2.2. Concentration sérique en créatinine des groupes expérimentaux.	71
I.2.3. Vitesse de filtration glomérulaire des groupes expérimentaux.....	72
I.2.4. Distribution de la VFG par stade de l'atteinte rénale des groupes expérimentaux.....	73
I.3. Analyse du profil lipidique.....	73
I.3.1. Profil lipidique des groupes expérimentaux	73
I.3.2. Profil lipidique des groupes expérimentaux de sexe masculin	74

I.3.3. Profil lipidique des groupes expérimentaux de sexe féminin	74
I.4. Evaluation des marqueurs de l'inflammation et du statut oxydant des groupes expérimentaux.....	75
I.4.1. Evaluation des marqueurs de l'inflammation des groupes expérimentaux	75
I.4.1.1. Concentration sérique des marqueurs de l'inflammation des groupes expérimentaux.....	75
I.4.1.2. Concentration sérique des marqueurs de l'inflammation des groupes expérimentaux en fonction du genre	76
I.4.1.3. Répartition des patients en fonction de la valeur normale et anormale de la CRP avant et après hémodialyse et le groupe témoin.	77
I.4.1.4. Répartition des patients en fonction du taux normal et anormal d'albumine avant et après hémodialyse.	78
I.4.2. Niveau d'oxydation des lipides sériques des groupes expérimentaux.....	79
I.4.2.1. Concentration sérique en malondialdéhyde des groupes expérimentaux	79
I.4.2.2. Concentration sérique en malondialdéhyde des groupes expérimentaux en fonction du genre.	80
I.4.3. Détermination des marqueurs antioxydants.	80
I.4.3.1. Concentration sérique en antioxydant enzymatique des groupes expérimentaux.	80
I.4.3.2. Concentration sérique en antioxydant enzymatique des groupes expérimentaux en fonction du genre.....	81
I.4.3.3. Concentration sérique en antioxydant non enzymatique des groupes expérimentaux.....	82
I.4.3.4. Concentration sérique en antioxydant non enzymatique des groupes expérimentaux en fonction du genre	83
I.4.3.5. Classification des patients en fonction des concentrations plasmatiques en vitamine C avant et après hémodialyse.....	85
I.4.4. Corrélation entre le MDA et les différents paramètres avant et après la dialyse.	85
I.4.4.1 Dans la population générale	85
I.4.4.2. Chez les patients de sexe masculin.....	86
I.4.4. 3 Chez les patients de sexe féminin.....	87
I.4.5. Impact de quelques facteurs étudiés sur la variation des différents paramètres avant et après une séance de dialyse.....	88
I.5. Analyse bactériologique de l'eau pour hémodialyse.....	89
I.5.1. Dénombrement des colonies après culture	89
I.5.2. Conformité après culture.....	91
I.5.3. Identification des colonies après culture.	91
I.5.3.1. Résultat de l'examen microscopique après coloration de Gram	91

I.5.3.2. Microorganismes isolés dans l'eau pour hémodialyse dans les différents centres.....	92
I.5.4. Repartition des genres bactériens.....	93
II. DISCUSSION.....	95
CONCLUSION GÉNÉRALE, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES.....	96
RÉFÉRENCES.....	96
ANNEXES.....	XCVI
PUBLICATIONS.....	XCVI

LISTE DES ABBREVIATIONS

CHUY	: Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé
C-HDL	: Cholestérol de haute densité (<i>High Density Lipoprotein</i>)
C-LDL	: Cholestérol de faible densité (<i>low density cholestérol</i>)
CT	: Cholestérol total
CRP	: <i>Cell-Réactive Protein</i>
DO	: Densité Optique
EOA	: Espèces oxygénées actives
ERA	: European Renal Association
FMSB	: Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales
FRAP	: Ferric Reducing Antioxydant Power
FRO	: Forme Réactive de l'oxygène
GPX	: Glutathion peroxydase
GSH	: Glutathion réduit
HD	: Hémodialyse
HDG	: Hôpital Général de Douala
IRC	: Insuffisance Rénale Chronique
IRCT	: Insuffisance Rénale Chronique Terminale
IMC	: Indice de Masse Corporelle
MCV	: Maladies cardiovasculaires
MDA	: Malondialdehyde
MDRD	: <i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
NF	: Norme Française
O₂	: Oxygène
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
SO	: Stress Oxydant
TG	: Triglycérides
UFC	: Unité Formant Colonie
VLDL	: <i>Very Low Density Lipoprotein</i>
VFG	: Vitesse de Filtration Glomérulaire
TGEA	: Tryptone Glucose Extract Agar

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Différents stades d'atteintes rénales (National Kidney Foundation, 2002).	11
Tableau II: Causes potentielles d'inflammation ou d'augmentation des protéines de l'inflammation et des cytokines au cours de l'insuffisance rénale chronique.....	38
Tableau III: Exemple des microorganismes pouvant être retrouvés dans les eaux de dialyse	39
Tableau IV: Liste de bactéries pouvant être retrouvées dans les différentes qualités d'eau ..	40
Tableau V: Dilutions sériées double des échantillons pour quantification CRP.....	58
Tableau VI: Mode opératoire pour la détermination de la capacité anti-oxydante totale.....	60
Tableau VII: Mode opératoire pour détermination de la SOD	61
Tableau VIII: Protocole de dosage du glutathion peroxydase.....	62
Tableau IX : mode opératoire pour la détermination de l'activité de la Catalase.....	63
Tableau X: Protocole de dosage de la vitamine E.....	65
Tableau XI: Caractères généraux de la population d'étude	69
Tableau XII: Distribution de la VFG par stade d'atteinte rénale des groupes expérimentaux	73
Tableau XIII: Profil lipidique des groupes expérimentaux	74
Tableau XIV: Profil lipidique des patients hémodialysés (avant et après la dialyse) de sexe masculin et le groupe témoin.	74
Tableau XV: Profil lipidique des groupes expérimentaux de sexe féminin.....	75
Tableau XVI: Concentration sérique des marqueurs de l'inflammation des groupes expérimentaux.	75
Tableau XVII : Concentration sérique des marqueurs de l'inflammation des groupes expérimentaux en fonction du genre.	76
Tableau XVIII: Concentration d'antioxydant enzymatique des groupes expérimentaux	81
Tableau XIX: Concentration d'antioxydant enzymatique des groupes expérimentaux en fonction du genre.....	81
Tableau XX: Concentration d'antioxydant non enzymatique des groupes expérimentaux....	82
Tableau XXI: Taux d'antioxydant non enzymatique des groupes expérimentaux en fonction du genre.	83
Tableau XXII: Matrice de corrélation des différents paramètres avant et après la dialyse. ...	86
Tableau XXIII: Matrice de corrélation des différents paramètres avant et après la dialyse chez les patients de sexe masculin.	86

Tableau XXIV: Matrice de corrélation des différents paramètres avant et après la dialyse chez les patients de sexe féminin.	87
Tableau XXV : Impact de quelques facteurs étudiés sur la variation des différents paramètres avant et après une séance de dialyse.	88
Tableau XXVI: Dénombrement des colonies après filtration sur membrane pour le centre du CHUY.....	89
Tableau XXVII: Dénombrement des colonies après filtration sur membrane pour le centre de l'HGD.....	90
Tableau XXVIII: Type de bactérie en fonction de chaque point de prélèvement pour le centre du CHUY.....	91
Tableau XXIX: Type de bactérie en fonction de chaque point de prélèvement pour le centre de l'HGD.	92
Tableau XXX: Bactéries isolés dans l'eau pour hémodialyse entre Juillet et Octobre 2015 pour le centre d'hémodialyse du CHUY.	92
Tableau XXXI: Bactéries isolés dans l'eau pour hémodialyse entre Juillet et Octobre 2015 pour le centre d'hémodialyse de l'HGD.....	93

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Coupe longitudinale d'un rein, avec le sens de circulation des urines	7
Figure 2: Schéma de la structure du néphron.....	8
Figure 3: Principe de l'hémodialyse.....	16
Figure 4: Fistule artério-veineuse et sens de circulation du sang au cours de l'hémodialyse.	16
Figure 5: Principaux sites cellulaires de productions des ERO	19
Figure 6 : Différentes voies de la genèse des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote dans l'organisme.	20
Figure 7: Rôles physiologiques des espèces réactives	21
Figure 8: Déséquilibre entre pro-oxydants et antioxydants	22
Figure 9: Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule.....	26
Figure 10: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par le système de défense antioxydant.....	27
Figure 11 : Synergie d'action des antioxydants cellulaires.....	29
Figure 12: Colonies formées sur une gélose R2A après incubation de 7 jours à 20°C.....	43
Figure 13: Volume d'eau à analyser en fonction de la qualité de l'échantillon (eau hautement purifiée ou eau purifiée)	43
Figure 14: Essais de cultures d'un même échantillon d'eau sur 4 géloses différentes pendant 7 jours entre 17 et 23°C.....	44
Figure 15: Mécanisme de l'auto-oxydation du Pyrogallol.....	60
Figure 16: Taux d'urée sérique des groupes expérimentaux.....	70
Figure 17: Taux sérique en créatinine des groupes expérimentaux	71
Figure 18: Vitesse de filtration glomérulaire des groupes expérimentaux.	72
Figure 19: Répartition des patients en fonction de la valeur normale et anormale de la CRP avant et après la dialyse et le groupe témoin.....	77
Figure 20: Répartition des patients en fonction du taux normal et anormal d'albumine avant et après la dialyse.	78
Figure 21: Taux de malondialdéhyde des groupes expérimentaux	79
Figure 22: Taux de MDA sérique des groupes expérimentaux en fonction du genre.....	80
Figure 23 : Classification des patients en fonction des concentrations plasmatiques en vitamine C avant et après hémodialyse.	85
Figure 24: Pourcentage de conformité après culture.....	91
Figure 25: Bactéries isolées en fonction du genre.....	93

RÉSUMÉ

L'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) constitue un problème majeur de santé publique dans le monde de par sa prévalence, sa mortalité élevée et les coûts de sa prise en charge. Les événements cardiovasculaires en demeurent la première cause de décès chez les patients hémodialysés et approximativement 50% des patients au stade d'insuffisance rénale chronique terminale meurent d'événements cardiovasculaires. Le stress oxydant, étroitement associé à l'inflammation et à la malnutrition est actuellement identifié en hémodialyse comme un facteur majeur pouvant contribuer aux complications à long terme des pathologies rénales chroniques. L'accumulation des toxines urémiques, la membrane de dialyse et la contamination possible de l'eau pour hémodialyse sont les principaux facteurs impliqués dans la genèse du stress oxydant au cours de l'hémodialyse. Cette étude avait pour objectif d'évaluer les marqueurs du stress oxydant chez les patients camerounais en hémodialyse chronique et d'étudier la qualité bactériologique de l'eau pour hémodialyse. Après l'obtention des autorisations administratives, de la clairance éthique (référence 2015/12/709/CE/CNERSH /SP) et consentement éclairé des patients, les échantillons de sang prélevés dans des tubes secs et héparinés avant et après hémodialyse chez 80 patients en hémodialyse au Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé et à l'Hôpital Général de Douala ont servi au dosage des différents paramètres biochimiques par spectrophotométrie. Un groupe témoin était constitué de 80 volontaires sains. La détermination des paramètres reflétant les capacités épuratives de la membrane d'hémodialyse s'est fait à partir du dosage de l'urée et de la créatinine. Le profil lipidique des patients avant et après une séance d'hémodialyse fait à partir du dosage du cholestérol total, du cholestérol HDL et des triglycérides. Le cholestérol LDL était calculé à partir de la formule de Friedewald. La recherche des marqueurs de l'inflammation était faite à partir du dosage de l'albumine, de l'acide urique et la *Cell Reactive Protein* (CRP). Le statut oxydant des patients recherché à travers le dosage du Malondialdehyde, des capacités antioxydante totale du sérum, du glutathion peroxydase, la catalase, la superoxyde dismutase, la vitamine C, vitamine E et glutathion réduit. Les échantillons d'eau prélevés chaque mois sur différents sites du circuit de traitement de l'eau pour hémodialyse pendant 8 mois ont été utilisés pour des analyses bactériologiques. Les bactéries ont été isolées après filtration de 100 ml du prélèvement de chaque point à travers une membrane de nitrocellulose de microporosité 0,45 μm et dépôts de la membrane à la surface de la gélose *Tryptone Glucose Extract Agar* (TGEA) puis, incubée à température ambiante pendant 7 jours. Après repiquage sur différents milieux, les isolats bactériens purs

ont été identifiés par leurs caractères culturels et tests biochimiques commercialisés notamment la galerie API 20E et la galerie API 20NE. Les données ont été analysées par le logiciel Statistica.10 de Statsoft et les résultats exprimés en moyenne \pm écart-type. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$. Les résultats ont montré que l'hémodialyse sur membrane en polysulfone diminue significativement le taux d'urée (92 %) et de créatinine plasmatique (84 %), ce qui permet d'améliorer l'état clinique du patient. La diminution du cholestérol total (42,5 %) et du Cholestérol-HDL (33 %) sont fréquentes chez les patients sous hémodialyse. Ceci entraîne l'augmentation de l'indice d'athérosclérose de 29 % avec pour conséquence un risque accru de développement de maladies cardiovasculaires après une séance de dialyse. L'hémodialyse affecte significativement les paramètres du stress oxydatif par l'augmentation du taux de Malondialdéhyde (58%) et la diminution des agents antioxydants, principalement la capacité antioxydant totale du sérum (20 %) et le taux de vitamine C (49 %). L'eau utilisée pour hémodialyse dans les deux centres d'hémodialyse est majoritairement contaminée par les bactéries à Gram négatif en l'occurrence des genres *Pseudomonas sp* qui contribuent sans doute à l'augmentation des réactions inflammatoires et du stress oxydatif. Nous pouvons conclure que la production accrue des radicaux libres, la baisse de certains antioxydants et la contamination bactériologique de l'eau pour hémodialyse seraient une cause de morbidité et mortalité rencontrée généralement chez les patients en hémodialyse chronique au Cameroun.

Mots-clés : Insuffisance rénale chronique, Hémodialyse, Eau pour hémodialyse, Stress oxydant.

ABSTRACT

The end-stage renal disease (ESRD) is a major public health issue worldwide due to its prevalence, high mortality and high costs incurred during care. Cardiovascular events remain the leading cause of death in hemodialyzed patients and approximately 50% of patients with end-stage renal disease die from cardiovascular diseases. Oxidative stress, closely associated with inflammation and malnutrition, is currently identified in haemodialysis as a major factor which can contribute to the long-term complications of chronic renal pathologies. The accumulation of uremic toxins, dialysis membrane and the possible contamination of water used for haemodialysis are the principal factors involved in the genesis of the oxidative stress during chronic renal failure. This study has the objective to assess the markers of the oxidative stress among Cameroonian patients with chronic haemodialysis and study the bacteriological quality of water used for haemodialysis. After obtaining administrative authorisations, ethical clearance (reference 2015/12/709/CE/CNERSH/SP) and informed consent of patients, blood samples were collected in dry and heparinized tubes before and after haemodialysis in 80 patients, at the Nephrology Unit of the University teaching Hospital of Yaoundé and the same Unit of the Douala General Hospital, were used for assay of the various biochemical parameters by spectrophotometry. A control group consisted of 80 healthy volunteers. The determination of the parameters reflecting the purifying capability of the haemodialysis membrane was based on the determination of urea and creatinine. The lipid profile of patients before and after a haemodialysis session is based on the determination of total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides. LDL cholesterol was calculated from the Friedewald formula. The search for markers of inflammation was made from the albumin, uric acid and cell Reactive Protein (CRP) assays. The oxidative status of the patients sought through the malondialdehyde assay, total antioxidant capacities of serum, glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase, vitamin C, vitamin E and reduced glutathione. The water samples collected each month on various sites of the water processing circuit used for haemodialysis were used for bacteriological analyses for a period of 8 months. The bacteria were isolated after filtration of 100 ml of water at each site through nitrocellulose membrane with 0,45 µm microporosity deposited on the surface of the Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA) and then incubated at room temperature for 7 days. After transplanting to different environments, pure bacterial isolates were identified by their cultural characters and marketed biochemical galleries (API 20E and API 20NE). The data were analyzed by the

Statsoft's Statistica.10 software and the results were expressed as the mean \pm standard deviation. The significant threshold was fixed at a P values $< 0, 05$. The results showed that haemodialysis on polysulfone membrane significantly decreases the rate of urea (92%) and plasmatic creatinine (84 %), which makes it possible to improve the clinical state of the patient. The total cholesterol (42, 5 %) and Cholesterol-HDL (33 %) reduction are frequent among patients under haemodialysis. This leads to an increase in the index of atherosclerosis of 29 % which in turn increases the risk of developing cardiovascular diseases after a session of dialysis. Haemodialysis significantly affects the parameters of the oxidative stress by the increase in the rate of Malondialdehyde (58%) and the reduction in the anti-oxidizing agents, mainly the total anti-oxidizing capacity of the serum (20%) and the rate of vitamin C (49 %). The water used for haemodialysis in the two centres of haemodialysis is mainly contaminated by Gram negative bacteria, more precisely the *Pseudomonas sp* genus, which undoubtedly contributes to the increase in the inflammatory reactions and the oxidative stress. We can conclude that the increased production of the free radicals, the fall of certain anti-oxidizing agents and the bacteriological contamination of water for haemodialysis, would be the cause of morbidity and mortality generally found among patients suffering from chronic haemodialysis in Cameroon.

Keywords: Chronic renal failure, Haemodialysis, Water for haemodialysis, Oxidative stress

INTRODUCTION GENERALE

Les reins sont des organes nécessaires pour maintenir l'homéostasie cellulaire et jouent un rôle essentiel dans l'épuration des déchets de l'organisme. En effet, ils assurent de nombreuses fonctions notamment, le maintien de l'équilibre hydro-électrique et acido-basique, l'élimination de l'organisme des déchets endogènes et exogènes, la production d'hormones (rénine, érythropoïétine, calcitriol), la participation à la néoglucogenèse et la régulation de la pression artérielle. Ses fonctions peuvent être altérées par des maladies (le diabète ou l'hypertension artérielle) ou la prise des substances néphrotoxiques (médicaments) à l'origine d'une insuffisance rénale. Cette altération peut évoluer progressivement et de façon irréversible vers le stade terminal. A ce stade, les reins sont incapables d'assurer leurs fonctions et la survie n'est possible que par le traitement de suppléance extra-rénale par hémodialyse ou dialyse péritonéale ou transplantation rénale (**Maurizi-balzan et Zaoui., 2005**).

Au Cameroun, l'hémodialyse est l'unique mode d'épuration chez les patients en insuffisance rénale chronique terminale (**Fouda et al., 2017**). Elle représente un ensemble d'échanges au travers d'une membrane semi-perméable, et qui a pour objectif de rétablir l'équilibre du milieu intérieur grâce à un traitement discontinu. Il est recommandé d'effectuer au moins trois séances d'hémodialyse de quatre heures par semaines (**Fouda et al., 2017**).

Bien que l'insuffisance rénale au stade terminal ait connu un grand essor thérapeutique, la morbi-mortalité chez les patients sous dialyse reste toujours élevée (**Fernandez et al., 2002, Go et al., 2004**). En effet, Van-Dijk *et al* 2001 à travers l'étude ERA-EDTA effectuée dans six pays de l'Europe de l'ouest montrent que le taux de survie des patients sous hémodialyse en deux ans était de 67 %. Aux Etats-Unis, ces chiffres étaient de 82% par an (**Collins et al., 2015**). Dans les pays en voie de développement, notamment en Afrique sub-Saharienne, les survies en hémodialyse semblent assez similaires avec des survies moyennes généralement inférieures à 1 an et la plupart des patients décédant au cours des 3 premiers mois. Au Cameroun, la première étude évaluant la morbidité et la mortalité des hémodialysés et publiée en 2017 par **Fouda et al**, montre que sur 197 patients camerounais suivis, le taux de mortalité était de 57,58 % dont 50 % pendant les trois premiers mois de traitement. La survie globale à 15 mois était de 30,77 %, avec une durée moyenne de vie de 8 mois. Les événements cardio-vasculaires en demeurent la première cause de décès. Approximativement 50% des patients au stade d'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) meurent d'événement cardio-vasculaire, ce qui signifie que la mortalité qui en résulte est 10 à 30 fois supérieure chez les hémodialysés chroniques, que dans la population générale (**Cissé et al., 2016**).

De nombreux facteurs de risque cardiovasculaire se développent avec la progression de l'insuffisance rénale. Les uns sont communs à la population générale, tels que l'hypertension artérielle, le sexe, le tabagisme, la sédentarité, le diabète, et les autres sont propres à l'urémie chronique, tels que l'hypertrophie ventriculaire gauche, l'hyperfibrinémie, et plus particulièrement la dyslipidémie. Cependant, de nouveaux facteurs de risque « non traditionnels » ont été identifiés au cours des dernières années et contribuent également à la prévalence accrue des maladies cardiovasculaire dans cette population. Les facteurs les plus étudiés et les plus influents en termes de risque cardiovasculaire sont l'inflammation et le stress oxydatif (**Kaysen., 2000**). La dyslipidémie reconnue comme principal facteur de risque cardiovasculaire chez les patients atteints d'IRC, est caractérisée par une hypertriglycéridémie, une diminution du cholestérol-HDL et une augmentation du cholestérol-LDL (**Uhlig et al., 2003**). Ces perturbations sont présentes dès le stade précoce de l'insuffisance rénale, puis se développent avec la progression de la maladie, et ne sont généralement pas corrigées par la dialyse (**Uhlig et al., 2003**). D'autre part, parmi les facteurs de risque cardiovasculaires spécifiques à l'urémie chronique et responsable de l'athérome accéléré, le stress oxydant constitue un facteur majeur d'autant plus qu'il est étroitement associé à l'inflammation et à la malnutrition chez les patients dialysés (**Morena et al., 2002, Charriere et al., 2009**).

Un ensemble de travaux récents concourent à suggérer que les patients atteints d'IRC et traités par dialyse subissent des modifications délétères de la structure des protéines et des lipides secondaires à la perte des défenses antioxydantes, à l'augmentation du stress oxydant ou à d'autres modifications post-synthétiques de la structure des protéines médiées par la glycation ou la carbamylation (**Neuzil., 2002 ;Himmelfard, 2005 ; Shidfar et al., 2008 ; Goi et al., 2009 ; Libetta et al., 2011**). Donc un déséquilibre en faveur des composés pro-oxydants conduisant à un état de stress oxydatif pouvant induire des dommages cellulaires importants.

Le stress oxydant est particulièrement délétère chez le patient hémodialysé car il se produit de façon importante et répétée à chaque séance de dialyse du fait du contact du sang avec les membranes de dialyse, à cause d'un déficit chronique en système de défense antioxydant (**Wanner et al., 2002 ; Kao et al., 2010 ; Nnanga et al., 2014**). De plus, les impuretés présentes dans l'eau de dialyse sont de plus en plus considérées comme des facteurs de risque susceptibles de provoquer un stress oxydant. Sans une désinfection préventive efficace du circuit de distribution de l'eau pour hémodialyse, les contaminations biologiques

laissent des dérivés bactériens qui traversent les membranes des dialyseurs et passent dans le sang du patient, ce qui provoque l'activation des cellules phagocytaires et la génération consécutive d'oxydants (**Brunet *et al.*, 2000 ; Santos *et al.*, 2000 ; Laguerre *et al.*, 2007**).

L'accumulation des toxines urémiques, la membrane de dialyse et la contamination possible de l'eau pour hémodialyse, sont les principaux facteurs impliqués dans la genèse du stress oxydatif au cours de l'IRCT (**Rysckelynck *et al.*, 2003 ; Honda H *et al.*, 2009**) et nécessitent un suivi adéquat. En Afrique et particulièrement au Cameroun, peu d'études ont jusqu'ici été menées sur le stress oxydant, le statut antioxydant, des patients en hémodialyse et la qualité bactériologique de l'eau pour hémodialyse. L'augmentation du stress oxydant demeure un problème de santé publique aujourd'hui et susceptible d'accroître la morbidité et la mortalité chez les patients en hémodialyse chronique au Cameroun. Sur la base des considérations ci-dessus, la nécessité de mener une étude sur l'analyse des marqueurs du stress oxydant, de la dyslipidémie chez les patients en hémodialyse chronique au Cameroun et l'étude de la qualité bactériologique de l'eau pour hémodialyse, requiert donc une importance considérable en ce sens qu'elle permettrait un meilleur suivi biologique des patients avec une augmentation de leur espérance de vie. Dans le but de contribuer à l'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients en hémodialyse chronique au Cameroun, nous nous sommes proposés dans le cadre de notre étude, d'évaluer les marqueurs du stress oxydant chez les patients camerounais en hémodialyse chronique et d'étudier la qualité bactériologique de l'eau pour hémodialyse.

HYPOTHÈSE

Le stress oxydant, la dyslipidémie et la contamination bactériologique de l'eau pour hémodialyse, sont une cause de morbi-mortalité rencontrée généralement chez les patients en hémodialyse chronique au Cameroun.

OBJECTIF GÉNÉRAL

Evaluer les marqueurs du stress oxydant et de la dyslipidémie chez les patients en hémodialyse chronique au Cameroun et étudier la qualité bactériologique de l'eau pour hémodialyse dans deux centres de référence d'hémodialyse.

OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

- Déterminer les paramètres reflétant les capacités épuratives de la membrane d'hémodialyse ;

- Réaliser le profil lipidique des patients avant et après une séance d'hémodialyse;
- Rechercher les marqueurs de l'inflammation et du statut oxydant avant et après une séance d'hémodialyse ;
- Effectuer une analyse bactériologique de l'eau utilisée en hémodialyse.

CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE

I. REIN ET PATHOLOGIE RÉNALE

I.1 Anatomie macroscopique du rein

L'appareil urinaire est constitué de deux reins, deux uretères, de la vessie et de l'urètre. Les reins ont la forme de haricot et permettent l'élaboration et l'excrétion de l'urine. Ils pèsent 150 g chacun et mesurent en moyenne 12 cm de long, 6 cm de large, 3 cm d'épaisseur chez un adulte. Ce sont des organes pairs de couleur brune rougeâtre entourés de tissus cellulo-grasieux et situés dans un sac fibreux avec la glande surrénale. Ils sont situés en dessous du diaphragme, dans la partie supérieure de l'espace rétro-péritonéale d'une part et d'autre part de la colonne vertébrale (**Abderrahim et al., 2010**). La figure ci-après nous montre la coupe longitudinale d'un rein, avec le sens de circulation des urines.

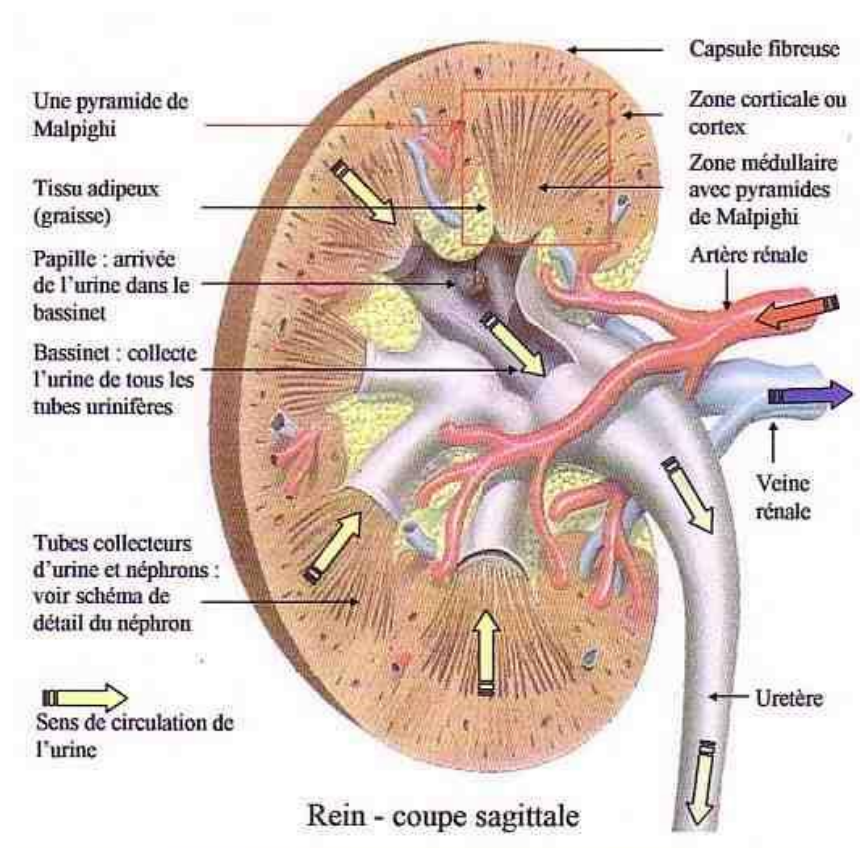


Figure 1: Coupe longitudinale d'un rein, avec le sens de circulation des urines (**Marieb et Hohn 2010**)

Chaque rein contient environ 1 000 000 néphrons. Le glomérule est une sphère de 200 μm de diamètre. Il comprend une enveloppe, la capsule de Bowman, un peloton d'anses capillaires, les tubules, les tubes collecteurs, les vaisseaux, le floculus en continuité avec les artérioles afférentes et efférentes (**Kourilsky, 2000**). La paroi capillaire de floculus comprend

trois couches : l'épithélium, la membrane basale et l'endothélium. Il contient à lui seul 1 000 000 de néphrons qui sont de minuscules unités de filtration.

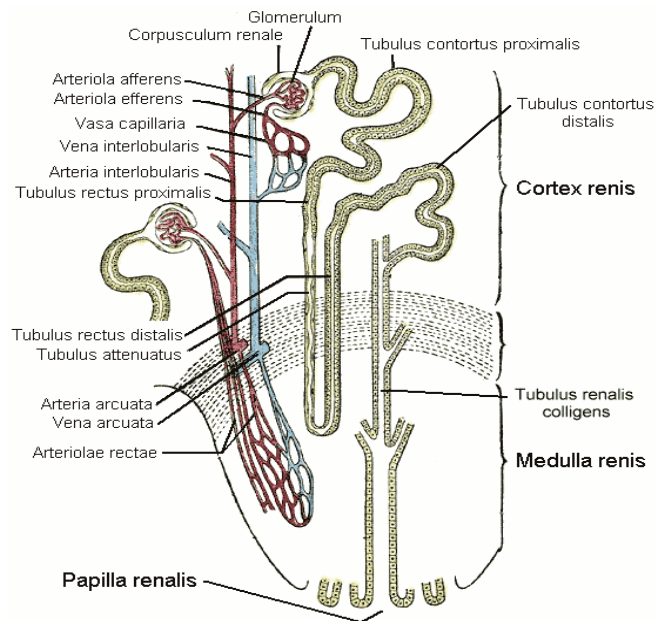


Figure 2: Schéma de la structure du néphron (Marieb et Hohn, 2010)

I.2. Fonctions du rein

Bien qu'indispensables à la vie, les reins brillent souvent par leur discrétion, pourtant ces organes sont multifonctionnels :

- Ils maintiennent l'homéostasie, c'est-à-dire l'équilibre hydro électrolytique et acido- basique de l'organisme, contrôle la concentration des électrolytes : Na^+ , Ca^{++} , K^+ , Cl^- , assurent la réabsorption des petites molécules telles que acides aminés, glucose, peptides ;
- Ils assurent la détoxification et l'élimination des déchets exogènes : médicaments et produits de leur métabolisme ;
- Ils sécrètent certaines hormones dans sa fonction endocrine, telles que la rénine qui participe à la régulation du volume extracellulaire ainsi que la pression artérielle; l'érythropoïétine qui est une glycoprotéine produite dans le stroma rénal qui stimule la maturation des hématies dans la moelle osseuse ; la prostaglandine, la kallikréine dont le rôle est hémostatique (Marieb et Hohn, 2010).

I.3. Evaluation de la fonction rénale

L'évaluation de la fonction rénale repose sur la mesure du débit de filtration glomérulaire (DFG) qui fait elle-même appel au concept de clairance rénale. Le concept de clairance rénale repose sur la loi de conservation de la masse ; la clairance d'une substance librement filtrée et complètement éliminée par le rein, est égale au débit de filtration glomérulaire (**Levey et al., 1999**). La clairance et le débit de filtration glomérulaire, sont donc exprimés en ml/mn. Elle peut se définir comme le volume de plasma virtuellement épuré de cette substance par unité de temps.

La filtration glomérulaire peut être mesurée par la clairance d'un marqueur (endogène ou exogène) à condition que celui-ci remplisse les conditions suivantes : marqueur inerte, filtré par le glomérule sans subir de retouche tubulaire et ayant une concentration plasmatique stable. Les trois marqueurs couramment utilisés en théorie sont : l'inuline, la créatinine et l'urée sanguine. En clinique, l'inuline est le marqueur de référence, mais la mesure de la clairance n'est pas facilement réalisable, l'urée plasmatique ou sanguine constitue un marqueur à la fois trop peu sensible et trop peu spécifique pour dépister une insuffisance rénale ou suivre l'évolution de celle-ci (**Lewis et al., 2001**).

La créatinine est un déchet métabolique azoté, un produit terminal du catabolisme de la créatine musculaire. Pour un individu donné, la production de créatinine est stable et dépend essentiellement de sa masse musculaire. La production et la concentration plasmatique de la créatinine sont donc relativement constantes au cours du nyctémère (la fluctuation de concentration plasmatique est inférieure à 10% sur 24 heures).

En raison de la relative constance de la quantité de créatinine urinaire excrétée ($U \times V$), dans la formule $DFG \times P = \text{la créatinine urinaire } U \times \text{le volume urinaire } V (U \times V)$, la créatinine plasmatique (P) et la filtration glomérulaire sont inversement reliées selon une courbe hyperbolique inverse et la simple mesure de la créatinine plasmatique est utilisée comme un reflet de la filtration glomérulaire.

Pour un individu, on ne peut pas estimer valablement le DFG par la créatininémie, car la production de créatine dépend du régime alimentaire, mais surtout de la masse musculaire du sujet et donc de sa taille, de son poids, de son sexe et de son âge (**Bostom et al., 2002**). Pour mieux rendre compte de la relation créatinine plasmatique-vitesse de filtration glomérulaire, et aussi tenir compte de la masse musculaire et éviter les erreurs liées à un recueil urinaire, il a été proposé d'estimer la clairance pour l'adulte par la formule de Cockcroft et Gault (1976).

Jusqu'à très récemment, la formule de Cockcroft et Gault (1976) rendait mieux compte de la clairance de la créatinine ; mais elle présente l'inconvénient de ne pas prendre en compte

la race (les valeurs varient lorsqu'on passe d'un groupe ethnique à un autre au sein d'une même population donnée). Aussi la *National Kidney Foundation* (NKF) recommande l'utilisation de l'équation de MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) qui prend en compte le sexe, l'âge, la race et le taux sérique de créatinine pour évaluer le débit de la filtration glomérulaire dans l'appréciation de l'insuffisance rénale (**Vervoort et Welles 2002**).

$$\text{DFG} = 186,3 \times (\text{créatinémie en mg/dl})^{-1.154} \times (\text{âge})^{-0.203} \times K$$

K= 0,742 chez la femme, K= 1 chez l'homme, K= 1,21 chez les sujets d'origine Africaine

I.3.1. Créatinine sérique

Le dosage de la créatinine sérique ou plasmatique constitue le mode d'évaluation le plus répandue de la fonction rénale dans la mesure où la créatinine est corrélée au débit de filtration glomérulaire. Cependant, la valeur de la créatinémie ne reflète pas seulement l'excrétion tubulaire, mais aussi de l'absorption digestive et du métabolisme de la créatinine. La créatinine est libérée dans le sang par le muscle et éliminée par les reins. Son taux plasmatique dépend d'une part de la masse musculaire et d'autre part de la capacité d'élimination du rein, donc la surface de filtration doit être diminuée d'au moins 50 % pour qu'il y ait augmentation. Chez le sujet ayant une masse stable, la créatinine reflète la variation de la filtration glomérulaire. Le taux de créatinine n'est presque pas influencée par les facteurs extra-rénaux comme la teneur du régime en protéines. La clairance de la créatinine est cependant un meilleur indice de la fonction rénale. La créatinine est augmentée au cours d'une insuffisance rénale aiguë ou chronique. Les valeurs usuelles sont de 5,3- 13,5 mg/l (0,65 – 120 μmol) chez les hommes, et de 5,6 – 11,3 mg/l (50 - 100 $\mu\text{mol/l}$) chez les femmes (**LacourK, 1992**).

I.3.2. L'urée

L'urée est le produit final du métabolisme des protéines et constitue la fraction la plus importante de l'azote non protéique dans les liquides de l'organisme. L'ammoniaque provenant du catabolisme des protéines est utilisé pour la synthèse des acides aminés et l'excès est transformé en urée dans le foie. Dans le rein, l'urée est filtrée par les glomérules et sa concentration dans le filtrat est la même que dans le plasma. La réabsorption tubulaire est inversement proportionnelle au débit urinaire. Avec un débit normal de 2 ml/mn, 30 à 40% d'urée sanguine reflète l'équilibre entre le métabolisme protéique et la fonction rénale. Une élévation modérée peut être due à une restriction hydrique ou à une déshydratation induite par

les diurétiques ou par un régime alimentaire riche en protéine. Son augmentation sévère peut être due à une insuffisance rénale, certains médicaments, la goutte, l'hyperthyroïdie et l'âge (plus de 60 ans). Les **valeurs usuelles** sont de 0,10 – 0,50g/l (1,6-8,2mmol/L). (**Fattorusso et Ritter, 1995**)

I.4. Insuffisance rénale

L'insuffisance rénale est caractérisée par une diminution de filtration glomérulaire en rapport avec une réduction permanente du nombre de néphrons fonctionnels. L'évolution clinique est habituellement progressive avec une perte régulière et inexorable du nombre de néphrons fonctionnels, aboutissant à l'insuffisance rénale dite « terminale ». Le délai entre le début de la maladie et l'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) varie considérablement non seulement entre les différentes formes d'atteintes rénales, mais aussi chez des patients ayant un même type de maladie rénale (**Simon, 2007**).

L'IRC est définie par une persistance pendant plus de 3 mois d'une atteinte rénale ou d'une baisse du débit de filtration glomérulaire (DFG) < 60 ml/min pour 1,73 m² de surface corporelle, indépendamment du type de néphropathie causale. (**ANAES, 2002**).

I.4.1. Physiopathologie

L'IRC est due à une réduction du nombre de néphrons fonctionnels dont le mécanisme est double :

- Destruction initiale liée à la maladie causale;
- Hyperfonctionnement des néphrons restants aboutissant à la glomérulosclérose.

L'évolution de cette réduction néphrotique peut, en fonction des conséquences pratiques qu'elle entraîne présenter 5 stades (tableau I).

Tableau I: Différents stades d'atteintes rénales (**National Kidney Foundation, 2002**).

Stade	Définitions	DFG mL/min/1,73 m ²
1	Maladie rénale chronique avec DFG normal ou augmenté	≥ 90
2	Maladie rénale chronique avec DFG légèrement diminué	60-89
3	Insuffisance rénale chronique modérée	30-59
4	Insuffisance rénale chronique sévère	15-29
5	Insuffisance rénale chronique terminale	< 15

I.4.2. Épidémiologie de l'insuffisance rénale chronique terminale

L'épidémiologie de l'insuffisance rénale chronique terminale au sens strict telle qu'elle est définie par le stade 4 et 5 de la classification de l'Agence National d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) est inconnue (**Simon, 2007**). L'incidence augmente de façon considérable avec l'âge, les hommes ayant un excès de risque de 67 % par rapport aux femmes. La cause de l'insuffisance rénale est une néphropathie hypertensive ou secondaire à un diabète dans au moins un cas sur deux. Les néphropathies glomérulaires, qui étaient la principale cause d'insuffisance rénale dans les années 90, ne concernent plus que 12% des patients aujourd'hui (**Couchoud et al., 2008**). A l'initiation du traitement de suppléance, deux malades sur trois dans l'ensemble ont au moins une comorbidité, et quatre sur cinq chez les plus de 75 ans. En plus de l'hypertension artérielle, déclarée chez la majorité des patients, les pathologies les plus fréquemment associées sont le diabète (36 %), principalement de type 2, l'insuffisance cardiaque (29 %), les pathologies coronariennes (27%) et vasculaires périphériques (23%).

I.4.3. Prévalence de l'insuffisance rénale chronique au Cameroun

L'insuffisance rénale chronique constitue un problème majeur de santé publique dans le monde de par sa prévalence, sa mortalité élevée et les coûts de sa prise en charge. Son ampleur réelle en Afrique demeure inconnue. Malgré, les progrès réalisés dans l'identification et la prévention de la MRC et le traitement de la phase terminale de la maladie, ces domaines restent un grand défi en Afrique Sub-saharienne à cause du manque cruel des ressources nécessaires (**Kiswaya., 2009**). D'après le docteur Fouda, la prévalence de l'insuffisance rénale au Cameroun est assez difficile à évaluer car il y a beaucoup de malades qu'on ne voit pas (**Fouda et al., 2017**). Ceux qui sont connus, c'est l'insuffisance rénale chronique et c'est la partie visible de l'iceberg. Au Cameroun il n'y aurait vraiment pas de chiffre validé. Ceux dont on serait sûr c'est qu'on a au moins 500 malades hémodialysés au Cameroun. Dans le centre de l'hôpital général de Douala, on dénombrait 180 patients. En comptant les différents centres d'hémodialyse qu'il y a au Cameroun (Yaoundé, Buea, Bamenda, Bertoua, Ebolowa, Garoua 10 centres en tout) on se retrouve largement au dessus de 500 malades (**Tonga., 2015**).

I.4.4. Causes de l'insuffisance rénale chronique

Les causes de l'insuffisance rénale chronique sont nombreuses, nous pouvons citer entre autres :

- **Les glomerulonéphrites :**

Le diagnostic est fait par biopsie du rein (**Jungers et al., 2011**).

- **Le diabète**

C'est la cause la plus fréquente d'insuffisance rénale chronique dans une proportion de 25 à 35 % (**Couchoud et al., 2008**). Il s'agit du diabète juvénile (type I) ou du diabète touchant les plus de 40 ans (type II).

- **L'hypertension artérielle**

L'hypertension artérielle mal traitée lèse les artères de l'organisme et les petits vaisseaux du rein entraînant une sclérose rénale (**Jungers et al., 2011**).

- **Les maladies héréditaires**

A l'instar de la maladie polykystique rénale autosomique dominante dont le gène le plus souvent en cause est le *Polycystic Kidney Disease Gene* (PKDG). Les signes sont surtout rénaux ; deux gros reins, envahis de kystes, douleurs lombaires, infection urinaire, hématuries, présence éventuelle des calculs rénaux. Il existe des signes extra rénaux possibles; kyste hépatique pancréatique, ovariens. Chez 5 à 10 % des patients, l'insuffisance rénale terminale apparaît le plus souvent après 50 ans (**INSERM, 1998**).

- **Les médicaments**

La prise d'antibiotiques, d'anti-inflammatoires, d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion peut aggraver l'état d'un rein déjà défaillant en raison d'une pathologie sous-jacente: diabète, hypertension artérielle, déshydratation. Le rein est l'organe principal d'élimination de beaucoup de médicaments. Par conséquent lorsque le rein est lésé, certains médicaments peuvent devenir toxiques pour l'organisme surtout en cas d'insuffisance sévère ou chez les malades dits à risque : personnes âgées, diabétiques, souffrants de déshydratation. Différents mécanismes expliquent ces risques médicamenteux. La diminution du flux sanguin rénal, les anti-inflammatoires non stéroïdiens prescrits pour traiter les affections rhumatismales et les douleurs chroniques sont dangereux. Les médicaments peuvent causer les allergies de façon imprévisible, entraînant la toxicité directe sur le rein. Entre autres nous pouvons noter des antalgiques contenant de la phénacétine, le traitement immunosuppresseur, la chimiothérapie pour cancer, certains antibiotiques, certains céphalosporine, les médicaments utilisés dans le diabète non insulino-dépendant (sulfamides, hypoglycémifiants). (**Jungers et al., 2011**).

- Infection chronique des voies urinaires

La mauvaise implantation des uretères dans la vessie est une cause fréquente d'infection chronique des voies urinaires. Elle entraîne une remontée de l'urine de la vessie vers les reins. C'est le reflux vésico-rénal. Il doit être diagnostiqué dès l'enfance si on veut éviter l'évolution vers une pyélonéphrite chronique.

I.5. Surveillance biologique

Pour évaluer la gravité et le stade de l'insuffisance rénale en clinique, les médecins ont pour point d'appui les examens biologiques tels que: la numération de la formule sanguine, le dosage du fer, de la créatinine, de l'acide urique, des électrolytes, de la Protéine C-Réactive, de l'urée, et des autres protéines plasmatiques (**Jungers *et al.*, 2011**).

I.5.1. Traitement de suppléance : La dialyse

Lorsqu'une insuffisance rénale chronique arrive au stade terminal, il est indispensable de suppléer les fonctions rénales défaillantes par la dialyse ou greffe rénale (**Charmes *et Merles*, 1996**).

Deux types de dialyse existent en fonction de la nature de la membrane :

- **La dialyse péritonéale** : qui repose sur un échange au travers du péritoine du malade.
- **L'hémodialyse** : qui repose sur un échange au travers d'une membrane artificielle.

Le traitement le plus adapté au patient sera choisi en fonction de son état clinique, son âge, ses conditions familiales et professionnelles et ses préférences personnelles.

I.5.1.1. Dialyse péritonéale

L'épuration du sang s'effectue grâce au péritoine, une membrane naturelle, située dans l'abdomen. La solution de dialyse est donc introduite dans la cavité péritonéale par l'intermédiaire d'un cathéter, préalablement posé au niveau de l'abdomen, lors d'une intervention chirurgicale. Ce traitement se réalise à domicile et la phase d'épuration du sang dure environ quatre heures. La personne doit répéter ce cycle trois à quatre fois par jour. Il est également possible de réaliser les échanges de manière automatique, grâce à une machine. Dans ce cas, la séance dure environ 8 à 9 heures et se déroule toutes les nuits, pendant le sommeil (**Simon, 2007**).

I.5.1.2. Hémodialyse

Le malade peut être dialysé grâce à un accès vasculaire : une fistule ou un cathéter si la pose de la fistule n'est pas possible. La création d'une fistule artério-veineuse se réalise par une opération chirurgicale. Elle permet la connexion entre une veine et une artère. La fistule est généralement posée sous la peau de l'avant-bras du côté le moins utilisé dans la vie courante. Le développement de la fistule demande plusieurs semaines et ce traitement consiste à venir au centre de dialyse, en général trois fois par semaine, pour une séance d'au moins quatre heures de temps (**Simon, 2007**).

Les échanges entre le plasma et le dialysat à travers une membrane sont sous la dépendance de deux phénomènes physiques différents : la diffusion ou le transfert par conduction et l'ultrafiltration ou transfert par convection.

➤ **La diffusion (ou conduction)**

Lorsqu'on met en contact, au travers d'une membrane semi-perméable, deux solutions contenant différentes concentrations de certaines substances (en l'occurrence, le sang et le dialysat), les molécules qui les composent se déplacent du milieu le plus concentré vers le moins concentré, jusqu'à l'obtention d'un équilibre.

La membrane comporte une multitude de trous appelés pores de tailles différentes, de façon à ce que les petites comme les grosses molécules puissent la traverser, mais pas les cellules sanguines ni les grosses molécules comme les protéines. Les minéraux et autres substances (comme l'urée et la créatinine par exemple) en excès dans le sang vont passer dans le dialysat (c'est la diffusion). Réciproquement les minéraux en excès dans le dialysat (par exemple le calcium) vont passer dans le sang (c'est la rétrodiffusion) (**Man et Jungers, 2007**).

➤ **L'ultrafiltration (transport convectif)**

Dans ce cas, on exerce une pression sur le compartiment sanguin au travers de la membrane de dialyse ; le gradient de pression et la résultante entre la pression sanguine positive et la pression négative du dialysat. C'est ce phénomène qui va permettre de corriger l'excès d'eau et de sodium dans l'organisme du malade. L'eau et le sodium qu'il contient en excès traversent la membrane et rejoignent le dialysat (**Man et Jungers, 2007**).



Figure 3: Principe de l'hémodialyse (Man et Jungers, 2007)

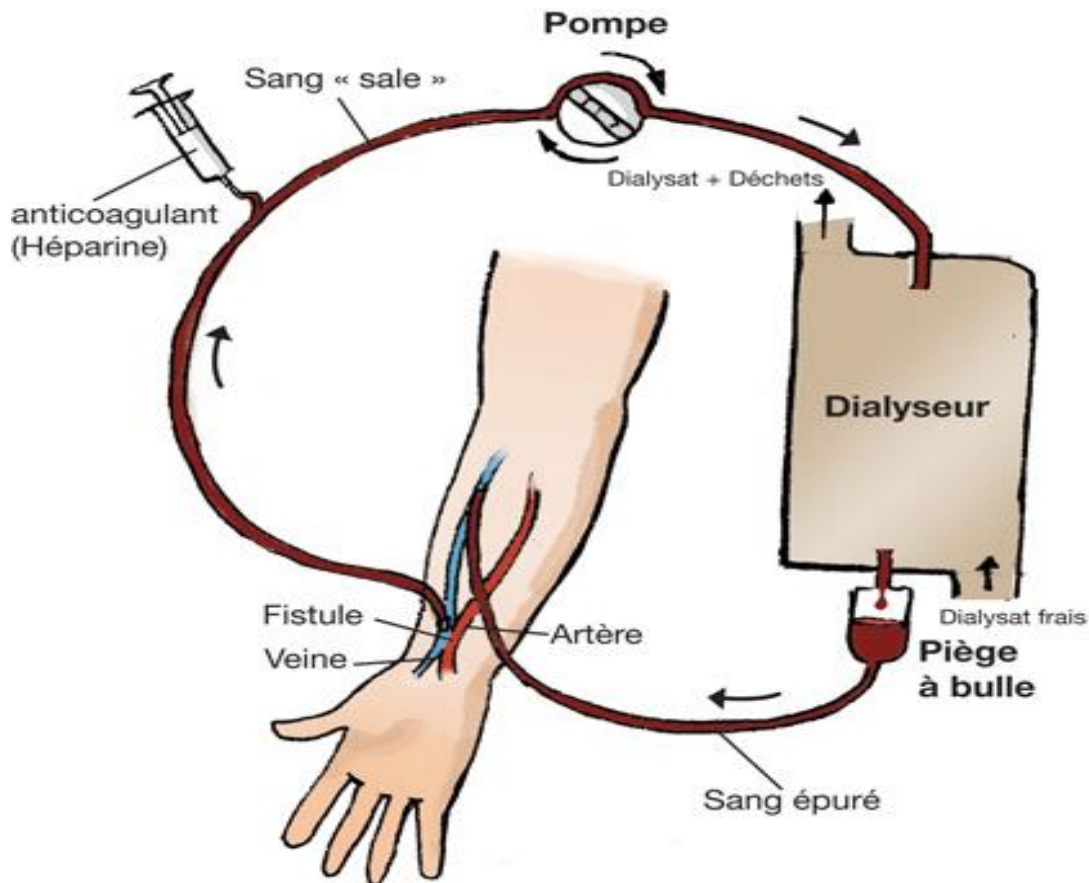


Figure 4: Fistule artério-veineuse et sens de circulation du sang au cours de l'hémodialyse (Man et Jungers, 2007)

Quelques soient les traitements envisagés, la personne atteinte d'insuffisance rénale chronique doit être prise en charge parallèlement par des paramédicaux (infirmière, diététicienne, psychologue, assistance sociale...). Cela dans le but d'accompagner le patient et

de faciliter une éducation thérapeutique (sur les attitudes alimentaires, l'hygiène, les aspects sociaux, etc.).

I.6. Efficacité et complications de l'hémodialyse

Lorsque le traitement par hémodialyse est efficace, l'état clinique du patient s'améliore. Les paramètres biologiques se normalisent, l'hypertension est contrôlée (**Simon, 2007**).

Par contre des complications à plus ou moins long terme sont fréquentes. Au cours des séances, il peut survenir des crampes musculaires, des troubles du rythme cardiaque, des hypoxies dues à la bio-incompatibilité des membranes. De plus, le contact direct du sang avec la membrane d'hémodialyse peut produire des réactions inflammatoires et le stress oxydatif qui entraînent une peroxydation lipidique au niveau des membranes cellulaires (**Ziouzenkova et al., 2002**). Des endotoxines, d'autres composants des parois cellulaires bactériennes, de l'ADN bactérien, des exotoxines et des métabolites bactériens peuvent pénétrer dans le sang pendant la dialyse et provoquer des effets délétères. Les produits bactériens qui traversent la membrane de dialyse peuvent activer des monocytes dans le sang du patient et engendrer une poussée de cytokine inflammatoire, susceptible d'induire différents problèmes de santé tels que: les décès par infarctus du myocarde, décès par accident vasculaire cérébral (**Hasegawa et al., 2008**).

I.6.1. Insuffisance rénale chronique et risque cardiovasculaire

L'atteinte cardiovasculaire (CV) est aujourd'hui un sujet majeur de préoccupation, en raison de son retentissement sur la morbidité et la mortalité des patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC). L'importance des complications cardiovasculaire chez l'urémique tient au fait qu'elles constituent la principale cause de décès chez les dialysés, et que le taux de mortalité de ces patients, à âge égal, est très supérieur à celui observé dans la population générale. De plus, la prévalence de l'atteinte CV est très élevée avant même le début du traitement de suppléance et la comorbidité présente au moment de la mise en dialyse est prédictive de la mortalité ultérieure du dialysé. Ces constatations ont amené à réexaminer les facteurs de risque d'atteinte CV présents chez l'IRC et à évaluer les possibilités de traitement préventifs (**Jungers et al., 2003**).

I.6.2. La dyslipidémie

La dyslipidémie constitue le facteur de risque majeur responsable de la genèse de complications cardiovasculaires chez l'IRC, elle est retrouvée chez 50 à 70% des patients atteints d'IRC et constitue un facteur de progression de la maladie (**Charriere et al., 2009**). Elle se manifeste à un stade précoce de l'insuffisance rénale et accélère sa progression vers le stade terminal. Actuellement il est clairement établi que l'hypertriglycéridémie est un facteur important de complications cardiovasculaires chez l'insuffisant rénal. Elle est en rapport avec une diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase (LP), de la lipase hépatique (LH) et des récepteurs aux VLDL (**Vaziri, 2006**). Ces différentes anomalies ne sont qu'imparfaitement ou peu corrigées par les techniques de suppléance de l'insuffisance rénale chronique (hémodialyse, dialyse péritoneale). Il a été démontré que la dialyse corrige une grande partie des anomalies métaboliques secondaires à l'IRC, mais elle n'a pas d'influence sur les troubles lipidiques (**Aparicio, 2000 ; Mekki et al., 2002 ; Mekki et al., 2004**).

En effet, l'étude de **Mekki et al., (2009)** menée sur 9 ans chez les patients en IRC de l'ouest algérien, a montré que l'hémodialyse non seulement n'améliore pas la dyslipidémie générée par l'IRC mais elle aggrave certaines anomalies lipidiques comme l'hypertriglycéridémie, la diminution de l'activité des enzymes lipolytiques, l'augmentation de la masse des VLDL et l'altération de la composition des HDL, accentuant ainsi le risque cardiovasculaire. L'héparinisation nécessitée par l'hémodialyse contribue à augmenter les troubles lipidiques, car l'héparine réduit l'activité des enzymes lipolytiques (**Nasstrom et al., 2004**). De même que pour l'hémodialyse, la dialyse péritonéale chronique ambulatoire, ne corrige pas la dyslipidémie de l'IRC, une absorption excessive de glucose à partir du liquide de dialyse peut majorer la synthèse de triglycérides, en particulier chez les patients hypertriglycéridémiques (**Aparicio, 2000 ; Pagniez, 2000 ; Locatelli et al., 2003**).

II. STRESS OXYDATIF ET HÉMODIALYSE

II.1. Le stress oxydant : origines et conséquences

II.1.1. Origines des espèces réactives

La notion de "radicaux libres", de "stress oxydant" et d' "antioxydants" est de plus en plus utilisée pour expliquer différentes atteintes pathologiques et leurs approches thérapeutiques. On appelle radical libre toute molécule qui contient un ou plusieurs électrons libres (célibataires) la rendant très réactive. A l'état naturel, l'oxygène, qui comporte naturellement deux électrons célibataires sur la couche périphérique, est très instable avec une

forte tendance à oxyder tout les composants qu'il rencontre en leur arrachant un électron pour l'apparier à l'un de ses électrons célibataires. L'oxygène moléculaire, apparu voici 3 milliards d'années dans l'atmosphère terrestre, est le deuxième élément le plus abondant de la biosphère. Principalement formé lors de photosynthèse (Gilbert *et al.*, 1997), c'est un carburant indispensable à la vie des cellules aérobies. L'oxygène, en tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme, se transforme en molécule d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est importante puisqu'elle est associée à la production de 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique à partir d'une molécule de glucose (contre 2 seulement dans un processus anaérobie). Mais tous les organismes aérobies paient le prix de ces avantages métaboliques. En effet, les cellules convertissent 3 % de la quantité totale d'oxygène consommée en espèces réactives de l'oxygène (notées ERO) (Ferradini *et al.*, 1986). Les ERO sont majoritaires mais des radicaux soufrés, nitrogenés, phosphorés ou carbonés sont également formés. Ces ERO qui peuvent être radicalaires ou non radicalaires, sont aussi produites en permanence par différents systèmes enzymatiques dont les plus importants sont les NAD(P) H-oxydase et les NO synthase (figure 5).

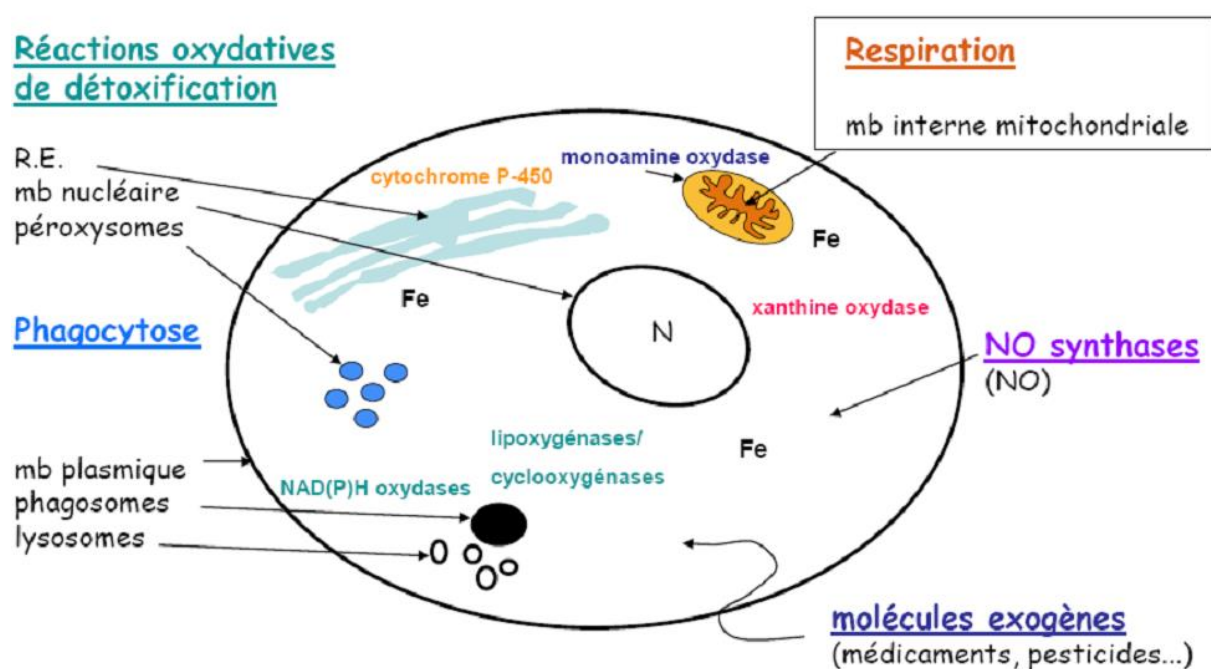


Figure 5: Principaux sites cellulaires de productions des ERO (SEKLI-BELAIDI, 2011)

Le radical OH^\cdot est formé principalement au cours de la réaction de Fenton et du cycle de Haber-Weiss mais aussi de la décomposition de l'acide peroxy-nitrique (figure 6). Ces espèces présentent dans leur structure électronique externe un électron célibataire qui leur

confère une grande réactivité chimique avec les constituants cellulaires en raison du réappariement spontané de cet électron libre. Les cellules de la paroi vasculaire présentent un état redox physiologique et l'équilibre entre la production de ces espèces réactives et leur neutralisation est lié à la présence de nombreux systèmes antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques).

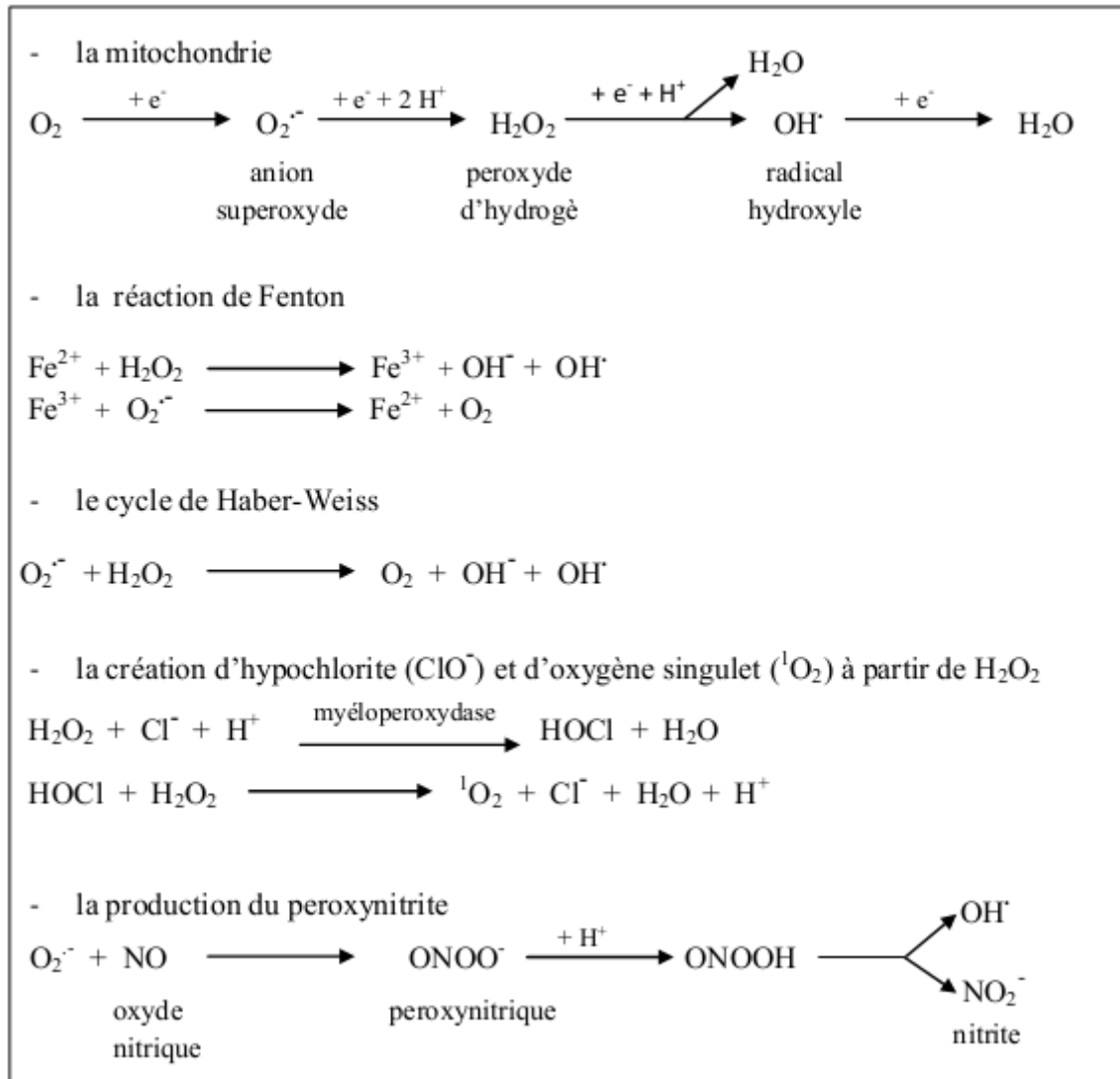


Figure 6 : Différentes voies de la genèse des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote dans l'organisme (SEKLI-BELAIDI, 2011).

II.1.2. Rôles des espèces réactives dans des situations physiologiques

Du fait de l'importance de l'oxygène dans les systèmes biologiques, en situation physiologique, les espèces réactives sont créées en continu dans l'organisme. Ainsi, les radicaux libres générés de façon permanente par le métabolisme normal de l'oxygène, ne sont

pas seulement des produits agressifs mais aussi des modulateurs de voies de transduction du signal et de l'expression de gènes qui participent à l'homéostasie vasculaire. Ils jouent le rôle de messenger pour la cellule, dans l'apoptose et dans la défense contre les infections (**Human et al., 2002**). L'anion superoxyde O_2^- , produit dans la chaîne respiratoire des mitochondries ou durant la phagocytose, est nécessaire à la performance de la réponse immunitaire ; par exemple, un déficit de sa production peut déterminer la survenue de la granulomatose septique chronique caractérisée par l'incapacité de l'organisme à lutter contre l'agression d'agents microbiens pyogènes (**Beaman et al., 1984 ; Lehucher et al., 2001 ; Swain et al 2002**). L'oxyde nitrique (NO) joue un rôle important en établissant le tonus vasculaire et en modulant la réponse inflammatoire (figure 7).

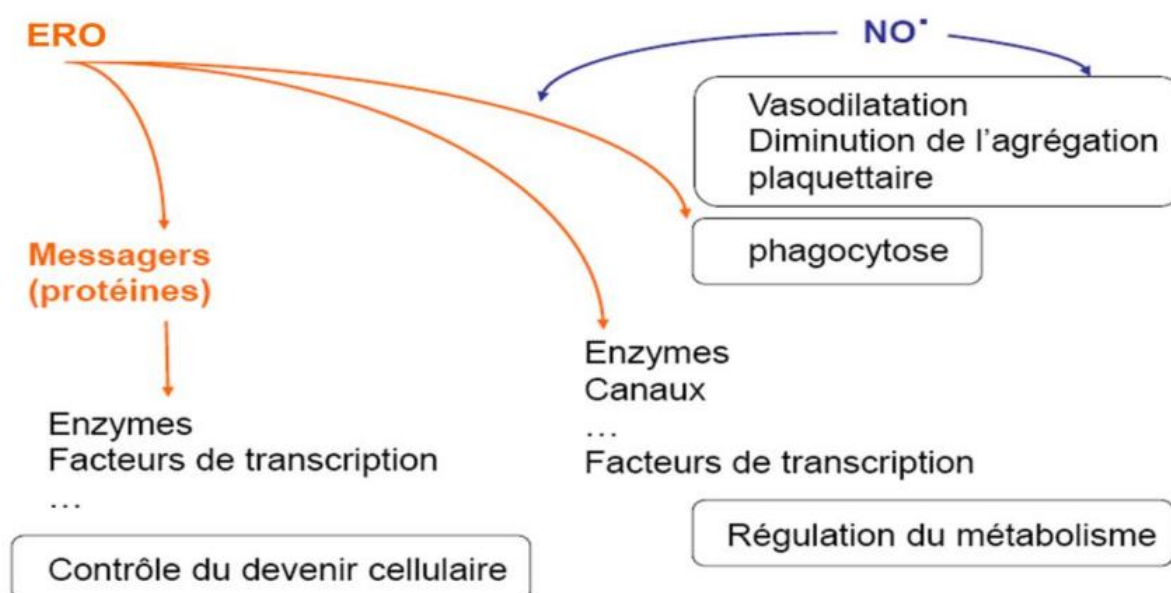


Figure 7: Rôles physiologiques des espèces réactives (**SEKLI-BELAIDI, 2011**)

II.1.3. Le déséquilibre : origines et conséquences

La notion de stress oxydant a été utilisée pour la première fois par **Sies en 1985**. Il est défini comme une altération cellulaire et tissulaire par des molécules oxydantes. Il est la résultante d'un déséquilibre profond dans la balance entre les prooxydants, producteurs d'espèces radicalaires, et les antioxydants, au profit des premiers (Figure 8). Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale des phénomènes d'ischémie-reperfusion (xanthine oxydase), d'une activation de systèmes enzymatiques (NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de

fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine, transferrine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, cathécholamine). L'origine de ce déséquilibre peut également être de nature exogène : une alimentation pauvre en antioxydants, une exposition aux rayons ultraviolets, à l'action de substances oxydantes (solvants, pesticides, anesthésiques, tabac) ou lors d'un accroissement brutal de l'apport en oxygène (**Michelson., 1986**). Les ERO très électrophiles tentent de ré-apparier leur électron célibataire en agressant toutes les molécules susceptibles de céder un électron ; leur durée de vie est donc très courte. L'espèce agressée devient à son tour radicalaire, initiant de cette façon un processus de réactions en chaîne (**Lehucher et al., 2001**). L'acide désoxyribonucléique (ADN), les lipides membranaires polyinsaturés ou encore les protéines sont les cibles privilégiées de ces oxydations. Le déséquilibre prooxydant entraîne la Formation de lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées et de multiples dysfonctionnements cellulaires : processus pro-inflammatoires, d'apoptose et/ou de nécrose (**Beaudeau et al., 2006**)



Figure 8: Déséquilibre entre pro-oxydants et antioxydants (**Sies, 1985**)

II.1.4. Les effets du stress oxydant sur les structures moléculaires

- L'ADN

Les ERO, en particulier les radicaux hydroxyles, sont capables de léser et de modifier des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN. Parmi les bases transformées, la 8-hydroxy-guanine a été utilisée comme marqueur de stress oxydant des différentes espèces animales. Les radicaux OH. sont capables de réagir avec les désoxyriboses de la molécule d'ADN. Les multiples dégâts engendrés sont réparables grâce aux mécanismes d'excision et de re-synthèse effectuées par des enzymes de reconnaissance et de réparation de l'ADN. Mais lorsque ces systèmes de protection sont eux même atteints par l'oxydation, de graves altérations du

matériel génétique sont induites, comme des mutations pouvant être à l'origine de cancers (Lehucher *et al.*, 2001).

- **Les protéines**

Les ERO peuvent dénaturer les protéines de soutien comme le collagène mais aussi les protéines circulantes comme l'albumine ou la transferrine. Les protéines de reconnaissance moléculaire (enzymes, anticorps ou récepteurs membranaires) sont aussi des cibles de l'oxydation radicalaire. Les attaques s'effectuent préférentiellement sur les acides aminés portant des chaînes latérales aromatiques (phénylalanine, tyrosine, histamine, tryptophane) et sur les acides aminés soufrés (Lehucher *et al.*, 2001).

- **Les lipides polyinsaturés et la peroxydation lipidique**

Au cours de la phase d'initiation de la peroxydation lipidique, les ERO arrachent un atome d'hydrogène aux chaînes insaturées des acides gras pour former des radicaux alkyles. Au cours de la phase de propagation, les réactions en chaîne interviennent ensuite dans la membrane où les radicaux alkyles réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux peroxydes. Cette phase est stoppée essentiellement grâce à l'action des antioxydants physiologiques. La peroxydation lipidique a pour conséquence l'altération de la fluidité des membranes qui, associée à leur désorganisation globale, peut conduire jusqu'à leur lyse (Lehucher *et al.*, 2001).

- **Les ERO et le système immunitaire**

Le système immunitaire utilise certaines ERO produites par les macrophages comme moyen essentiel de défense contre les micro-organismes. Cependant les mêmes ERO contribuent aussi à causer des lésions associées à des réactions inflammatoires (Slater, 1984). En fait, bien que l'on ne puisse pas directement relier le stress oxydant à la déficience du système immunitaire, on sait qu'il existe des interactions moléculaires complexes entre les deux. Il a été démontré que le "tumor necrosis factor" (TNF) induisait la génération d'espèces activées de l'oxygène par les neutrophiles (Larrick *et al.*, 1997 ; Nathan, 1987) à des concentrations aussi basses que 0,5 ng.L⁻¹ .

II.1.5. Les pathologies liées au stress oxydant

Avant d'aborder les différentes pathologies liées au stress oxydant dans l'organisme, il est important de souligner que le lien de causalité entre le stress oxydant et l'apparition des

pathologies reste un sujet de controverse dans la communauté scientifique. Le déséquilibre oxydant/antioxydant est-il cause ou conséquence de ces pathologies ? La carence en micronutriments résulte-t-elle d'une carence d'apport et/ou d'une consommation excessive résultant du stress oxydant ? Où se situe la frontière entre stress oxydant physiologique et pathologique ? (**Madger, 2006**).

- **Cancer**

Le cancer semble être une maladie dégénérative liée à l'âge. Il a été démontré que ni O_2^- , ni H_2O_2 ne pouvaient réagir avec le désoxyribose ou les bases de l'ADN, ce qui suggère que le radical OH^\cdot serait le principal responsable des dégradations observées. Certaines régions de l'ADN dites "nues", contiennent des métaux de transition (Fe ou Cu), et ne sont pas couvertes par les histones. Ainsi des réactions d'oxydation peuvent survenir, catalysées par ces métaux. La mutagénicité démontrée des produits hydroxylés de la guanine et de la thymine est due à des erreurs de lecture de l'ADN lors de réplication. Par ailleurs, de nombreux facteurs favorisant la survenue de cancers sont en fait des facteurs générant des ERO, soit directement comme le tabac (**Hoshino et al., 1990**), soit après phagocytose comme l'amiante (**Goodlick et al., 1986 ; Shatos et al., 1987**), soit par réaction de Fenton par des métaux carcinogènes comme le chrome ou le nickel (**Sugiyama et al., 1991**), soit par photolyse ou photoactivation comme les ultra-violets A et B (**Beani, 1995**).

- **Athérosclérose**

Il est actuellement admis que l'athérosclérose est liée à la peroxydation des LDL qui conduit à la genèse de la plaque athéromateuse (**Berliner et Hzincker., 1996**). En effet, ces LDL oxydées sont à l'origine de la transformation des macrophages en cellules spumeuses qui constituent les "stries lipidiques", et induisent la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses dans l'intima qui évolueront en plaques athéromateuses surmontées par une couche fibrocellulaire dense.

- **Cataracte**

Le stress oxydant a aussi été évoqué dans la survenue de la cataracte. La cataracte est la première cause de cécité (**Beebe et al., 2010**). Un stress oxydant photo-induit par les radiations solaires et les ultraviolets entraîne l'oxydation des protéines constitutionnelles du

cristallin et sa perte de transparence. Pour s'opposer au stress oxydant, le cristallin possède des concentrations élevées en vitamine C (10 fois la concentration plasmatique).

• Allergies

Des enquêtes épidémiologiques en Europe et au Japon indiquent une augmentation des allergies comme l'asthme, la rhinite allergique, l'eczéma atopique et la dermatite de contact, notamment sur les lieux de travail (Wada *et al.*, 1995 ; Belaich et Marck., 1997) . Le rôle des ERO dans ces affections est de plus en plus décrit. En effet, dans la dermatite de contact, une production des radicaux libres a été mesurée (Wada *et al.*, 1995). En ce qui concerne la dermatite atopique, on observe une production de radicaux O_2^- par plusieurs cellules de l'immunité dont les éosinophiles (Berliner et Hzincker., 1996). Certaines activités professionnelles prédisposent tout particulièrement à l'apparition, l'entretien ou l'aggravation d'un eczéma atopique des mains (Nilsson *et al.*, 1985 ; Rysted, 1985) dans le cas de l'asthme et de rhinites allergiques, les éosinophiles relarguent des médiateurs de l'inflammation notamment le radical O_2^- (Smith *et al.*, 1997). Ainsi, dans toutes les pathologies, les ERO interviennent sur le site de l'inflammation (Trenam *et al.*, 1992).

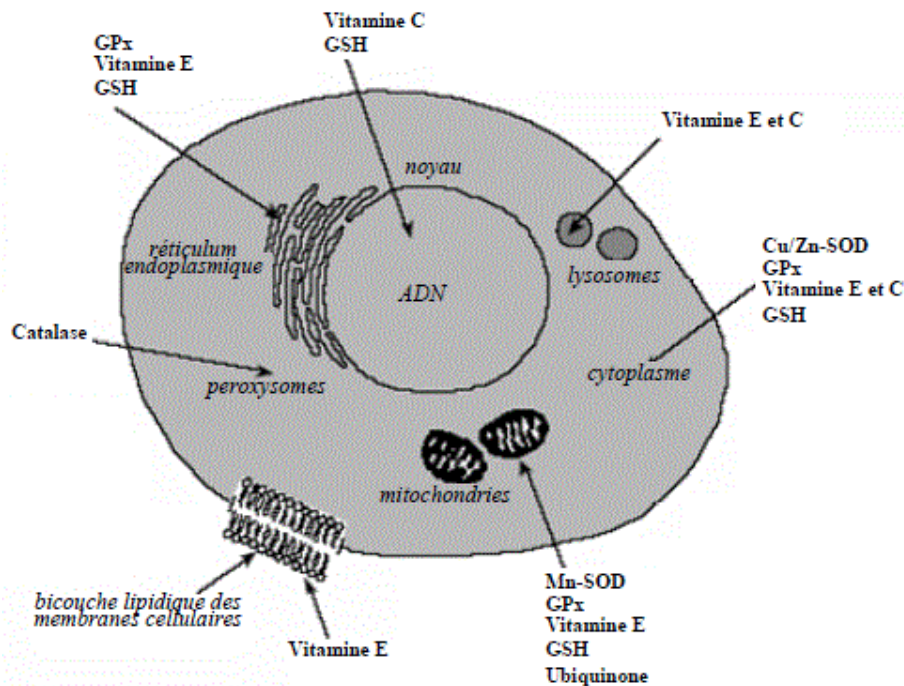
• Maladies neurodégénératives : la piste oxydative

Le rôle du stress oxydant dans les mécanismes de mort cellulaire au cours des maladies neurodégénératives est évoqué depuis plusieurs années (Christen., 2000). Parmi ces affections, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Parkinson sont les plus fréquentes. Elles sont caractérisées sur le plan neuropathologique par une perte sélective de groupes neuronaux. Tout récemment, un lien vient d'être établi entre des dommages oxydatifs affectant une protéine neuronale, l' α -synucléine, et le développement de pathologies neurodégénératives. La forme familiale de la maladie de Parkinson, qui touche 1 à 2 % de la population âgée de plus de 50 ans, est associée à deux mutations de cette protéine présente dans les synapses neuronales. Des chercheurs de l'université de Pennsylvanie ont montré que, dans les lésions cérébrales neurodégénératives et dans les corps de Lewy, l' α -synucléine est abondante sous forme nitrée, issue de sa combinaison avec les ER. Le stress oxydant pourrait ainsi constituer une étape précoce dans le développement de ces affections (Giasson *et al.*, 2000). Dans la maladie d'Alzheimer, la formation des dépôts amyloïdes est accélérée par la présence d'oxygène (Yatin *et al.*, 1999 ; Schoneich, 2002). Chez les patients ayant une démence de type Alzheimer (DTA), les diènes conjugués et les peroxydes lipidiques sont significativement plus élevés ; de même, il a été

observé une diminution de la capacité antioxydante au niveau du cortex temporal inférieur (Karelson *et al* 2006)

II.2. Les défenses antioxydantes

A partir de l'équilibre entre la nécessité de l'oxygène et les dangers potentiels des radicaux libres, l'organisme a développé de puissants systèmes de défense antioxydants permettant de contrôler et de maîtriser le plus précisément possible ce métabolisme. La défense contre ces ERO repose sur deux mécanismes distincts ; les enzymes et les molécules antioxydantes proprement dites (vitamines C et E, thiols, quinones, caroténoïdes, flavonoïdes) (figure 9 et 10).



Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule.

(Mn-SOD) : superoxyde dismutase mitochondriale,

(Cu/Zn-SOD) : superoxyde dismutase cytosolique,

(GPx) : glutathion peroxydase, (GSH) : glutathion réduit.

Figure 9: Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule (Sekli-belaidi, 2011)

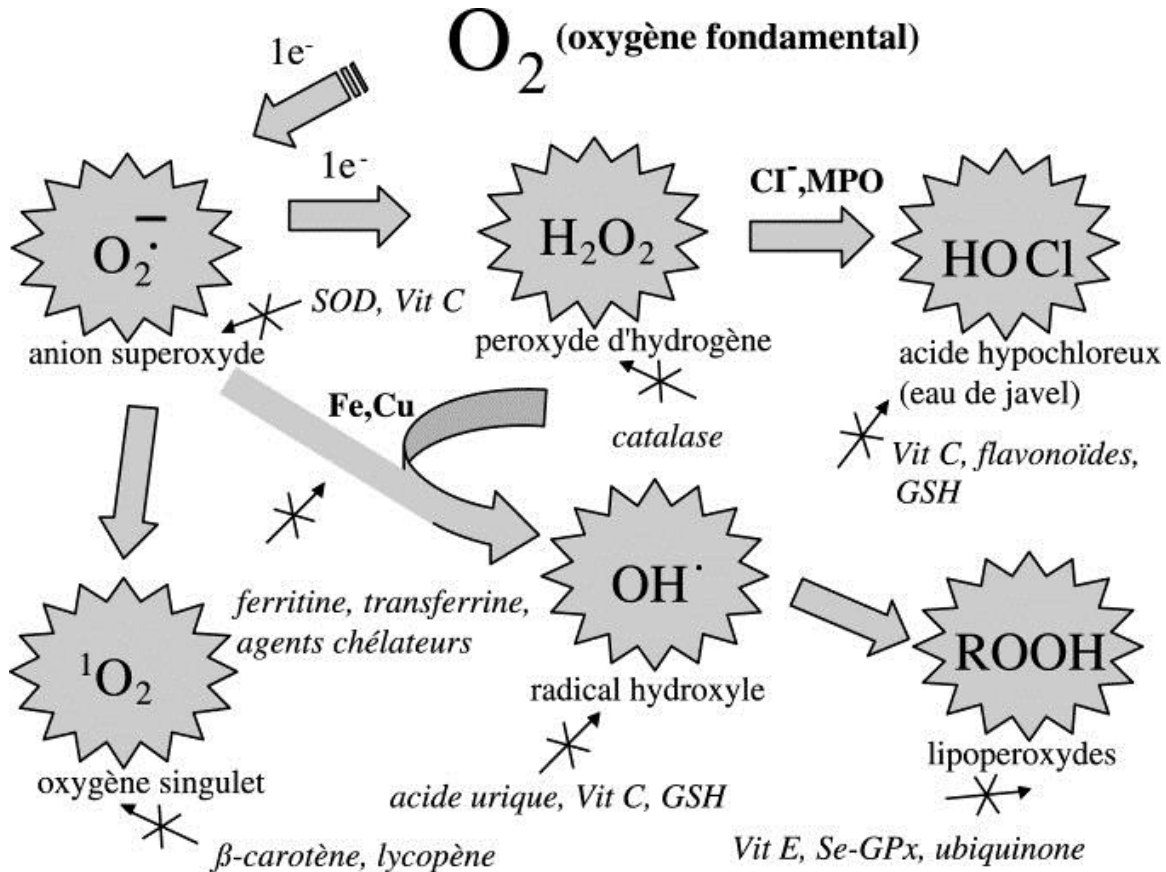


Figure 10: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par le système de défense antioxydant. (Sekli-belaidi, 2011)

La figure 10 présente les séquences de production des radicaux libres à partir de l'oxygène moléculaire. Les flèches barées indiquent les sites d'actions des différents antioxydants.

II.2.1. Les mécanismes de défense enzymatique

Les trois systèmes principaux de défense enzymatique impliquent les superoxydes dismutases (SOD), les catalases et les glutathion peroxydases.

II.2.1.1. Les SOD

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloenzymes largement distribuées au sein des organismes aérobies dont elles assurent la survie (Hassan, 1986). Leur rôle est de catalyser la dismutation du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et O_2 à une vitesse extrêmement importante (environ $2.109 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Il existe deux types de SOD selon la nature métallique de leur cofacteur : une SOD cytoplasmique Cu et Zn dépendante et la SOD mitochondriale Mn dépendante. C'est la découverte de ces deux enzymes dans les cellules qui a permis de démontrer pour la première fois l'existence de radicaux libres dans les organismes vivants,

phénomène supposé totalement impossible par les chimistes du fait de leur danger potentiel. Ainsi, c'est en démontrant la réalité de puissants systèmes antioxydants enzymatiques endogènes que McCord et Fridovitch ont mis en évidence pour la première fois l'importance du concept du stress oxydant (McCord *et al.*, 1969 ; McCord *et al.*, 1970) .

II.2.1.2. Les catalases

Le H₂O₂ formé, intermédiaire dangereux pour la cellule, est partiellement éliminé par les catalases localisées dans les peroxysomes. Cette localisation est stratégique puisque c'est là que des enzymes à flavines, l'urate oxydase, la glucose oxydase et les D-amino-oxydases produisent le H₂O₂ (Lehucher *et al.*, 2001).

II.2.1.3. Les glutathion peroxydases (GSH-Px)

Ce sont des enzymes à sélénium ayant la propriété de catalyser la réduction des hydroperoxydes et du peroxyde d'hydrogène par le glutathion réduit. Le recyclage permanent de ce dernier est assuré par la glutathion réductase. Le rôle de la GSH-Px est très important dans la plupart des tissus (Richard *et al.*, 1997), par exemple dans les globules rouges et les plaquettes où elle réalise la totalité de l'élimination de H₂O₂. Il faut enfin souligner que l'activité mesurée de la GSH-Px érythrocytaire est un bon reflet de la carence en sélénium plasmatique ou érythrocytaire (Nève *et al.*, 1991). La GSH-Px plaquettaire est également un bon indicateur du statut sélénium mais les étapes nécessaires à l'isolement sont délicates.

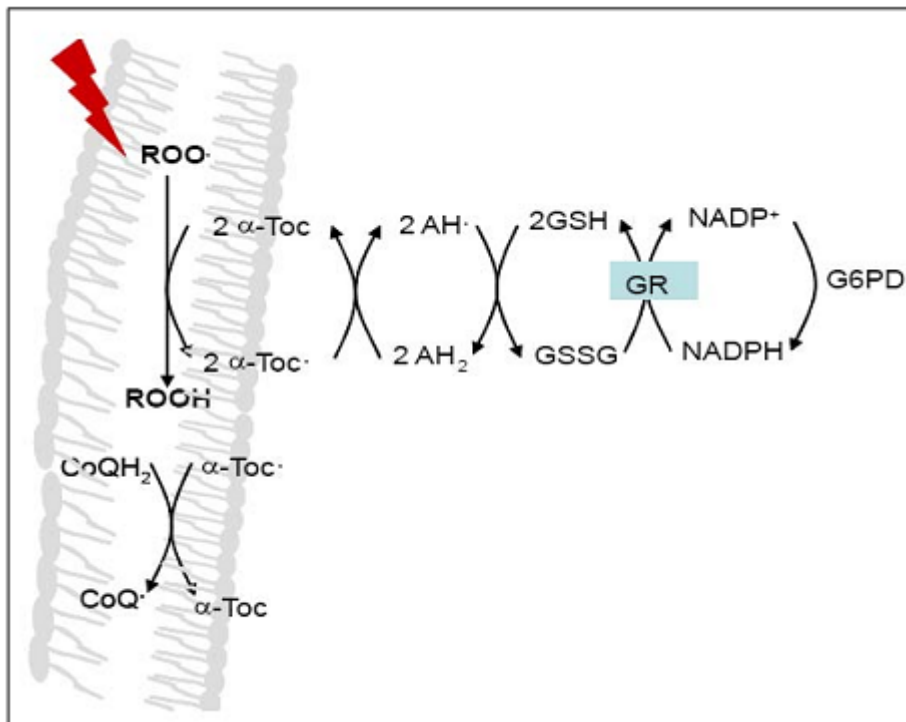
II.2.2. Les mécanismes de défense moléculaire

Certaines molécules présentes dans l'organisme ont des propriétés antiradicalaires. Ces antioxydants sont pour la plupart apportés par l'alimentation, d'où l'attention portée aux aliments dans le renforcement du système de défense contre le stress oxydant. Ces molécules agissent par échange ou appariement d'électron célibataire. Elles sont capables d'inactiver les espèces réactives de l'oxygène par des processus d'oxydoréduction. Il s'agit en quelque sorte de substance à effet tampon : lorsqu'elles sont présentes dans des zones de risque, comme les membranes cellulaires, certaines protéines et l'ADN, elles les protègent en orientant l'espèce réactive vers une voie métabolique précise. Hormis les acides ascorbique et urique présentés précédemment, ces molécules sont essentiellement la vitamine E, le bêta-carotène, les flavonoïdes, les thiols, les quinones, les chélateurs de métaux et les oligo-éléments (Lehucher *et al.*, 2001).

II.2.2.1. La vitamine E

La vitamine E (α -tocophérol) est l'antioxydant liposoluble majeur des lipides. Elle protège in vivo les structures moléculaires particulièrement sensibles à l'oxydation (double liaisons des acides gras polyinsaturés, bases nucléotidiques des brins d'ADN) et les structures condensées riches en lipides (membranes, lipoprotéines). La régénération de l' α -tocophérol se fait en permanence par les quinones et la vitamine C au niveau des sites d'action de la vitamine E, à l'interface entre les lipides et l'eau (figure 11). Le potentiel antioxydant de l' α -tocophérol est important malgré sa faible concentration membranaire. La teneur en vitamine E membranaire et son stockage adipeux, hépatique et musculaire sont d'ailleurs peu influencés par

al.,
au
de



les apports
nutritionnels
(Guillard *et*
1996), sauf
cours des
syndromes

malabsorption intestinale.

Figure 11 : Synergie d'action des antioxydants cellulaires (Sekli-belaidi, 2011)

II.2.2.2. La Vitamine C

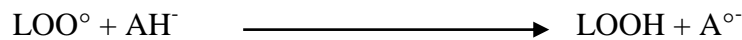
- Structure chimique et propriétés

La vitamine C, ou acide ascorbique, peut être considérée comme un dérivé cyclique des hexoses. Sa caractéristique essentielle est qu'elle existe sous trois degrés d'oxydoréduction différents : la forme réduite ou acide ascorbique, la forme semi-réduite ou mono-oxydée, appelée acide mono-déhydro-ascorbique et la forme oxydée ou acide déhydro-ascorbique.

L'acide mono-déhydro-ascorbique est un radical anion relativement inerte, ne réagissant pas avec l'oxygène car il est stabilisé par résonance (effet mésomère) et formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire. L'agent oxydant habituel est l'oxygène dont l'activité est catalysée par des traces de métaux comme le cuivre et le fer.

- Mécanisme d'action

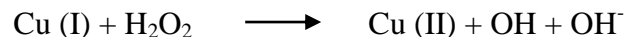
La vitamine C est un puissant antioxydant hydrosoluble, qui piège directement les ERO (Wagner *et al.*, 2011). Excellent donneur d'électrons, l'anion ascorbate AH^- piège les radicaux et donne un radical ascorbyle $A^{\circ-}$:



Ce radical est transformé en déhydroascorbate recyclé en acide ascorbique par une déhydroascorbate réductase avec utilisation de NADH. Par ce mécanisme, la vitamine C hydrosoluble régénère la vitamine E à l'interface membrane/cytosol. L'ascorbate peut aussi développer une activité pro-oxydante en absence de concentration suffisante d' α -tocophérol et/ou en présence de concentration augmentée en ions métalliques tels que le fer ferreux Fe^{2+} (Gallo *et al.*, 2010). Le Fe^{2+} réagit ensuite avec H_2O_2 pour donner le radical hydroxyle selon une réaction de Fenton (Samuni *et al.*, 1983). L'acide ascorbique est un donneur d'atome d'hydrogène H qui réagit avec les radicaux libres OH , $O^{\circ-}$, les transforme en molécules non toxiques. En présence de cuivre et de fer, il favorise la formation de radicaux superoxydes et a un effet pro-oxydant.

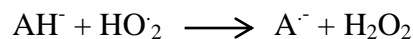


Le cuivre I réagit ensuite avec l'eau oxygénée avec production d'un radical OH

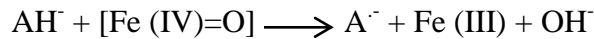
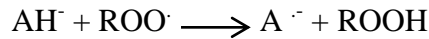


- Le rôle antioxydant

Le rôle antioxydant de l'acide ascorbique découle de ses propriétés réductrices. C'est le plus puissant des antioxydants hydrosolubles. Il est capable de réagir directement avec les espèces réactives oxygénées et azotées. Il réduit l'anion superoxyde sous forme acide ou basique :



Il limite la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux peroxy et les complexes oxoferryle :

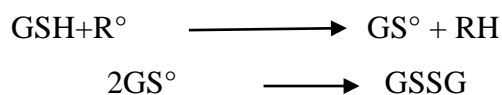


Il intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques fer dépendantes en tant que transmetteur d'électrons (**Renauld., 2003**). Il permet aussi de régénérer la vitamine E. Son pouvoir antioxydant l'implique dans les mécanismes de défense contre plusieurs pathologies.

II.2.2.3. Glutathion réduit

Le glutathion réduit (GSH) est une petite protéine composée de trois acides aminés : la cystéine, l'acide glutamique et la glycine. Elle est présente dans tous les types de cellules, et est un piègeur d' H_2O_2 , OH^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$ et des oxydants chlorés, en formant des ponts disulfures. Le rôle protecteur de GSH dépend de la détoxification d' $O_2^{\cdot-}$ (assurée par SOD, Catalase, GSH-Px) et de la régénération de glutathion oxydée (GSSG) en GSH (sous l'action de la glutathion réductase) (**Tihan et al., 2011**). Le GSH agit en synergie avec la vitamine C, la vitamine E (**Chan, 1993**) et le superoxyde dismutase (**Winterbourn, 1993**). Son action antioxydante s'exerce :

- ✓ Soit, directement en piégeant les radicaux libres R^{\cdot} pour former le disulfure GSSG par oxydation :



- ✓ Soit, en participant à la réduction des hydroperoxydes lipidiques ROOH comme cosubstrat des glutathion peroxydases (GPx)

Enfin, la cystéine, la taurine et la méthionine sont les piègeurs sélectifs de l'acide hypochloreux et des chloramines. La bilirubine, l'acide urique, le glucose et le mannitol ont la capacité de neutraliser certains oxydants.

Dans les conditions physiologiques, la réactivité des oxydants est limitée par les défenses antioxydantes assurant ainsi le contrôle des radicaux libres, via un mécanisme de capture ou de détoxification. La toxicité des radicaux libres ne se manifeste que lors de la rupture de cet équilibre : génération excessive et/ou déficit en antioxydants. L'affinité des radicaux libres pour la plupart des structures moléculaires, leur confère une activité délétère

participant ainsi à la physiopathologie de la majorité des complications à long terme du dialysé.

Il est à signaler que notre environnement ainsi que notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation de substances pro-oxydantes dans notre organisme (**Favier, 1997**). Il s'agit d'une exposition prolongée au soleil et aux radiations (ozonothérapie, Rayons X...), le contact avec des agents cancérigènes (amiante), le tabagisme, la prise de médicaments tels que les pilules contraceptives, la consommation excessive d'alcool, une alimentation mal inadéquate, la pollution (pesticides, poussières, monoxyde d'azote,...). Le stress intellectuel, psychique, thermique et les agents infectieux sont également impliqués.

II.3. Les antioxydants, des agents préventifs dans les apports nutritionnels

Les apports nutritionnels sont un moyen préventif largement utilisé dans les pathologies liées au stress oxydant. Même si les avis restent toujours contradictoires sur leur efficacité, des essais thérapeutiques ont montré le rôle important des apports nutritifs riches en antioxydants pour freiner la progression des maladies.

II.3.1. Cancer

Des études réalisées chez des animaux transgéniques montrent que la supplémentation en vitamine E, vitamine C et caroténoïdes peut effectivement empêcher le développement de cancers (**Glade., 1999**). D'autres études aboutissent en revanche à des conclusions radicalement opposées et il a même été observé une augmentation du risque de cancer liée à la supplémentation vitaminique (**Kaplan et al., 2001**). L'analyse de nombreuses études amène cependant à conclure que les régimes riches en fruits et légumes sont bénéfiques à la prévention des cancers, du poumon, du larynx, du pancréas, du sein et de la vessie (**Glade., 1999**). Dans plusieurs études, une relation inverse entre les apports en acide ascorbique et le risque de cancer de l'œsophage a été montrée. L'acide ascorbique jouerait également un rôle protecteur vis-à-vis du cancer du col de l'utérus en association avec des folates et des β carotènes (**Li et Schellhorn., 2007**). L'étude de supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants (SU.VI.MAX), évaluant l'impact d'un apport quotidien en antioxydants à doses nutritionnelles (β carotène 6 mg, acide ascorbique 120 mg, vitamine E 30 mg, zinc 20 mg, sélénium 100 μ g) sur l'incidence de la mortalité liée à des cardiopathies ischémiques et à des cancers, a mis en évidence une diminution de 31 % du risque de cancers et de 37 % de mortalité chez les sujets supplémentés (**Lin et al., 2009**).

II.3.2. Maladies cardiovasculaires

Plusieurs études ont montré qu'une consommation d'aliments riches en vitamine C, comme les fruits et légumes, entraîne une diminution du risque cardiovasculaire. L'acide ascorbique diminue l'athérogénèse en s'opposant au stress oxydant. Celui-ci favorise les maladies cardiovasculaires par plusieurs mécanismes : les radicaux libres oxygénés induisent l'apoptose des cellules endothéliales et favorisent aussi l'oxydation des LDL. Grâce à ses propriétés antioxydantes, l'acide ascorbique lutte contre les dysfonctions endothéliales. De son côté, l'acide urique joue un rôle très important pour limiter l'oxydation lipidique des LDL (**Patterson et al., 2003**). Toutefois, les résultats sont discordants. Une étude évaluant l'impact des antioxydants (vitamines C et E et le β carotène) auprès de 8200 femmes ayant un haut risque cardiovasculaire ou en prévention secondaire de maladies cardiovasculaires, ne trouve pas d'effet bénéfique de l'acide ascorbique dans cette population (**Cook et al., 2007**). Une autre étude menée sur 10 ans auprès de personnes de sexe masculin et âgées de plus de 50 ans, ne révèle pas de diminution du risque d'événements cardiovasculaires majeurs chez les sujets recevant de la vitamine C (500 mg/jour) ou de la vitamine E (**Sesso et al., 2008**). En revanche, un essai mené auprès de patients traités par cardioversion électrique pour une fibrillation auriculaire chronique, montre une diminution de récurrences précoces chez les sujets supplémentés en acide ascorbique à hauteur de 1000 mg/jour (**Korantzopoulos et al., 2005**). Des études ont montré que le phénotype de l'haptoglobine Hp influence le taux de vitamine C plasmatique et l'homéostasie du fer. Tout ceci concourt à une variabilité de la balance pro/anti-oxydante en fonction de ce phénotype. Le phénotype Hp 2-2 est associé à un état plutôt pro-inflammatoire, à une augmentation du turn-over ferrique et à un rôle antioxydant moins important. Le diabète étant caractérisé par un état inflammatoire basal et un stress oxydant majoré, les sujets diabétiques Hp 2-2 cumuleraient ces effets négatifs pour parvenir à une augmentation du risque de développement de pathologies cardiovasculaires. Les études de supplémentation vitaminique ont permis de conclure que les divergences observées sur les résultats s'expliqueraient par l'absence du déterminisme du phénotype Hp. En effet, seuls les diabétiques Hp 2-2 pourraient réellement bénéficier d'une supplémentation vitaminique dans la prévention des pathologies cardiovasculaires (**Milman et al., 2008**).

II.3.3. Vieillesse cutané

Parmi les multiples traitements locaux disponibles pour tenter de réduire le vieillissement de la peau, les antioxydants, parmi lesquels les quinones et les vitamines, occupent une place importante (**Glaser et Rogers., 2001**)

II.4. Méthodes d'évaluation du stress oxydant et applications médicales

Evaluer le stress oxydant à l'aide de marqueurs sensibles et spécifiques et savoir interpréter de façon clinique leur fluctuation sont des enjeux importants en recherche fondamentale mais également en analyse en biologie clinique. La mise en évidence d'un stress oxydant accru permet de développer des stratégies diagnostiques et thérapeutiques et de mesurer l'opportunité ou l'efficacité de l'administration d'un traitement antioxydant. Actuellement, il est possible de réaliser, à un instant donné et chez un sujet isolé, un bilan de stress oxydant qui additionne plusieurs biomarqueurs pour en tirer un score individuel de stress oxydant qui est à la base d'une stratégie de supplémentation antioxydante. Dans le grand public, l'engouement pour ces bilans est grand, malgré leur coût élevé, car ils entretiennent l'espoir d'un contrôle du stress oxydant et de ses conséquences, au premier rang desquels le vieillissement. Deux voies sont possibles pour diagnostiquer un stress oxydant ; soit l'évaluation de la teneur des espèces pro-oxydantes, soit la mesure de l'efficacité du système de défense antioxydant.

II.4.1. Evaluation directe des radicaux libres

La détection des ERO est très longtemps restée difficile *in vivo*. En effet, les radicaux libres ont une demi-vie très courte (de l'ordre de 10-11 secondes), et il est difficile de les détecter de manière directe. La résonance paramagnétique électronique (RPE), méthode qui détecte la présence d'électrons non appariés, assure une mesure directe et sensible des radicaux libres, et la détection des radicaux libres à des concentrations de l'ordre de 10⁻¹⁰ mol.L⁻¹ tant qu'ils sont stables. Pour les radicaux très instables, un certain nombre d'approches complémentaires sont disponibles.

II.4.2. Evaluation indirecte de l'action des ERO

En raison de leur très courte durée de vie, la plupart des techniques d'évaluation des ERO sont donc indirectes. Ces méthodes reposent sur la mesure des sous-produits de réaction des ERO avec les substrats biologiques. Des produits d'oxydations biologiques sont à ce jour les meilleurs marqueurs du stress oxydant.

II.4.2.1. Dérivés de la peroxydation des lipides

Le malondialdéhyde (MDA) est un produit terminal de la peroxydation lipidique. La réactivité du MDA avec l'acide thiobarbiturique (TBA) reste un test classique de dépistage de la peroxydation lipidique encore très utilisé (**Carbanneau *et al.*, 1991**). Si cette méthode relativement simple présente une très bonne sensibilité, elle manque de spécificité en raison

de la présence d'interférents (molécules ne relevant pas du stress oxydant et pouvant réagir avec le TBA) et des conditions opératoires nécessaires à la formation du complexe MDA-TBA (chauffage en milieu acide), (Lefevre *et al.*, 1998).

II.4.2.2. Dérivés de l'oxydation de l'ADN

De nombreux produits d'oxydation radicalaire de l'ADN ont été identifiés mais seulement deux d'entre eux (thymidine glycol et 8-OH-2-desoxyguanosine) sont des marqueurs intéressants qui peuvent être dosés dans des cellules isolées, dans l'urine et à partir de biopsies. Cependant, les méthodes de mesure sont lourdes (spectrométrie de masse, HPLC couplée à une détection électrochimique). En outre, des précautions drastiques doivent être prises lors de l'extraction de l'ADN, ce qui limite leur utilisation aux laboratoires spécialisés (Favier., 1997).

II.4.3. Evaluation du système de défense antioxydant

II.4.3.1. Dosage des enzymes antioxydantes

Le dosage des SOD est préconisé dans les globules rouges, après acheminement rapide du sang total sur glace. Des kits sont commercialisés pour le dosage des activités enzymatiques. La GSH-Px peut être dosée dans différents milieux biologiques ; des kits dérivant de la méthode de Paglia basée sur la mesure spectrométrique à 340 nm de l'oxydation du NADPH en présence du glutathion et de la GSH-Px sont disponibles avec une possibilité d'automatisation du protocole (Paglia et Valentine., 1967). Le dosage de la catalase dans les érythrocytes est basé sur la variation de la densité optique à 240 nm liée à la dismutation du peroxyde (Aebi., 1984).

II.4.3.2. Dosage des molécules antioxydantes

Le dosage des molécules antioxydantes a beaucoup progressé au cours des dix dernières années. La chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à une détection électrochimique est proposée pour le dosage simultané du tocophérol, du rétinol et des caroténoïdes, de l'acide ascorbique et du couple GSSG/GSH (Gazdik *et al.*, 2008). Les techniques spectrométriques (Feng *et al.*, 2005) ainsi que les méthodes enzymatiques sont aussi largement utilisées .

II.4.3.3. Evaluation du statut antioxydant total

Cette méthode repose sur la mesure du pouvoir antioxydant total lié à l'action de nombreuses substances antioxydantes dont certaines sont bien connues (protéines à

groupement thiols, acide urique, vitamines antioxydantes, glutathion réduit...) pour inhiber les effets des radicaux libres (**Prior et al., 1999**). Elle permet de déterminer la capacité antioxydante globale d'un milieu donné.

II.5. Stress oxydant chez les patients atteint d'insuffisance rénale chronique.

Un ensemble de travaux suggèrent que les patients atteints d'IRC subissent des modifications délétères de la structure des protéines et des lipides secondaires à la perte des défenses antioxydantes, à l'augmentation du stress oxydant ou à d'autres modifications postsynthétiques de la structure des protéines médiées par la glycation ou la carbamylation (**Kaysen, 2000**).

II.5.1. Rôle de l'urémie

L'urémie comporte entre autres troubles métaboliques une altération complexe et majeure de la production des ERO. Les polynucléaires neutrophiles de sujets IRC sont, à l'état basal, dans un état de pré-activation constante pour la production d'anion superoxyde (O_2°) par la poussée respiratoire. De plus, certaines toxines urémiques ont une activité prooxydante (**Roselaar et al., 1995**).

La présence élevée d'homocystéine, facteur indépendant de maladie cardiovasculaire, dans le plasma de patients urémiques contribue à majorer le statut prooxydant de cette population. son action prooxydante délétère est due à la libération de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) au cours de son métabolisme qui altère les fonctions endothéliales en diminuant la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) et donc la vasodilatation endothéliale et modifie les LDL circulantes (**Bostom et Lathrop., 1997**).

II.5.2. Rôle de la Glycation

Un autre mécanisme potentiel est l'altération de la structure des protéines et des lipides par glycation. Les produits de glycation avancée (Advanced Glycation End products ou AGE) habituellement associés au diabète sont élevés dans le plasma des IRC indépendamment du niveau de la glycémie. Ces substances proviennent de la réaction du glucose et d'autres hydrates de carbones avec les protéines, plus spécifiquement avec la lysine, par glycation non enzymatique et oxydation (glycoxydation) des protéines. Le rein joue normalement un rôle important dans le métabolisme des AGE, qui y subissent une filtration glomérulaire suivie d'une captation par les cellules tubulaires où ils sont métabolisés. La plus grande partie de la pentosidine circulante étant liée à des protéines de hauts poids moléculaires tels que l'albumine. Les AGE peuvent jouer un rôle en activant les cellules mononuclées, déclenchant

ainsi directement une réponse inflammatoire. Toutefois, l'inflammation elle-même peut réciproquement jouer un rôle dans la production des AGE (**Chellan et Nagaraj, 1999**).

II.5.3. Rôle de la dialyse

Le stress oxydant observé chez les patients dialysés relève, d'une part, des troubles métaboliques associés à l'urémie et, d'autre part, de la dialyse elle-même. En effet, les conditions de survenue d'un tel phénomène se trouvent réunies chez les patients urémiques dialysés de façon chronique. Chaque séance de dialyse majore la production d'oxydants chez des sujets ayant un déficit chronique en antioxydants. Le bicarbonate de sodium utilisé au quotidien comme liquide de dialyse est étroitement lié aux réactions pyrogéniques survenant lors des séances de dialyse et favorise la prolifération des bactéries.

D'autre part, des solutions de dialyse péritonéale contiennent des produits de dégradation du glucose liés au mode de stérilisation par la chaleur. Outre l'augmentation du taux plasmatique de produits de glycosylation avec la solution conventionnelle, il a été montré que le stress oxydatif est important chez les patients en dialyse péritonéale recevant des solutions avec une teneur élevée en produits de dégradation du glucose (**Rieu, 2003**)

Stenvinkel et Alvestrand, (2002) ont montré que la diminution des phospholipides érythrocytaires chez les IRC non encore dialysés était plus forte chez ceux atteints de malnutrition, la dialyse corrigeant partiellement l'anomalie. Ces observations ne permettent pas de distinguer clairement si l'altération oxydative est la conséquence de causes nutritionnelles ou de l'inflammation, mais elles suggèrent certainement qu'il existe une relation entre inflammation et stress oxydant.

II.5.4. Rôle de l'inflammation

Le stress oxydant est une composante majeure de l'inflammation associée à l'IRC et majoré par l'hémodialyse et la dialyse péritonéale (**Rieu, 2003**). La mortalité cardiovasculaire chez l'IRC est prédite à la fois par l'hypoalbuminémie et par l'élévation des protéines de la phase aiguë ou des cytokines qui en régulent la production (**Yeun et al., 2000**). L'inflammation est présente chez 30%-50% des patients ses causes sont multifactorielles (Tableau II) (**Guebre-Egziabher et Fouque., 2003**).

Bien que l'hypo-albuminémie soit le facteur prédictif de mortalité le plus généralement reconnu, il est probable que ce sont ces causes, et non la diminution de l'albuminémie par elle-même, qui sont responsables de la mortalité. Même s'il établit que la

malnutrition protéino-énergétique peut entraîner une hypo-albuminémie et que la malnutrition peut entraîner la mort ou contribuer à la mortalité relevant d'autres causes, l'inflammation est de plus en plus reconnue comme une cause importante, et peut être même la principale cause, de l'hypo-albuminémie chez les IRC.

Tableau II: Causes potentielles d'inflammation ou d'augmentation des protéines de l'inflammation et des cytokines au cours de l'insuffisance rénale chronique (Guebre-Egziabher et Fouque, 2003).

Causes non liées à la dialyse	Complication liées à la dialyse
<ul style="list-style-type: none"> • Stress oxydant (↑ peroxydation lipidique) • Accumulation de produits de dégradation (AOPP, AGE) • Regulation de la fonction rénale • Infection persistante (Chlamydia, pneumoniae, Hélicobacter pilori) • Insuffisance cardiaque chronique • Hypertension • Insulinoresistance 	<ul style="list-style-type: none"> • Bio-incompatibilité • Qualité de l'eau • Rétrofiltration

Il est aussi établi que l'albumine, le fibrinogène, la ferritine et la protéine C réactive (CRP), témoins de la phase aiguë de l'inflammation, sont des facteurs de risque d'évènement cardiovasculaire chez l'IRC (Guerin et London, 2001, Beaudreuil *et al.*, 2008).

Les causes de l'inflammation sont multifactorielles dont certaines sont spécifiques au traitement dialytique. La bio-compatibilité de la membrane de dialyse et la contamination possible du dialysat par des fragments d'endotoxines bactériennes sont des facteurs susceptibles de déclencher l'activation des cellules phagocytaires et la génération consécutive d'oxydants.

L'hémodialyse à l'aide de membranes bio-incompatibles a été impliquée comme une cause potentielle d'induction de l'inflammation chez les patients atteints d'IRC. D'autres auteurs suggèrent que la dialyse, même avec des membranes biocompatibles peut entraîner une activation de la réponse de phase aiguë (Kaysen, 2000).

II.5.5. Rôle de la contamination microbienne de l'eau d'hémodialyse.

Les levures, champignons filamenteux et bactéries naturellement présent dans l'eau courante, peuvent polluer l'eau utilisée en hémodialyse. Il est courant de retrouver des bactéries Gram négatif, ou des mycobactéries atypiques (Tableau III) (**Bolan et al., 1985 ; Drouineau et al., 2006**).

Des substances biologiquement actives sécrétées par les bactéries vivantes, comme les exotoxines, ou des produits de lyse bactérienne, comme les endotoxines ou les peptidoglycanes, peuvent se retrouver dans l'eau et les liquides de dialyse. Il est possible de retrouver de fortes concentrations de ces substances bactériennes même si la contamination bactérienne est faible. Elles ont la capacité de pénétrer la membrane de dialyse et d'activer la production de cytokines une fois dans le sang.

Tableau III: Exemple des microorganismes pouvant être retrouvés dans les eaux de dialyse (**Dialysis-associated complications and their control, 2007**)

Bactéries Gram négative	Mycobactéries non tuberculeuses	Champignons
<i>Pseudomonass spp</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Candidat albican</i>
<i>Flavobacterium spp</i>	<i>Mycobacterium abseccus</i>	<i>Candidat parapsilosis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Mycobacterium mycogenicum</i>	<i>Phialemonium curvatum</i>
<i>Klesiella pneumoniae</i>	<i>Mycobacterium gordonea</i>	
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Serratia liquefaciens</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

Il est vraisemblable que la contamination microbienne de l'eau pour hémodialyse pourrait provenir du circuit hydraulique de générateurs insuffisamment désinfectés sur lequel s'est formé et développé un biofilm avec un relargage intempestif de germes et d'endotoxines. Malgré la présence d'endotoxines dans le dialysat à différentes concentrations, les réactions cliniques adverses sont relativement peu fréquentes et d'intensité variable. Elles dépendent de la réactivité du sujet, laquelle n'est pas la même chez chaque individu (**Man, 2007**)

II.5.5.1. Contamination par les bactéries

De nombreuses études ont tenté de renseigner le type de microorganismes pouvant se développer dans le dialysat (Tableau IV). E. Klein et son équipe, dans les années 1990, ont réalisé une étude sur 51 centres américains sur les risques potentiels d'une infection bactérienne ou fongique liées à l'hémodialyse. Cette étude a démontré que les bactéries retrouvées dans les échantillons étaient presque exclusivement des bactéries Gram négatives, dont 50% appartiennent au genre *Pseudomonas* (Klein *et al.*, 1990).

Tableau IV: Liste de bactéries pouvant être retrouvées dans les différentes qualités d'eau (Klein *et al.*, 1990).

Bactéries	Eau potable	Eau adoucissant, Eau deionisée	Dialysat
Gram positive	<i>Bacillus sp</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Bacillus sp</i>
		<i>Corynebacterium sp</i>	
		<i>Micrococcus sp</i>	
		<i>Staphylococcus sp</i>	
Gram négative	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Eschericia coli</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
		<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Flavobacter sp</i>
		<i>Flavobacter sp</i>	<i>Acinetobacter sp</i>
		<i>Serratia sp</i>	<i>Alcaligenes sp</i>
		<i>Achromobacter sp</i>	<i>Achromobacter sp</i>
		<i>Aerobacter sp</i>	<i>Aeromonas sp</i>
		<i>Alcaligenes sp</i>	<i>Xanthomonas sp</i>
			<i>Serratia sp</i>
			<i>Moraxella sp</i>
			<i>Klebsiella sp</i>
		<i>Enterobacter cloacae</i>	
Anaérobique	<i>Mycobacter sp</i>	<i>Clostridium sp</i>	<i>Mycobacteria chelonei</i>
		<i>Mycobacter sp</i>	

Les bactéries retrouvées dans l'eau potable (« tap water ») du genre *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*... n'empêchant par une eau d'être déclarée « propre à la consommation humaine » (« qui est définie comme bactériologiquement pure si dépourvue de bactéries intestinales ») influencent par contre considérablement la qualité de l'eau de dialyse (**Cartizone, 1999**)

Les échangeurs ioniques (adoucisseurs et deionisateurs) et les filtres à charbon sont le lieu de prédilection des bactéries gram négatives, qui vont se développer considérablement. Naît ainsi la possibilité d'une contamination de l'eau traitée et du dialysat, en cas de défaillance du système de traitement de l'eau.

Contrairement au risque bactérien, les risques viraux et fongiques liés à la qualité de l'eau sont plus difficilement évalués.

II.5.5.2. Les sources de contamination de l'eau d'hémodialyse

Les sources possibles de contamination microbienne du liquide de dialysat sont :

- L'approvisionnement en eau provenant du réseau municipal ;
- Un traitement d'eau inadapté (ex : cuves de stockage de l'eau favorisant la prolifération bactérienne) ;
- Une défaillance du système de traitement d'eau (ex : filtre bouché ou abîmé) ;
- Le type d'appareil de dialyse utilisé ;
- Un défaut dans la désinfection des appareils et du réseau de distribution du centre de dialyse ;
- Une mauvaise manipulation et un non-respect des normes d'hygiène par les professionnels de santé.

II.5.5.3. Exigence bactériologique du dialysat

Le taux de bactéries doit être inférieur à 100 UFC/ml (**NF S93-315, 2008**). Pour l'analyse, il est conseillé de recueillir un échantillon de 100ml de dialysat affluent (en amont de l'hémodialyseur). Il est recommandé de procéder à un contrôle bactériologique du dialysat au minimum une fois par an, voire plus si cela s'avère nécessaire compte tenu de l'analyse de risque menée par l'utilisateur.

II.5.5.4. Exigence bactériologique du dialysat ultra pur

Le taux de bactéries doit être inférieur à 100 UFC/l (NF S93-315, 2008). Pour l'analyse, il est conseillé de recueillir un échantillon de 100 ml de dialysat affluent (en amont de l'hémodialyseur). Le taux de bactéries doit être inférieur à 1000 UFC/100 ml.

II.5.5.5. Méthode de détection des contaminants bactériens des eaux pour hémodialyse

➤ **La culture bactérienne**

La technique de mise en culture bactérienne reste une méthode de référence qui repose sur trois paramètres : le milieu gélosé utilisé, le temps et la température d'incubation. Afin d'évaluer efficacement la contamination, il est nécessaire d'adapter ces trois conditions à l'échantillon étudié. Bien entendu, il faut que le prélèvement se fasse dans des conditions d'aseptie complète.

Il existe deux méthodes d'évaluation de la contamination de l'échantillon (NF S93-315, 2008) :

- (A) Soit on dépose un volume de 100 à 200 µL du prélèvement à l'aide d'une pipette directement à la surface de la gélose, puis on effectue le dénombrement des colonies à la surface de la gélose après incubation. Cette méthode est adaptée aux échantillons avec une charge moyenne en microorganismes, comme dans le cas de l'eau purifiée (seuil 100 UFC/ml) ;
- (B) Soit on filtre, sur une membrane à 0,45 µm, l'échantillon de 10 mL à 1000 mL, puis on dépose cette membrane sur gélose et on effectue, après incubation, le dénombrement des colonies (figure 14). Cette technique est privilégiée par la Pharmacopée Européenne pour l'eau hautement purifiée, puisque plus adaptée aux échantillons à charge faible en microorganismes (seuil 1000 UFC/100 mL).

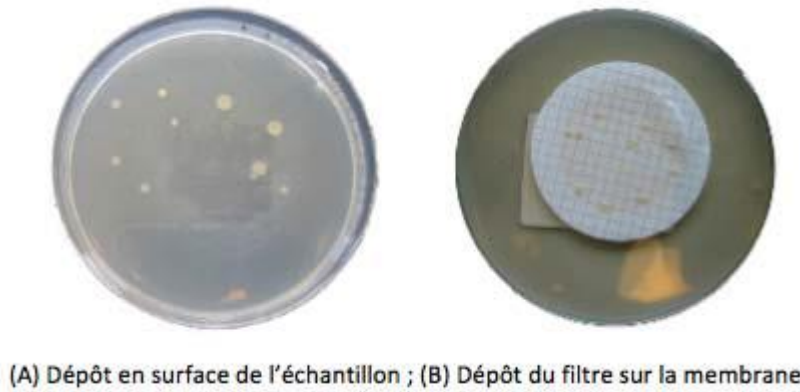


Figure 12: Colonies formées sur une gélose R2A après incubation de 7 jours à 20°C (Blanc., 2012)

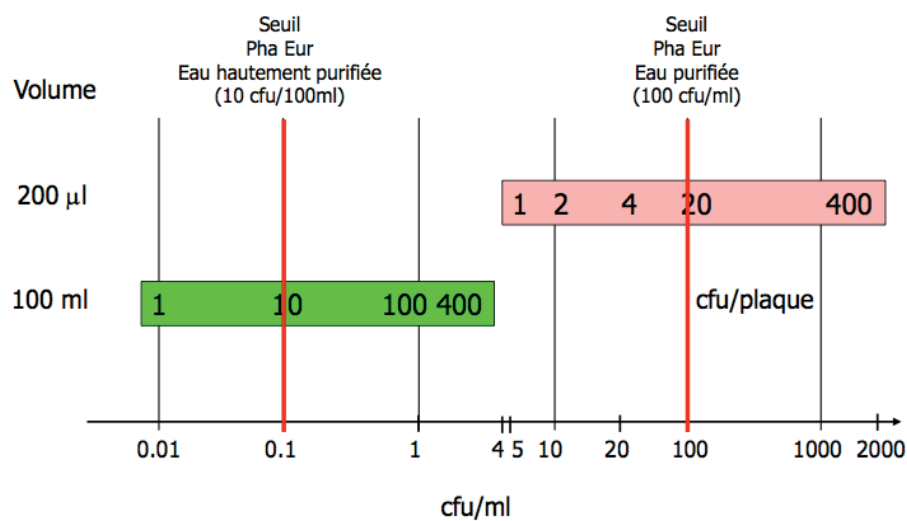


Figure 13: Volume d'eau à analyser en fonction de la qualité de l'échantillon (eau hautement purifiée ou eau purifiée) (Blanc, 2012)

▪ Le milieu Gélose

Les microorganismes retrouvés dans l'eau ont des besoins énergétiques faibles. La gélose de culture utilisée doit répondre aux besoins de ces bactéries, c'est-à-dire « pauvre ». Selon la norme ISO 13959 :2009, les géloses Reasoner's Agar n°2 (R2A) et Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA) sont celles les mieux adaptées aux microorganismes des milieux aqueux. Un milieu riche sous-estime considérablement la contamination bactérienne, puisqu'une bactérie habituée à un environnement pauvre verra son comportement changé (exemple de la « gélose au sang », Figure 16). La Tryptone Soja Agar (TSA) était autrefois beaucoup utilisée, mais elle s'est révélée nettement moins sensible que les milieux R2A et TGEA (Gambro., 2010 ; Saito., 2011)

▪ La température d'incubation

La température d'incubation doit correspondre à celle de prélèvement de l'échantillon. Comme la température de la boucle de l'eau de dialyse est généralement comprise entre 15 et 25°C, il est recommandé (d'après la norme ISO 13959 :2009) l'incubation entre 17 et 23°C (ou à température ambiante).

▪ Le temps d'incubation

Le temps optimal pour la température d'incubation pour les géloses R2A et TGEA est de 7 jours à 17-23°C. Les microorganismes aqueux requièrent un temps de développement long, puisqu'ils disposent de peu de nutriment et d'une température basée dans leur environnement naturel. De plus, afin de maintenir le taux d'humidité, il est conseillé de protéger les géloses de l'évaporation de l'eau, en les emballant par exemple dans les poches de plastique.



Figure 14: Essais de cultures d'un même échantillon d'eau sur 4 géloses différentes pendant 7 jours entre 17 et 23°C (Gambro, 2010 ; Saito, 2011)

II.5.5.6. Effet d'une mauvaise qualité bactériologique d'eau pour hémodialyse

Les complications liées à une eau de dialyse de qualité mauvaise peuvent être catégorisées selon la durée de leurs manifestations : A court terme, le passage de microorganismes ou produits de ces derniers dans le sang du patient peut être à l'origine de réactions pyrogènes (frissons, myalgies, fièvre, nausée, hypotension) pouvant aller jusqu'au choc. Ces réactions débutent généralement en cours de séance de dialyse. A long terme, la stimulation répétitive des monocytes par des produits microbiens est à l'origine d'une production chronique de médiateurs de l'inflammation ou cytokines. Ces substances (TNF α , IL-1, IL-6) sont elles-mêmes responsables d'une production hépatique de protéine C-réactive (CRP) et de bêta-2-microglobuline pouvant aboutir à une amyloïdose et à un stress oxydatif (**Santos *et al.*, 2000**). A l'inverse, certaines protéines comme l'albumine diminuent sous l'effet de l'inflammation chronique et plusieurs études ont montré que l'hypoalbuminémie prédit la mortalité chez les patients dialysés. (**Cousin *et al.*, 1999**).

II.5.6. Déficit chronique en défense anti-oxydante :

Les patients hémodialysés présentent des concentrations en vitamine E, C et GSH diminuées (**Cachofeiro *et al.*, 2008 ; Kao *et al.*, 2010**). La vitamine C est effectivement dialysée et son élimination doit être compensée par supplémentation alimentaire. Les activités diminuées de la vitamine E et du GSH sont expliquées par la forte concentration d'oxydants qui épuisent les capacités antioxydantes de l'organisme.

❖ Autres facteurs

- Certains traitements adjuvants à l'hémodialyse pourraient favoriser le Stress Oxydant (SO) ; on peut citer en particulier le traitement par érythropoïétine qui a été suspectée d'aggraver l'état pro-oxydant des hémodialysés du fait d'une stimulation accrue des polynucléaires neutrophiles, ou encore par le fer pouvant favoriser la formation de radical hydroxyle par la réaction de Fenton.
- Il existe aussi une production accrue de monoxyde d'azote (NO) au cours de l'hémodialyse, à proximité du radical superoxyde, le NO peut être à l'origine de la formation du peroxydrite ; puissant agent oxydant.

II.5.7. Implication clinique du stress oxydant chez l'hémodialysé

En agissant en synergie avec l'inflammation, le stress oxydant paraît être impliqué dans le développement des mêmes complications à long terme, y compris la malnutrition,

l'amylose, l'anémie, l'athérosclérose et les complications ostéo-articulaires. Actuellement, on parle de syndrome de stress oxydant des hémodialysés chroniques, (**Charriere et al., 2009**).

II.5.7.1. Athérosclérose et complications

Les complications cardio-vasculaires représentent la principale cause de morbi-mortalité chez le dialysé chronique. En effet, le taux de mortalité de cause cardiovasculaire est 10 à 20 fois supérieur de celui de la population générale (**Filiopoulos et al., 2009**). Actuellement, il a été démontré que les *Low Density Lipoprotein* (LDL) seront oxydés par la myeloperoxidase leucocytaire, les *High Density Lipoprotein* (HDL), qui doivent normalement servir comme facteur réducteur, deviennent dysfonctionnels suite au remplacement de l'apoA1 par du sérum amyloïde A. Ainsi les LDL oxydées deviennent athérogènes.

Plusieurs études suggèrent une relation étroite entre l'épaisseur de l'intima carotidienne et les taux plasmatiques des marqueurs du stress oxydant (**Morena et al., 2007**). Les fonctions cellulaires vitales sont modulées sous l'influence du stress oxydant, entraînant ainsi une altération de l'endothélium vasculaire et pouvant expliquer la fréquence des complications cardio-vasculaires chez les hémodialysés chroniques (**Beaudeau et al., 2006**).

II.5.7.2. Malnutrition

La membrane de dialyse est directement impliquée dans un catabolisme protidique accéléré, durant les jours d'hémodialyse : la mesure d'acides aminés libérés au contact de la membrane, a montré une libération équivalente à la dégradation de 12 à 20 g de protéines musculaires durant 150 minutes de dialyse. Cette dégradation serait favorisée par l'activation des monocytes et la sécrétion de cytokines pro inflammatoires. Les principaux marqueurs de la dénutrition sont l'albumine, la préalbumine, le taux d'urée et de la créatinine pré dialytiques. Le stress oxydatif pourrait ainsi jouer un rôle dans la malnutrition tel que rapporté dans le syndrome de *Malnutrition Inflammation Anémie* (MIA) (**Beaudeau et al., 2006**).

II.5.7.3. Amylose à β 2-microglobuline

L'amylose à β 2microglobuline, ou amylose dialytique, est une des complications les plus invalidantes de la dialyse à long terme. L'accumulation et la polymérisation de cette molécule sont liées à un ensemble de circonstances particulières rencontrées lors de l'hémodialyse :

- Son métabolisme exclusivement rénal est diminué ;
- L'accumulation s'effectue tout au long de la période d'insuffisance rénale, puis durant l'hémodialyse du fait de la faible clairance de cette molécule ;

- Sa synthèse est stimulée par l'état inflammatoire persistant que provoquent l'urémie chronique et la bio-incompatibilité membranaire.

La polymérisation de la β -2-microglobuline est favorisée par la forte concentration en protéases et du fait d'une dénaturation de la protéine suite à la formation des Acides Gras Polyinsaturés et dont la présence au niveau des dépôts amyloïdes a été démontrée par **Miyata et al., (2005)**. De même, **Senji Okuno et al., (2009)** ont démontré que le taux sérique de la β -2-microglobuline est un facteur prédictif de mortalité chez les dialysés chroniques.

II.5.7.4. Anémie

L'anémie est une complication assez fréquente chez les hémodialysés chroniques. En plus du déficit en érythropoïétine, par perte du principal organe de biosynthèse, le stress oxydant peut contribuer à l'aggravation de l'anémie chez ces patients ; plusieurs mécanismes sont suggérés (**Beaudeau et al., 2006**).

- Le stress oxydant raccourcit la survie des globules rouges chez les hémodialysés chroniques ; l'élévation du taux de MDA dans les érythrocytes des patients est couplée à une faible teneur des cellules en vitamine E.
- Perte de résistance mécanique et osmotique des érythrocytes par oxydation des lipides membranaires.
- La surcharge cellulaire en fer qui est fréquemment associée est à l'origine d'un état de pro-oxydant délétère pour les cellules (**Kato et al., 2003**).

CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. TYPE D'ÉTUDE

Il s'agissait d'une étude cas témoin

II. LIEU DE L'ÉTUDE

Les patients ont été recrutés dans les services d'hémodialyse du Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé et à l'Hôpital Général de Douala. Ce sont des centres de référence spécialisés dans la prise en charge des personnes en insuffisance rénale chronique.

Le dosage des différents paramètres biochimiques a été effectué au Centre de Recherche en Alimentation et Nutrition (CRAN) de l'Institut de Recherche Médicales et d'Etude des Plantes Médicinales (IMPM) et au laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecines et des Sciences Biomédicales (FMSB) de l'Université de Yaoundé 1. Les analyses bactériologiques quant à elles, ont été effectuées au laboratoire de microbiologie du CHUY sur l'appui technique du laboratoire de contrôle des eaux d'hémodialyse de l'hôpital de la Conception de Marseille, France.

III. DURÉE DE L'ÉTUDE

L'étude s'est étendue sur une période de 12 mois, allant de Juin 2015 à Mai 2016.

IV. POPULATION CIBLE

Notre population cible était constituée des patients de deux sexes hémodialysés dans les centres d'hémodialyse retenus pour l'étude. Un groupe témoin correspondant à des volontaires sains a également été recruté dans la ville de Yaoundé et Douala.

V. CRITÈRE DE SÉLECTION

V.1. Critère d'inclusion

Dans notre étude, ont été inclus les patients des deux sexes, hémodialysés depuis plus d'un mois, âgés de 20 ans et plus, consentant de participer à l'étude et dont le profil sérologique hépatite virale C et B, et VIH était négatif.

V.2. Critère de non inclusion

Les patients non inclus dans l'étude ont été ceux consommant de l'alcool ou le tabac, les patients diabétiques ou ceux ne consentant pas de participer à l'étude. Patients dont le profil sérologique hépatite virale C et B, et VIH était positif.

VI. CONSIDÉRATION ÉTHIQUE

La clairance éthique N°709 du 17 Décembre 2015 (Annexe 1), délivrée par le Comité National d'Éthique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH) a été obtenue pour

l'étude. Une autorisation de recherche N°191 AR/MINSANTE/HGD/DM/07/15 (Annexe 2) délivrée par le service Médical de l'HGD a été également obtenue pour l'étude, de même qu'une autorisation de la Direction Générale du CHUY (Annexe 3). Une fiche de consentement (Annexe 5) préalable dûment signé par chaque patient ayant participé à l'étude a été également obtenue avant toute inclusion dans l'étude. Aucun patient n'a participé financièrement à la réalisation des tests biologiques. Une enquête préliminaire visant à voir si les patients volontaires participants à l'étude respectaient les critères d'inclusion (voir fiche d'enquête à l'annexe 6) a été réalisée avant chaque recrutement.

VII. ÉCHANTILLONNAGE

Un échantillonnage de convenance a été effectué dans le cadre de cette étude. Pour cela, un nombre total de 80 patients dialysés deux fois par semaine à raison de 4h la séance a été recruté dans deux centres de référence d'hémodialyse retenus pour l'étude ; soit 46 patients (21 hommes et 25 femmes) au service d'hémodialyse de l'Hôpital Général de Douala (HGD) et 34 patients (24 hommes et 10 femmes) au service d'hémodialyse du Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé (CHUY). Un groupe témoin constitué de 80 personnes correspondant aux volontaires sains a également été recruté ; soit 46 personnes (21 hommes et 25 femmes) recrutées dans la ville de Douala et 34 personnes (24 hommes et 10 femmes) recrutées dans la ville de Yaoundé.

VIII. PROCÉDURE DE COLLECTE DES ÉCHANTILLONS

VIII.1. Recueil, transport et stockage des échantillons

- **Recueil**

Chez les patients hémodialysés, les prélèvements sanguins ont été recueillis dans des tubes sans anticoagulants et héparinés au bout de l'aiguille à fistule avant et après la dialyse. Chez les personnes saines, chaque prélèvement s'est fait à jeûn au niveau de la région antérieure de l'avant-bras avec un garrot et une aiguille vacutainer. Les prélèvements d'échantillons d'eau ont été réalisés dans des conditions d'asepsie rigoureuses. Après désinfection des sites de prélèvement avec une solution hydro-alcoolique, nous avons laissé l'eau couler 1 à 2 minutes afin que l'échantillon ne soit pas contaminé par des traces de désinfectant, puis recueilli dans des flacons stériles à usage unique. (NF S93-315, 2008)

- **Traitement des spécimens et transport.**

Après centrifugation du sang à 3000 tours/minute (971 g) pendant 10 minutes, le sérum et le plasma ont été recueillis et transférés dans des tubes Eppendorf puis transportés,

enveloppés de papier aluminium dans une glacière contenant des accumulateurs au Centre de Recherche en Alimentation et Nutrition de l'Institut de Recherche Médicales et d'Étude des Plantes Médicinales (IMPM) où ils ont été congelés à -20°C . Les flacons d'échantillons d'eau ont été lisiblement étiquetés et transportés sans délai au laboratoire, accompagnés d'une fiche portant tous les renseignements nécessaires (date, heure et site de prélèvement) pour analyse immédiat.

IX. ANALYSES DES ÉCHANTILLONS

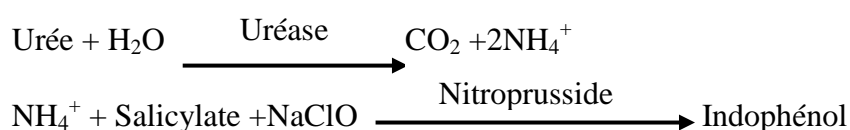
IX.1. Détermination des paramètres reflétant les capacités épuratives de la membrane d'hémodialyse

IX.1.1. Dosage de l'urée (kit Cypress diagnostics, Belgique)

Test enzymatique et colorimétrique.

i. Principe

L'urée est hydrolysée en ammoniac et CO_2 . L'ammoniac réagit avec le salicylate et l'hypochlorite pour former l'indophénol vert. La couleur de celle-ci est proportionnelle à la concentration de l'urée. Lecture de la densité optique à 580 nm.



ii. Mode opératoire

Une série de 3 tubes à essai : blanc, standard et test a été constituée. Dans chaque tube, 1 ml du mélange composé de 500 μl du réactif **R1** (50 mmol/l de phosphate pH 6,5, 2 mmol/l d'EDTA, 400 mmol/l de sodium salicylate et 10 mmol/l de sodium nitroprusiate) et 500 μl du réactif **R2** (140 mmol/l de sodium hypochlorite et 150 mmol/l de sodium hydroxide) a été ajouté puis, 10 μl de standard ou de serum ont été introduits respectivement dans les tubes standard et test. Après mélange et incubation à 37°C pendant 5 minutes, 1 ml du réactif **R3** (30000 U/l d'urease) a été ajouté dans les tous tubes. Après une deuxième incubation comme précédemment, l'absorbance du mélange réactionnel a été lue à 580 nm contre le blanc contenant plutôt 10 μl d'eau distillée.

iii. Calcul

$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{\text{Abs Echantillon} - \text{Abs Blanc}}{\text{Abs Standard} - \text{Abs Blanc}} \times 50 \text{ (conc. standard)}$$

IX.1.2. Dosage de la créatinine (kit Cypress diagnostics, Belgique)

Test cinétique. Jaffe. Sans déprotéinisation

i. Principe

La créatinine forme un complexe rouge dans une solution picrate basique comme décrit par Jaffé. La variation d'absorbance, à de temps prédéterminés pendant la conversion, est proportionnelle à la concentration de la créatinine dans l'échantillon. Les intervalles de temps optés pour la mesure évitent les interférences d'autres constituants de sérum. Lecture de la densité optique à 505 nm.

ii. Mode opératoire

Une série de 3 tubes à essai : blanc, standard et test a été constituée. Dans chaque tube, 1 ml du mélange composé de 500 µl du réactif R1 (25 mmol/l de picrate) et 500 µl du réactif R2 (0,29 mol/l d'hydroxide de sodium) a été ajouté puis, 100 µl de standard ou de sérum ont été introduits respectivement dans les tubes standards et test. Après mélange, l'absorbance du mélange réactionnel a été lue à 505 nm après 30 secondes (abs1) et après 90 secondes (abs2) contre le blanc contenant plutôt 100 µl d'eau distillée.

iii. Calcul

Calculer la $\Delta \text{Abs.} = (\text{Abs.2} - \text{Abs.1})$.

Sérum et plasma : Créatinine (mg/dl) = $\frac{\Delta \text{Abs Echant}}{\Delta \text{Abs Stand}} \times 2 (\text{conc. Stand.})$

IX.1.3. Débit de filtration glomérulaire

Le Débit de Filtration Glomérulaire (DFG) a été estimé par la méthode de **Levey et al.,(1999)** « the *simplified modification of diet in renal disease* (MDRD) » qui est une équation qui prend en compte le taux de créatinine récent, l'âge au moment du prélèvement, le sexe et la race.

$$\text{DFG (mL/min/1,73 m}^2) = 186,3 \times (\text{créatinémie en mg/dl})^{-1.154} \times (\text{âge})^{-0.203} \times k$$

K= 0,742 chez la femme, K= 1 chez l'homme, K= 1,21 chez les sujets d'origine Africaine

Pour déterminer le degré de l'atteinte rénale chronique, nous avons établi une estimation de la VFG à l'aide de l'équation ci-dessus. L'équation de MDRD est utilisée à cause de sa précision et du fait qu'elle fasse moins de biais comparée aux autres méthodes couramment utilisées. Le taux de créatinine récent, l'âge au moment du prélèvement, le sexe

et la race sont utilisés pour le calcul de la VFG par l'équation MDRD. Les patients ont été classés selon les stades suivants d'atteinte rénale chronique (ARC) : **Stade 1**, VFG ≥ 90 ml/min/1.73 m² ; **Stade 2**, VFG 60-89 ml/min/1.73 m² ; **Stade 3**, VFG 30-59 ml/min/1.73 m² ; **Stade 4**, VFG 15-29 ml/min/1.73 m² ; **Stade 5**, VFG < 15 ml/min/1.73 m² (**National Kidney Foundation, 2002**).

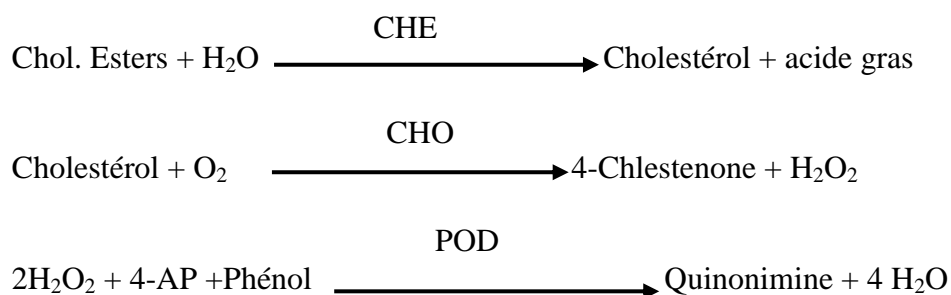
IX.2. Analyse du profil lipidique.

IX.2.1. Détermination des teneurs sériques en cholestérol total (kit Cypress diagnostics, Belgique)

Test enzymatique-Colorimétrique

i. Principe

Le cholestérol et ses esters sont libérés des lipoprotéines par des détergents. L'estérase de cholestérol hydrolyse les esters et H₂O₂ est formé dans l'oxydation enzymatique suivante du cholestérol par la cholestérol-oxydase selon l'équation suivante. Dans la dernière réaction, un composant coloré rouge dont l'intensité est proportionnelle à la concentration du cholestérol. Lecture de la longueur d'onde à 505 nm.



La production du quinonimine rouge est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon.

CHE = Cholesterol esterase ; **CHO** = Cholesterol oxidase ; **POD** = Peroxidase

ii. Mode opératoire

Une série de 3 tubes à essai : blanc, standard et test a été constituée. Dans chaque tube, 1 ml du mélange composé de 500 µl du reactif R1 (90 mmol/l de pipes pH 6,5, et 26 mmol/l de phenol) et 500 µl du reactif R2 (125 mmol/l de peroxydase, 300 U/l de cholesterol ésterase, 300 U/l de cholesterol oxydase et 0,4 mmol/l de 4-aminophenazone) a été ajouté puis, 10 µl de standard ou de serum ont été introduits respectivement dans les tubes standard et test.

Après mélange et incubation à 37°C pendant 5 minutes, l'absorbance du mélange réactionnel a été lue à 505 nm contre le blanc contenant plutôt 10 µl d'eau distillée.

iii. Calcul

Cholestérol. (mg/dl) = (Abs Echant. /Abs Stand.) x 200(Conc. Stand.)

Facteur de conversion : mg/dl x 0,0258 = mmol/l

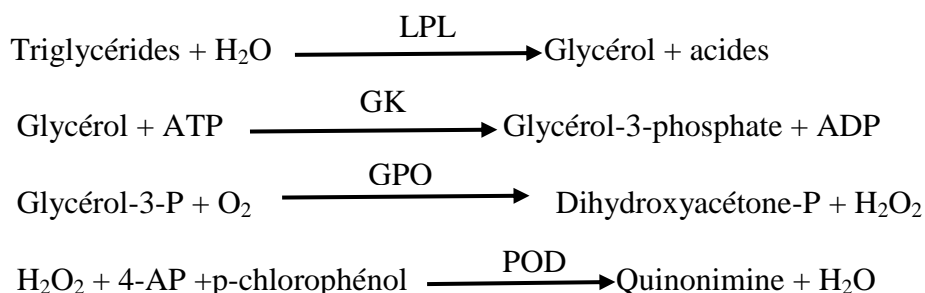
IX.2.2. Détermination des teneurs sériques en Triglycérides (kit Cypress diagnostic, Belgique)

Test enzymatique et colorimétrique

i. Principe

Les triglycérides sont hydrolysés enzymatiquement en glycérol et acides gras. Ce glycérol entre en réaction avec glycérol-kinase. Le glycérol-3-phosphate résultant est ensuite transformé en glycérol-3-phosphate oxydase, libérant de l'eau oxygénée (H₂O₂).

La concentration d'H₂O₂ est déterminée par la réaction de Trinder, qui entraîne la formation d'un dérivé coloré rouge. L'intensité de la couleur formée à la longueur d'onde de 505 nm est proportionnelle à la concentration de triglycérides de l'échantillon.



LPL = Lipoprotéine lipase ; **GK** = glycerol kinase ; **GPO** = Glycérol-3-oxydase

AP = Aminophénazone ; **POD** = Peroxydase

ii. Mode opératoire

Une série de 3 tubes à essai : blanc, standard et test a été constituée. Dans chaque tube, 1 ml d'une solution de mélange réactif (50 mmol/l de pipes pH 7, 1 mmol/l de DHBS, 1500 U/l de LPL, 700 U/l de GK, 1500 U/l de GPO, 2000 U/l de POD, 0,8 mmol/l de 4-aminoantipyrine et 1,5 mmol/l d'ATP) a été ajouté puis, 10 µl de standard ou de serum ont été introduits respectivement dans les tubes standard et test. Après mélange et incubation à 37°C

pendant 5 minutes, l'absorbance du mélange réactionnel a été lue à 510 nm contre le blanc contenant plutôt 10 µl d'eau distillée.

iii. Calcul

$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{Abs Echantillon} - \text{Abs Blanc}}{\text{Abs Standard} - \text{Abs Blanc}} \times 200 \text{ (stand. conc.)}$$

Facteur de conversion : mg/dl x 0,0113 = mmol/l.

IX.2.3. Détermination des teneurs sériques en HDL (kit Cypress diagnostics, Belgique)

i. Principe

Les lipoprotéines de faible densité (LDL et VLDL) sont précipitées spécifiquement par un mélange d'acide phosphotungstique et ions magnésiums et peuvent ainsi être séparés par centrifugation, les lipoprotéines à haute densité (HDL) restent en suspension. La détermination de HDL se fait en utilisant un surnageant clair.

ii. Mode Opérateur

Dans un tube à essai, 1 ml de serum ont été ajoutée dans 1ml d'une solution de reactif de precipitation constitue de 14 mmol/l d'acide phosphotungstique et 2 mmol/l de chlorure de magnesium. Après passage au vortex, le mélange à été laissé au repos pendant 10 minutes à température ambiante. Après centrifugation à 4000 trs/ min pendant 20 minutes, le surnageant a été prélevé et le cholestérol HDL mesuré en suivant les instructions du reactif de cholestérol.

iii. Expression des Résultats

$$[\text{Cholestérol HDL}](\text{mg/dL}) = \frac{\text{Abs Echant} - \text{Abs Blanc}}{\text{Abs Standard} - \text{Abs Blanc}} \times 50(\text{standard conc})$$

IX.2.4. Détermination des teneurs sériques en LDL

La concentration en cholestérol LDL sérique a été déterminée par la méthode de différence selon l'équation de Friedewald et *al.*, (1972).

$$\text{Cholestérol LDL} = \text{Cholestérol total} - \text{Cholestérol HDL} - \frac{\text{Triglycérides}}{5}$$

IX.2.5. Détermination de l'indice d'arthérogénicité

L'indice d'arthérogénicité a été déterminé par le rapport cholestérol total sur cholestérol HDL (CT/C-HDL).

IX.3. Recherche des marqueurs de l'inflammation et du statut oxydant avant et après une séance d'hémodialyse.

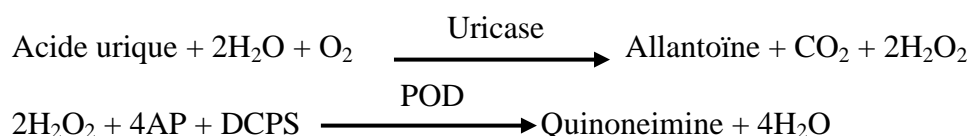
IX.3.1. Recherche des marqueurs de l'inflammation

IX.3.1.1. Dosage de l'Acide urique (kit Cypress diagnostics Belgique)

Test enzymatique et colorimétrique

i. Principe

L'oxydation de l'acide urique par l'uricase produit l'allantoïne et le peroxyde d'hydrogène, lequel sous l'influence de peroxydase (POD), oxyde le 2-4 diclorophénol sulphonate (DCPS) et le 4-aminophénazone (AP) pour former un composant quinoneimine rouge. La quantité de quinoneimine formée à la longueur d'onde de 520 nm est proportionnelle à la concentration de l'acide urique.



ii. Mode opératoire

Une série de 3 tubes à essai : blanc, standard et test a été constituée. Dans chaque tube, 1 ml du mélange composé de 500 µl du reactif R1 (50 mmol/l de pipes pH 7, 1 mmol/l d'AP, 1000 U/l d'ascorbate oxidase et 3800 U/l de POD) et 500 µl du reactif R2 (50 mmol/l de pipes pH 7, 2,5 mmol/l de DCPS et 250 U/l d'uricase) a été ajouté puis, 25 µl de standard ou de serum ont été introduits respectivement dans les tubes standard et test. Après mélange et incubation à 37°C pendant 5 minutes, l'absorbance du mélange réactionnel a été lue à 520 nm contre le blanc contenant plutôt 25 µl d'eau distillée.

iii. Calcul

Acide urique (mg/dl) = (Abs Echant – Abs Blanc / Abs Stand – Abs Blanc) x 6 (conc. stand.)

IX.3.1.2. Dosage de l'albumine (kit Cypress diagnostics, Belgique)

Test colorimétrique « Bromocresol Green »

i. Principe

A pH 4,0, l'albumine se lie sélectivement au vert de bromocrésol. L'augmentation de l'absorbance à 630 nm du complexe albumine colorée est proportionnelle à la concentration de l'albumine

ii. Mode opératoire

Dans des tubes à essai, 5 µl de serum ont été ajoutés dans 1 ml d'une solution de 0,12 mmol/l de vert de bromocresol, pH 4. Après passage au vortex, le mélange a été incubé 10 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance était faite à 630 nm contre le blanc.

iii. Calcul

Albumine (g/dL) = (Abs Echant. / Abs Stand.) x 5 (conc. stand.)

IX.3.1.3. Détermination de la protéine réactive C (CRP) (kit Cypress diagnostics, Belgique)

i. Principe

Le réactif CRP est une suspension de particules de latex polystyrène recouvertes d'un antisérum spécifique anti-CRP humaine (fraction IgG). Une concentration égale ou supérieure à 6 mg/l de CRP dans un sérum non dilué génère une agglutination visible après mélange avec le réactif CRP.

ii. Mode opératoire

• Méthode qualitative

Laisser revenir les réactifs et les échantillons à température ambiante puis placer une goutte de contrôle positif (50µl) sur le puits 1 de la lame et une goutte de contrôle négatif (50µl) sur le puits 2 de la lame. Pipeter une goutte (50µl) de chaque sérum non dilué sur les puits suivants. Résuspendre le réactif CRP par agitation douce et placer une goutte (50µl) sur chaque puits puis à l'aide d'un agitateur, homogénéiser le mélange réactionnel dans chaque puits en étalant sur toute la surface du puits. Changer d'agitateur pour chaque échantillon afin d'éliminer les contaminations de puits à puits. Mélanger ensuite par rotation de la lame pendant deux minutes et lire immédiatement sous une lumière directe.

iii. Méthode semi-quantitative

Laisser revenir les réactifs et les échantillons à température ambiante et réaliser des dilutions séries double des échantillons dans une solution saline à 9g/l. Procéder pour chaque dilution comme dans la méthode qualitative.

Tableau V: Dilutions séries double des échantillons pour quantification CRP

Dilutions	1/2	1/4	1/8
Sérum d'échantillon	100µl	↳	
Solution saline à 9 g/l	100µl	100µl	100µl
	↳	100µl	
		↳	100µl
Volume d'échantillon	50µl	50µl	50µl

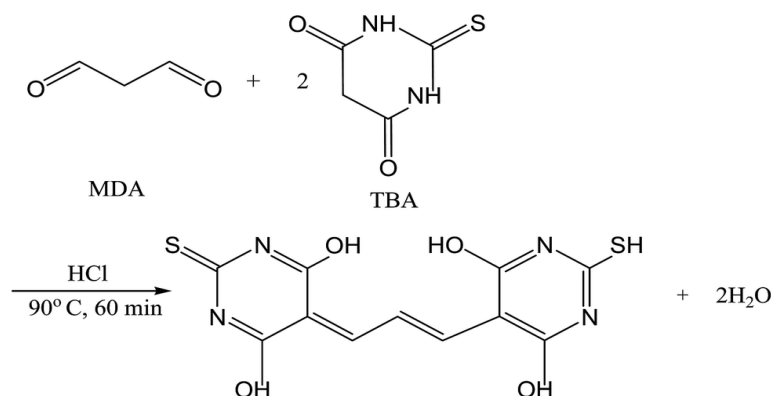
iv. Resultats et interpretation

Une réaction négative est indiquée par une suspension laiteuse uniforme, ne présentant aucune agglutination, comme observée avec le contrôle négatif. La présence d'une agglutination visible est synonyme de réaction positive.

IX.3.2. Evaluation du niveau d'oxydation des lipides sériques : dosage du MDA (Yagi, 1976)

i. Principe

Le dosage du malondialdéhyde (MDA) se fait par la méthode des TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde issu de la décomposition des hydroperoxydes d'acides gras réagissent avec l'aide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose dont la concentration est déterminée par la lecture de l'absorbance à 532 nm.



ii. Mode opératoire

Il Consistait à pipeter dans les tubes à essai, 100 µl d'échantillon, 2 ml de réactif (mélange TBA-TCA-HCL) et boucher les tubes à l'aide d'un bouchon. Par la suite, le mélange a été chauffé au Bain Marie à 100°C pendant 15 minutes puis refroidir dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts. Le mélange a été centrifugé à 3000 tours/minutes (971 g) pendant 5 minutes et l'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm. Les résultats ont été exprimés en µmol/l

iii. Expression des résultats

La concentration du MDA a été déterminée en utilisant son coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon = 15\ 600\ M^{-1}\ cm^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en µmol/l.

$$[MDA] (\mu\text{mol/l}) = DO/\epsilon l \times 10^6$$

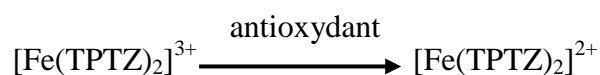
DO = Densité Optique; l = trajet optique = 1cm; $\epsilon_{MDA} = 15\ 600\ M^{-1}.cm^{-1}$

IX.3.3. Détermination de la défense antioxydant

IX.3.3.1. Détermination de la capacité antioxydant totale du sérum par la méthode de Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) (Benzie *et al.*, 1996)

i. Principe

Le principe est basé sur la méthode de Benzie et Strain, (1996). Cette méthode mesure la capacité des échantillons à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) à un pH acide (3.6). L'intensité de la couleur bleue formée par le tripydyltriazine ferreux et mesurée à 593 nm est proportionnelle au pouvoir antioxydant de l'échantillon.



ii. Mode opératoire

Dans une série de tubes à essai, on introduit respectivement 0,75 ml d'échantillon, 2 ml du réactif de FRAP (composition en annexe). Après incubation pendant 12 min à température ambiante, lecture au spectrophotomètre à 593 nm.

Tableau VI: Mode opératoire pour la détermination de la capacité anti-oxydante totale

Réactifs	Echantillons	
	Blanc	Essai
Sérum (µl)	-	75
Eau distillée (µl)	75	-
Réactif de FRAP (µl)	2000	2000
<ul style="list-style-type: none"> - Homogénéisation et incubé pendant 12 min, température ambiante - Lecture de l'absorbance à 593 nm 		

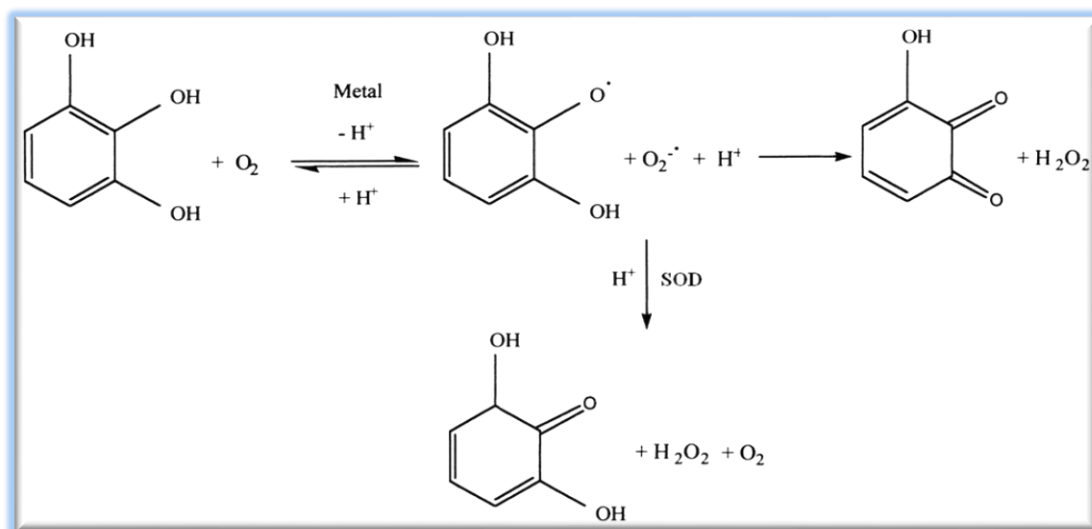
iii. Expression des résultats

Tracer la droite d'étalonnage $DO = f [Fe_2SO_4]$. Déterminer la concentration des échantillons en utilisant une équation de régression obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage (Annexe 17)

IX.3.3.2. Dosage du superoxyde dismutase (SOD) (Magnani *et al.*, 2000)

i. Principe

L'activité de la SOD est déterminée en utilisant une méthode simple et rapide, basée sur la capacité de l'enzyme à inhiber l'autoxydation du pyrogallol. L'auto-oxydation du pyrogallol en présence d'EDTA à un pH de 8,2 est de 50%. Le principe de cette méthode est basé sur la compétition entre l'auto-oxydation du pyrogallol par $O_2^{\bullet-}$ et la dismutation de ce radical par la SOD.

**Figure 15:** Mécanisme de l'auto-oxydation du Pyrogallol (Magnani *et al.*, 2000)

Les activités SOD sont exprimées en unités / ml. Une unité d'activité SOD étant définie comme la quantité d'enzyme requise pour provoquer une inhibition de 50% de l'autoxydation du pyrogallol.

ii. Mode opératoire.

On introduit dans un tube à essai 1 ml de tampon Tris-EDTA et 50 µl d'échantillon. Après agitation au vortex, lire l'absorption à la longueur d'onde de 420 nm à temps zéro et après 1 minute de l'addition de pyrogallol.

Tableau VII: Mode opératoire pour détermination de la SOD

Réactifs	Echantillons	
	Test (µl)	Contrôle (µl)
Serum	50	-
Tampon Tris-EDTA pH 8	1000	1000
Eau distillée	-	50
Pyrogallol (0.2 mM)	1000	1000

iii. Calcule de l'activité de la SOD

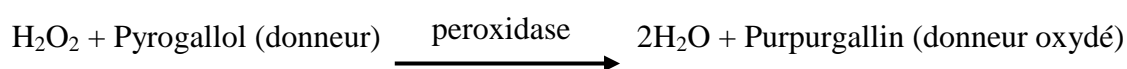
$$\% \text{ Inhibition de l'autoxydation du pyrogallol} = \frac{\Delta A_{\text{test}}}{\Delta A_{\text{contrôle}}} \times 100\%$$

$$\text{Activité SOD (U/ml)} = \frac{\% \text{ inhibition de l'autoxydation du pyrogallol}}{50\%}$$

IX.3.3.3. Dosage du glutathion peroxydase (Gadani *et al.*, 2009)

i. Principe

Le dosage du glutathion peroxydase par la méthode spectrophotométrique est basé sur la réaction suivante :



ii. Mode opératoire

Dans chaque tube a été introduit 2,1 ml d'eau distillée, 0,32 ml de tampon phosphate à pH 6, 100 µl d'échantillon et 0,32 ml de pyrogallol (0,5%) et la réaction est déclenchée en ajoutant 0,16 ml de peroxyde d'hydrogène (0,5%). Après homogénéisation immédiate, la DO est lue après 20 secondes et après 140 secondes à 420 nm.

Tableau VIII: Protocole de dosage du glutathion peroxydase

Réactifs	Echantillons	
	Blanc	Essai
Eau distillée (µl)	2100	2100
Tampon phosphate (100mM, pH, 6) (µl)	420	320
Solution de peroxyde d'hydrogène (0,5%) (µl)	160	160
Solution de pyrogallol (0.5%) (µl)	320	320
Serum (µl)		100
Homogénéisation, lire immédiatement la DO après 20 sec et après 140 sec à DO = 420nm		

iii. Expression des résultats

$$\text{Activité spécifique GPx} = \frac{(\text{Abs Echantillon} - \text{Abs Blanc})(3)(\text{df})}{(12)(0.1)}$$

Avec :

3 = volume de l'essai

12 = coefficient d'extinction du purpurogallin à 420 nm.

0,1 = volume d'enzyme utilisé

df = facteur de dilution

Cette activité était exprimée en UI/mg

IX.3.3.4. Dosage du glutathion réduit (Ellman, 1959)

i- Principe

L'acide 2,2-dithio-5,5'-dibenzoïque (DTNB) réagit avec les groupements SH du glutathion formant un complexe coloré jaune qui absorbe à la longueur d'onde de 412 nm.

ii- Mode opératoire

Pipeter 20 µl de sérum et 3 ml du réactif d'Ellman, puis mixer et incubé pendant 60 min à température ambiante. Lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc (sérum remplacé par le tampon phosphate).

iii- Expression des résultats

Calcul des concentrations suivant la formule :

$$C (\mu\text{mol/l}) = DO/\varepsilon l \quad (l= 1\text{cm}, \varepsilon_{\text{GSH}} = 13600\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$$

IX.3.3.5. Détermination de l'activité de la catalase sérique (Méthode de Sinha, 1972).**i. Principe**

Le dichromate est réduit à chaud par l'acide acétique en acétate de chrome, en présence du peroxyde d'hydrogène conduisant à la formation de l'acide chromique qui est un intermédiaire réactionnel instable. La densité optique à 530nm est proportionnelle à la concentration de H₂O₂ consommé.

ii. Mode opératoire

Dans chaque tube ont été introduit 0,9 ml de tampon phosphate, 0,1 ml d'échantillon et 0,4 ml de H₂O₂ pour déclencher la réaction. La réaction a été interrompue après 60 secondes par l'introduction de 2 ml d'acide dichromique et le mélange porté à ébullition pendant 10 minutes. La densité optique de l'acétate de chrome est déterminée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm.

Tableau IX : mode opératoire pour la détermination de l'activité de la Catalase

Réactifs	Echantillons	
	Blanc	Essai
Blanc, Essai	0	100
Tampon phosphate (µl)	1000	900
- Homogénéisation		
- Ajout du H₂O₂ pour déclencher la réaction		
H₂O₂ (µL)	400	400
- Arrêt de la réaction après 60 secondes par ajout du dichromate- acide acétique		
dichromate-acide acétique (µl)	2000	2000
- Homogénéisation		
- Chauffage dans de l'eau bouillante (100°C) pendant 10 minutes		
- Lecture de l'absorbance à 530 nm		

iii. Expression des résultats

Les résultats ont été obtenus à partir d'une courbe d'étalonnage (Annexe 16) réalisée à partir des données du tableau.

$$\text{Activité catalase} = \frac{\text{DO}}{1,5118 \times V_s \times C_{\text{protéines}}}$$

- UI = μmoles de H₂O₂ utilisé par minute
- DO = densité optique par minute
- C_{protéines} = concentration de protéines dans le sérum (mg/mL)
- V_s = Volume du sérum
- 1,5118 = pente obtenue à partir de la courbe d'étalonnage

IX.3.3.6. Dosage de la vitamine C plasmatique

La concentration de vitamine C (acide ascorbique) a été déterminée par la méthode spectrophotométrique d'Omayr *et al* (1979).

i- Réactifs :

- Réactif de TCA (acide trichloroacétique) à 6%
- Réactif de DNPH (dinitrophénylhydrazine)
- Thio-urée
- Acide sulfurique 85%

ii- Mode opératoire

Une solution de 1,5 ml de TCA à 6% a été ajoutée dans 0,5 ml de plasma puis centrifugé à 3500 tour/minute pendant 2 min. Le surnageant a été ensuite prélevé et mélangé avec 0,5 ml de réactif de 2,4-dinitrophénylhydrazine (2 g de DNPH et 4 g de thio-urée dans 100 ml d'acide sulfurique à 9N) et incubé à température ambiante pendant 3 h. Après incubation, 2,5 ml d'acide sulfurique refroidit dans de la glace ont été ajouté dans les tubes et la couleur développée lue à 530 nm après 30 mn.

iii- Expression des résultats

Les concentrations de vitamine C ont été déterminées en utilisant la courbe d'étalonnage (Annexe 20).

IX.3.3.7. Dosage de la vitamine E plasmatique (Moses *et al.*, 2012)

La concentration de vitamine E a été déterminée par la méthode spectrophotométrique de Moses *et al* (2012).

i. Mode opératoire :

Dans chaque tube ont été introduit 500 μl d'échantillon, 1600 μl d'éthanol et 2 ml d'ether de pétrole. Après centrifugation à 2000 tours/min pendant 5 minutes, le surnageant à

été évaporé. Au résidu 200 µl de alpha alpha dipyridyl (2%) et 200 µl de chlorure ferrique (0,5%) on été ajouté puis incubé pendant 5 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Après incubation, lecture de l'absorbance à 520 nm après ajout de 4 ml de butanol.

Tableau X: Protocole de dosage de la vitamine E

Réactifs	Echantillons	
	Blanc	Essai
Sérum (µl)		500
Ethanol (µl)	1600	1600
Ether de pétrole (µl)	2000	2000
Centrifuger 2000 trs/min pendant 5 min, sépare le surnageant puis l'évaporer et garder le résidu.		
Ajouter au résidu : α - α -dipyridyl 2% (µl)	200	200
Chlorure ferrique : 0.5% (µl)	200	200
Incuber pendant 5 min, température ambiante obscurité		
Butanol (µl)	4000	4000
Lecture de l'absorbance à 520 nm		

ii. Mode opératoire dosage des solutions standards :

Prélever 100 µl de chaque solution puis ajouter 100 µl de α - α -dipyridyl 2% et 100 µl de chlorure ferrique (0,5%). Incuber pendant 5 min à l'obscurité puis ajouter le butanol 2000 µl et lire la DO à 520 nm. Tracer la droite d'étalonnage DO en fonction des concentrations

iii. Expression des résultats

Les concentrations de vitamine E ont été lues en utilisant la courbe d'étalonnage (Annexe 21).

IX.4. Analyse bactériologique de l'eau utilisée pour hémodialyse.

IX.4.1. Filtration de l'échantillon sur membrane.

Cent millilitre (100ml) d'échantillons d'eau ont été filtrés à travers une membrane de nitrocellulose, de microporosité (0,45 µm). Le filtre a été ensuite placé sur milieu TGEA (Tryptone Glucose Extract Agar), puis incubé à température ambiante pendant 7 jours pour dénombrement de la flore totale (NF S93-315, 2008). Le nombre de colonies retrouvée a été exprimé comme la moyenne de l'Unité Formant Colonie (UFC/mL) (NF S93-315, 2008).

NB : L'eau pour préparation injectable (EPPI) stérile achetée en pharmacie a été utilisée comme contrôle.

IX.4.2. Repiquage des colonies et identification.

IX.4.2.1. Repiquage des colonies sur différents milieux

Les isolats bactériens purs ont été repiqués sur géloses Chapman, Mueller Hinton, MacConkey, Gélose au sang et chocolat puis incubation à 37°C pendant 24 à 48h.

IX.4.2.2. Examen microscopique après coloration de Gram

i. Principe

Le principe est basé sur la différence de composition de la paroi des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif. Une fois que le premier colorant, le violet de gentiane se soit fixé sur le cytoplasme de ces bactéries et après fixation de cette coloration interne par le lugol, on utilise ensuite de l'alcool qui sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites "Gram négatives". En effet, celles-ci ont une paroi pauvre en peptidoglycanes donc plus fine qui va laisser passer l'alcool (molécule lipophile) ou le mélange alcool-acétone et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, pour les bactéries dites "Gram positives" la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car elle est composée d'une "couche" de peptidoglycanes plus importante donc de ce fait, plus épaisse. Elles resteront alors violettes. La coloration par la fuchsine ou la safranine est une contre-coloration qui a pour but de donner aux bactéries Gram négatives précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope.

ii. Mode opératoire

Recouvrir la préparation de **violet de gentiane** et laisser agir 15 secondes environs puis éliminer le violet de gentiane en rinçant avec le **lugol**. Faire agir le lugol pendant 30 secondes puis sans rincer et décolorer aussitôt à l'**alcool-acétone** par un mouvement de bascule jusqu'à ce que l'alcool-acétone n'entraîne plus de violet de gentiane et soit bien incolore. Laver rapidement à l'eau courante. Recolorer avec la **fuschine** diluée quelques secondes et rincer abondamment puis sécher. Observer à l'immersion (objectif X100)

IX.4.2.3. Identification de bactéries

L'identification des bactéries a été réalisée à l'aide des tests biochimiques commercialisés : galerie Api 20NE pour l'identification des bactéries classées non fermentaires (Annexe 23 et 24), galerie API 20E pour l'identification des entérobactéries (Annexe 25), le test à la Coagulase pour l'identification des espèces de staphylocoques (annexe 26).

IX.5. Analyses statistiques des résultats

Les données recueillies ont été exploitées par le logiciel Excel (version 2010). L'analyse statistique des données faite à l'aide du logiciel Statistica.10 de Statsoft. La moyenne, les écarts types et les pourcentages ont été calculés. Une analyse de variance ANOVA (PostHoc Fisher LSD) a ensuite été effectuée afin d'évaluer la significativité des différences observées entre les différentes valeurs obtenues avant et après hémodialyse. Les corrélations entre les différents paramètres ont été effectuées à l'aide de la matrice de Spearman. Afin d'apprécier l'impact des différents facteurs étudiés (Age, IMC, durée d'hémodialyse et sexe) sur la variation des réponses avant et après hémodialyse, une analyse de la covariance (ANCOVA) entre ces facteurs et la variation de chacune des réponses biologiques observées (différence de valeurs obtenues après et avant) a été effectuée. Le seuil de probabilité $p < 0,05$ a été retenu comme seuil de significativité.

CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. RÉSULTATS

I.1. Caractères généraux de la population d'étude

Afin de voir s'il y'a homogénéité dans les deux groupes de population utilisée, la moyenne des âges, le poids, la taille et l'IMC ont été calculés chez les patients hémodialysés d'une part et d'autre part chez les patients du groupe témoin. Par ailleurs la durée moyenne d'hémodialyse dans le groupe des patients hémodialysés a été également déterminée. Le tableau XI ci-dessous représente les résultats obtenus.

Tableau XI:Caractères généraux de la population d'étude

Variable	Age en (année)	Poids en (Kg)	Taille en (m)	IMC en (Kg/m ²)	Durée d'hémodialyse en (année)
Patients en hémodialyse n = 80	48,69 ± 12,5	68,08 ± 12,86	1,70 ± 0,09	23,5 ± 3,45	3,34±2.5
Groupe témoin n=80	47,70 ± 13,08	71,39 ± 11,30	1,67 ± 0,08	25,68 ± 4,18	-

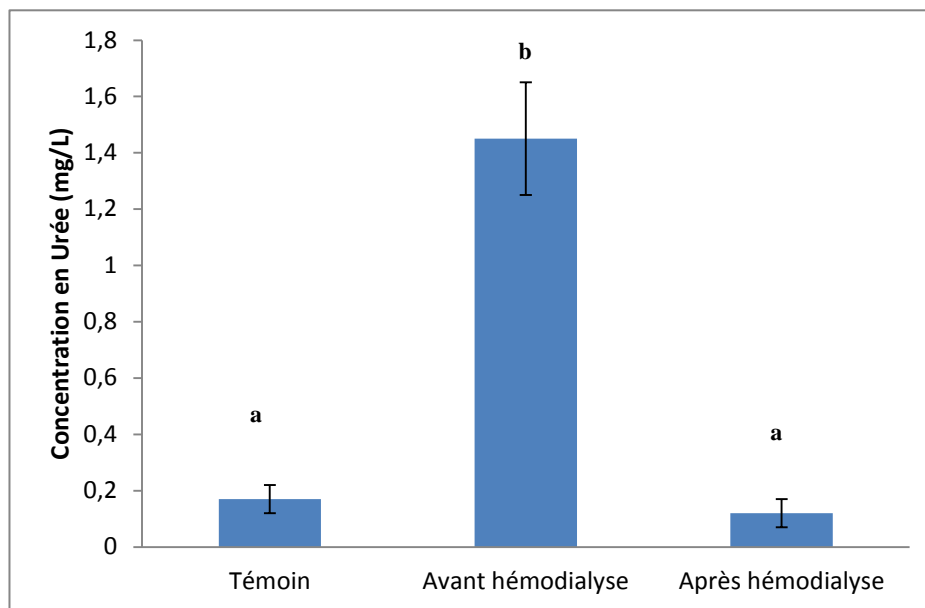
IMC : Indice de Masse Corporelle, δ : erreur standard.

L'âge, la taille et le poids n'étaient pas significativement différents dans les deux groupes. Nous n'avons noté aucune surcharge pondérale chez les patients hémodialysés. Par contre, les sujets du groupe témoin étaient en surpoids (Tableau II).

I.2 Paramètres reflétant les capacités épuratives de la membrane d'hémodialyse

I.2.1. Concentration sérique en urée des groupes expérimentaux

Afin de vérifier l'efficacité d'épuration de la membrane en polysulfone sur les déchets métaboliques, le taux d'urée a été évalué chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse et dans le groupe témoin. La figure 16 ci-dessous représente les résultats obtenus.



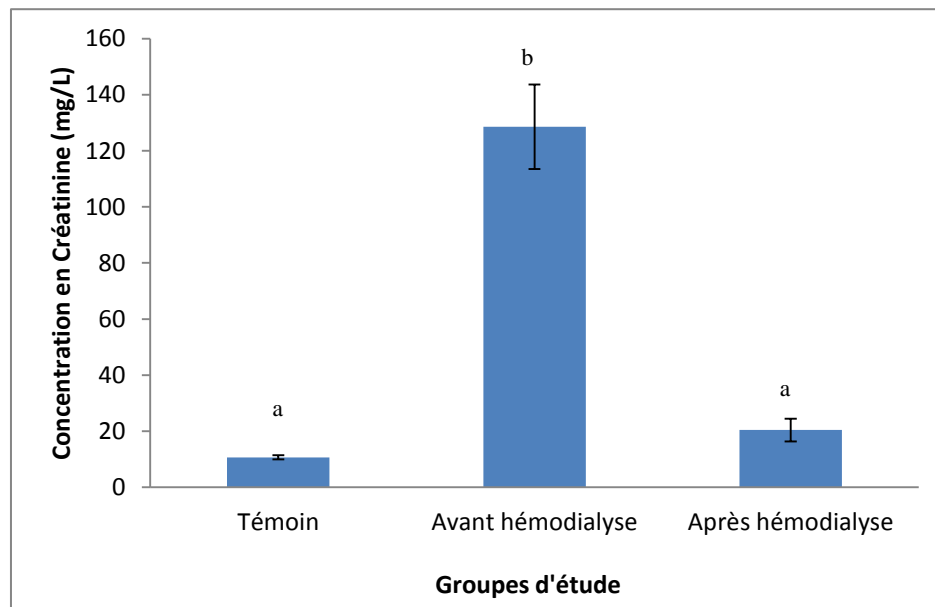
Les valeurs portant les différentes lettres sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 16: Taux d'urée sérique des groupes expérimentaux.

Avant la séance de dialyse, on observe un taux d'urée significativement élevé chez les patients hémodialysés comparé au groupe témoin. Ce taux baisse significativement après la dialyse ($p < 0,05$) et aucune différence significative n'a été notée entre le taux d'urée des patients après la dialyse et ceux du groupe témoin ($p > 0,05$).

I.2.2. Concentration sérique en créatinine des groupes expérimentaux.

Afin de voir l'efficacité d'épuration de la membrane en polysulfone sur les déchets métaboliques, le taux de créatinine a été évalué chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse et dans le groupe témoin. La figure 17 ci-dessous représente les résultats obtenus.



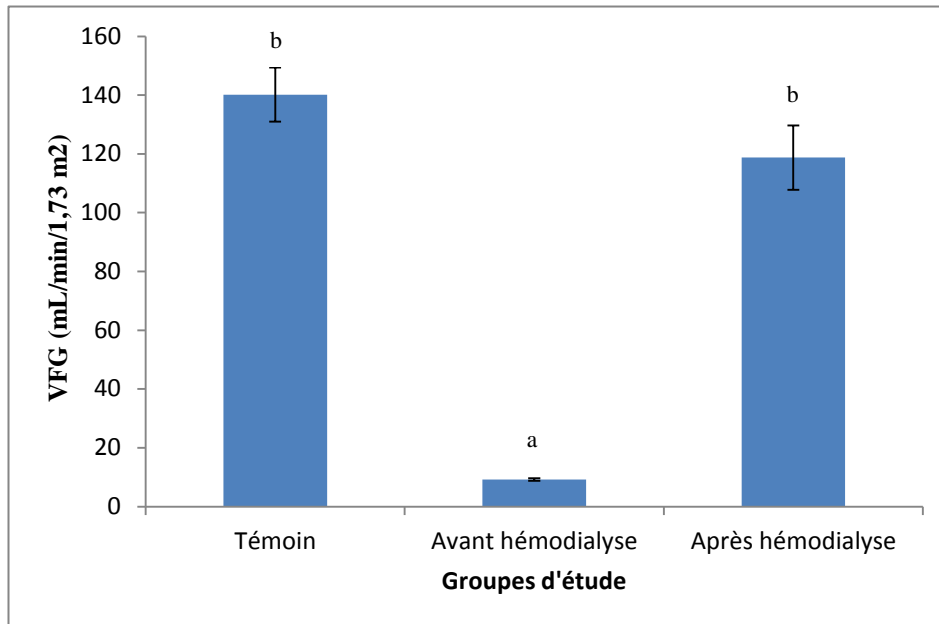
Les valeurs portant les différentes lettres sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 17: Taux sérique en créatinine des groupes expérimentaux

Avant la séance de dialyse, on observe un taux de créatinine plasmatique significativement élevé chez les patients hémodialysés comparé au groupe témoin. Ce taux baisse significativement après la dialyse ($p < 0,05$) et aucune différence significative n'a été notée entre le taux de créatinine des patients après la dialyse et ceux du groupe témoin ($p > 0,05$).

I.2.3. Vitesse de filtration glomérulaire des groupes expérimentaux.

La vitesse de filtration glomérulaire (VFG) a été évaluée chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse et dans le groupe témoin. La figure 18 ci-dessous représente les résultats obtenus.



Les valeurs portant les différentes lettres sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 18: Vitesse de filtration glomérulaire des groupes expérimentaux.

Avant la séance de dialyse, la vitesse de filtration glomérulaire est significativement faible chez les patients hémodialysés comparé au groupe témoin. Ce taux augmente significativement après la dialyse ($p < 0,05$) comparé au groupe témoin.

I.2.4. Distribution de la VFG par stade de l'atteinte rénale des groupes expérimentaux.

Afin de vérifier l'efficacité du traitement des patients hémodialysés sur membrane en polysulfone, une comparaison de la distribution de la VFG par stade de l'atteinte rénale chez les patients hémodialysés (avant et après la dialyse) et le groupe témoin a été effectuée. Le tableau XII ci-dessous représente les résultats obtenus.

Tableau XII: Distribution de la VFG par stade d'atteinte rénale des groupes expérimentaux

Groupes	VFG					TOTAL
	Stade 1 VFG ≥ 90	Stade 2 60 ≤ VFG ≤ 89	Stade 3 30 ≤ VFG ≤ 59	Stade 4 15 ≤ VFG ≤ 29	Stade 5 VFG < 15	
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	
Pré-hémodialyse	–	–	–	–	100%	100%
Post-hémodialyse	22,5%	31,25%	36,25%	10%	–	100%
Témoin	71,25%	28,75%	–	–	–	100%

La comparaison de la distribution de la VFG entre les patients hémodialysés et le groupe témoin montre que, avant la dialyse tous les patients (**100%**) en hémodialyse ont une VFG < 15 (stade 5), ce qui confirme leur statut d'insuffisance rénale chronique terminale. Après la dialyse **22,5%** des patients hémodialysés se retrouvent au stade 1, **31,25%** au stade 2, **36,25%** au stade 3 et **10%** de patients au stade 4. Par ailleurs dans le groupe témoin, **71,25%** des patients ont été classés au stade 1, et **28,75%** au stade 2.

I.3. Profil lipidique des patients

I.3.1. Profil lipidique des groupes expérimentaux

Comme le montre le tableau XIII, le CT, le C-LDL et le C-HDL des patients sous hémodialyse est considérablement plus faible avant et après hémodialyse en contraste avec les témoins sains. Une différence non significative est observée entre les triglycérides avant et après l'hémodialyse par rapport aux témoins ($p > 0,05$). L'indice de risque cardiovasculaire

(CT / C-HDL) des patients atteints d'insuffisance rénale chronique est plus élevé après une séance d'hémodialyse comparé à celui du groupe témoin.

Tableau XIII: Profil lipidique des groupes expérimentaux

Cholesterol/ Triglycérides (g/L)	Patients en hémodialyse		Témoin (n=80)
	Avant hémodialyse	Après hémodialyse	
Cholestérol total	0,75 ± 0,49 ^a	0,88 ± 0,45 ^a	1,26 ± 0,85 ^b
Cholestérol LDL	0,48 ± 0,46 ^a	0,56 ± 0,45 ^a	0,79 ± 0,65 ^b
Cholestérol HDL	0,24 ± 0,19 ^a	0,25 ± 0,22 ^a	0,36 ± 0,35 ^b
Triglycérides	0,69 ± 0,38 ^a	0,62 ± 0,35 ^a	0,63 ± 0,42 ^a
TC/HDL-C	6,16 ± 8,23 ^{ab}	8,7 ± 13,20 ^b	5,64 ± 4,27 ^a

Dans la même colonne, les valeurs portant les différents lettres sont significativement différent ($p < 0,05$)

I.3.2. Profil lipidique des groupes expérimentaux de sexe masculin

Le CT, le C-LDL et les TG des patients mâles sous hémodialyse est remarquablement inférieurs avant et après hémodialyse comparé aux témoins sains (Tableau XIV). Aucune différence significative n'est observée entre le C-HDL avant et après hémodialyse par rapport aux témoins sains ($p > 0,05$). Nous n'avons noté aucune différence significative entre l'indice de risque cardiovasculaire CT / C-HDL des patients masculins avant et après l'hémodialyse par rapport aux témoins sains.

Tableau XIV: Profil lipidique des patients hémodialysés (avant et après la dialyse) de sexe masculin et le groupe témoin.

Cholesterol/ Triglycérides (g/L)	Patients hémodialysés de sexe masculin		Témoins (n=45)
	Avant hémodialyse	Après hémodialyse	
Cholestérol total	0,61 ± 0,37 ^a	0,72 ± 0,29 ^a	1,05 ± 0,69 ^b
Cholestérol LDL	0,35 ± 0,33 ^a	0,4 ± 0,27 ^a	0,61 ± 0,49 ^b
Cholestérol HDL	0,25 ± 0,22 ^a	0,25 ± 0,21 ^a	0,33 ± 0,35 ^a
Triglycérides	0,64 ± 0,41 ^{ab}	0,52 ± 0,27 ^a	0,71 ± 0,45 ^b
TC/HDL-C	4,32 ± 4,70 ^a	4,93 ± 4,72 ^a	5,81 ± 4,10 ^a

Dans la même colonne, les valeurs portant les différents lettres sont significativement différentes ($p < 0,05$)

I.3.3. Profil lipidique des groupes expérimentaux de sexe féminin

Le CT, le C-LDL et le C-HDL chez les patients de sexe féminin est significativement inférieur avant et après une séance de dialyse, comparé au groupe témoin (Tableau XV). Les

triglycérides quant à eux sont plus élevés avant et après une séance d'hémodialyse comparée au groupe témoin. L'indice de risque cardiovasculaire des patients féminins est également plus élevé après une séance de dialyse comparé au groupe témoin.

Tableau XV: Profil lipidique des groupes expérimentaux de sexe féminin

Cholesterol/ Triglycerides (g/L)	Patients hémodialysés de sexe féminin		Témoin (n=35)
	Avant hémodialyse	Après hémodialyse	
Cholesterol Total	0,93 ± 0,57 ^a	1,1 ± 0,52 ^a	1,52 ± 0,97 ^b
Cholesterol LDL	0,65 ± 0,54 ^a	0,76 ± 0,55 ^{ab}	1,02 ± 0,77 ^b
Cholesterol HDL	0,23 ± 0,14 ^a	0,25 ± 0,24 ^a	0,39 ± 0,35 ^b
Triglycerides	0,75 ± 0,33 ^a	0,73 ± 0,40 ^a	0,53 ± 0,35 ^b
CT/HDL-C	8,53 ± 10,89 ^{ab}	13,54 ± 18,26 ^b	5,43 ± 4,53 ^a

Dans la même colonne, les valeurs portant les différents lettres sont significativement différent (p<0,05)

I.4. Marqueurs du statut inflammatoire et oxydant des groupes expérimentaux

I.4.1. Marqueurs inflammatoire des groupes expérimentaux

I.4.1.1. Concentration sérique des marqueurs de l'inflammation des groupes expérimentaux

Quelques marqueurs de l'état inflammatoire ont été déterminés chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse et dans le groupe témoin. Le tableau XVI ci-dessous représente les résultats obtenus.

Tableau XVI: Concentration sérique des marqueurs de l'inflammation des groupes expérimentaux.

Paramètres	Patients sous traitement		Témoin
	Avant hémodialyse	Après hémodialyse	
Acide urique (g/l)	72,53 ± 19,77 ^a	18 ± 13,77 ^b	49,86 ± 23,16 ^c
Albumine (g/l)	31,11 ± 22,74 ^a	29 ± 17,14 ^a	42,25 ± 21,54 ^b
CRP (mg/l)	15,15 ± 18,46 ^a	20,85 ± 20,32 ^b	2,10 ± 7,28 ^c

dans la même colonne, les valeurs portant les différents lettres sont significativement différent (p<0.05)

Les résultats présentés dans le tableau XVI montrent que le taux d'acide urique est significativement plus élevé chez les patients hémodialysés comparé au groupe témoin. Ce taux diminue drastiquement pour rester plus faible comparé au groupe témoin. Nous n'avons

noté aucune différence significative entre les taux d'albumine avant et après hémodialyse. Ce taux diminue drastiquement après une séance de dialyse et reste plus faible comparé au groupe témoin. Le taux de CRP est significativement élevée avant et après une séance de dialyse comparée au groupe témoin ($p < 0,05$). Après la séance de dialyse, ce taux augmente encore significativement ($p < 0,05$).

I.4.1.2. Concentration sérique des marqueurs de l'inflammation des groupes expérimentaux en fonction du genre

Quelques marqueurs de l'état inflammatoire ont été évalués chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse et dans le groupe témoin en fonction du genre. Le tableau XVII ci-dessous représente les résultats obtenus.

Tableau XVII : Concentration sérique des marqueurs de l'inflammation des groupes expérimentaux en fonction du genre.

Paramètres	Patients sous traitement/ hommes		Témoin
	Avant hémodialyse	Après hémodialyse	
Acide urique (g/l)	70,62 ± 20,22 ^a	15,91 ± 8,69 ^b	56,96 ± 25,76 ^c
Albumine (g/l)	33,14 ± 26,92 ^a	29,48 ± 17,96 ^a	37,30 ± 21,19 ^a
CRP (mg/l)	21,33 ± 21,23 ^a	28,40 ± 21,53 ^a	2,40 ± 8,71 ^b

Paramètres	Patients sous traitement/ femmes		Témoin
	Avant hémodialyse	Après hémodialyse	
Acide urique (g/l)	74,97 ± 19,18 ^a	20,69 ± 18,16 ^b	40,74 ± 15,35 ^c
Albumine (g/l)	28,50 ± 15,83 ^a	28,38 ± 16,26 ^a	48,61 ± 20,57 ^b
CRP (mg/l)	7,20 ± 9,63 ^a	11,14 ± 13,66 ^a	1,71 ± 4,95 ^b

Dans la même colonne, les valeurs portant les différents lettres sont significativement différent ($p < 0,05$)

Les résultats présentés dans le tableau XVII montrent que le taux d'acide urique est significativement plus élevé chez les patients de sexe masculin et féminin comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Ce taux diminue drastiquement après une séance de dialyse et reste faible comparé au groupe témoin. Aucune différence significative n'est notée dans le genre masculin entre les taux d'albumine avant et après hémodialyse comparé au groupe témoin. Cependant, chez les patients de sexe féminin, ce taux reste significativement plus faible avant et après une séance d'hémodialyse comparée au groupe témoin. Dans le genre masculin comme féminin, nous n'avons noté aucune différence significative entre le taux de CRP avant et après une

séance de dialyse ($p>0,05$). Toutefois, ce taux augmente significativement dans les deux genres après traitement par hémodialyse ($p>0,05$).

I.4.1.3. Répartition des patients en fonction de la valeur normale et anormale de la CRP avant et après hémodialyse et le groupe témoin.

Une valeur normale de la CRP doit être inférieure à environ 6 mg/l. La répartition des patients en fonction de la CRP avant et après hémodialyse et le groupe témoin nous a permis de dresser un pourcentage de patients présentant une CRP normale et anormale avant et après une séance d'hémodialyse. La figure 19 ci-dessous représente les résultats obtenus.

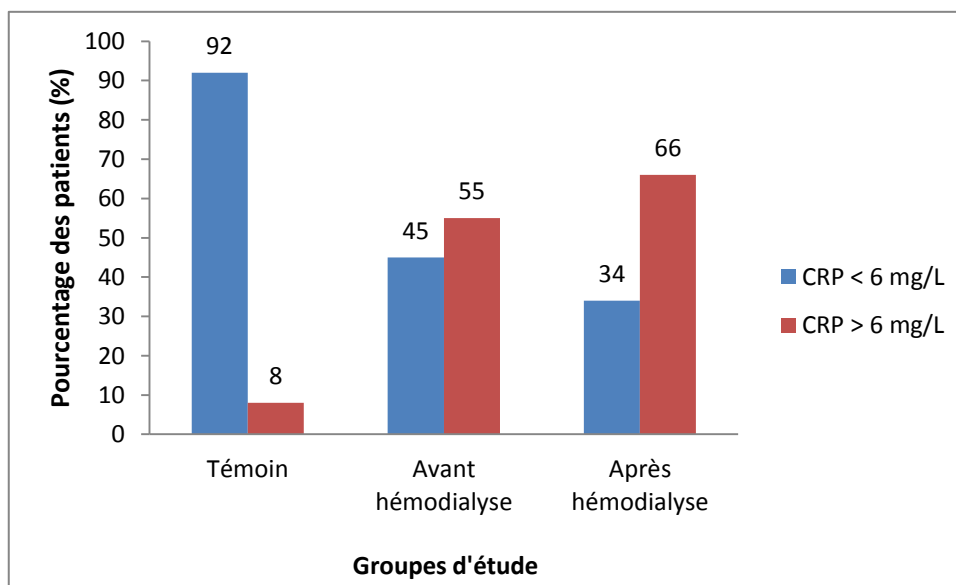


Figure 19: Répartition des patients en fonction de la valeur normale et anormale de la CRP avant et après la dialyse et le groupe témoin.

Les résultats présentés par la figure 21 montrent que, avant une séance de dialyse 45% de patients présentent un taux de CRP normal (CRP < 6 mg/L) contre 55% de patients présentent un taux anormal (CRP > 6 mg/L). Après la dialyse, 34% de patients présentent un taux de CRP normal contre 66% de patients présentent un taux anormal, soit une augmentation de **11%**. Ceci met en évidence une possibilité de réaction inflammatoire au cours des séances de dialyse.

I.4.1.4. Répartition des patients en fonction du taux normal et anormal d'albumine avant et après hémodialyse.

Une répartition des patients en fonction du taux d'albumine avant et après hémodialyse nous a permis de dresser un pourcentage de patient présentant un taux d'albumine normal avant et après une séance d'hémodialyse. La figure 20 ci-dessous représente les résultats obtenus.

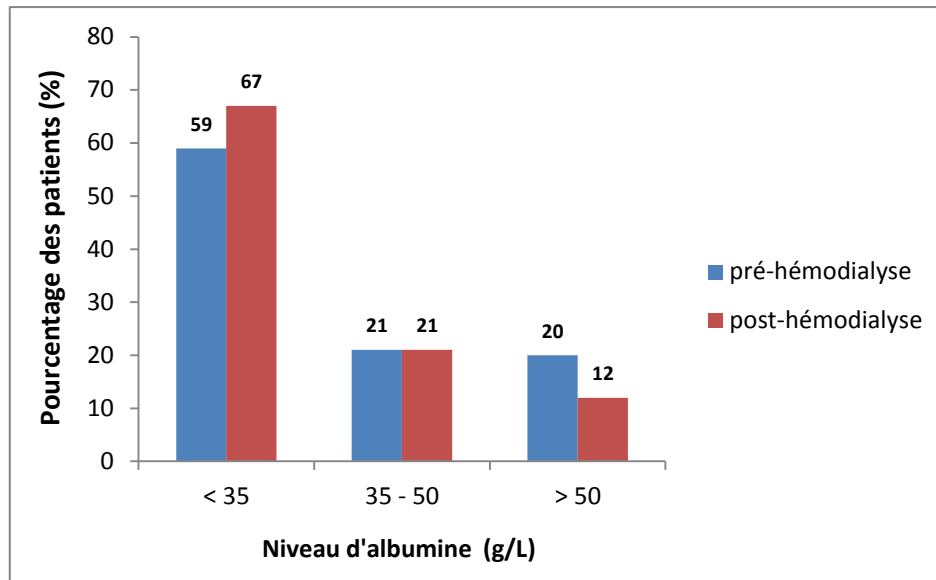


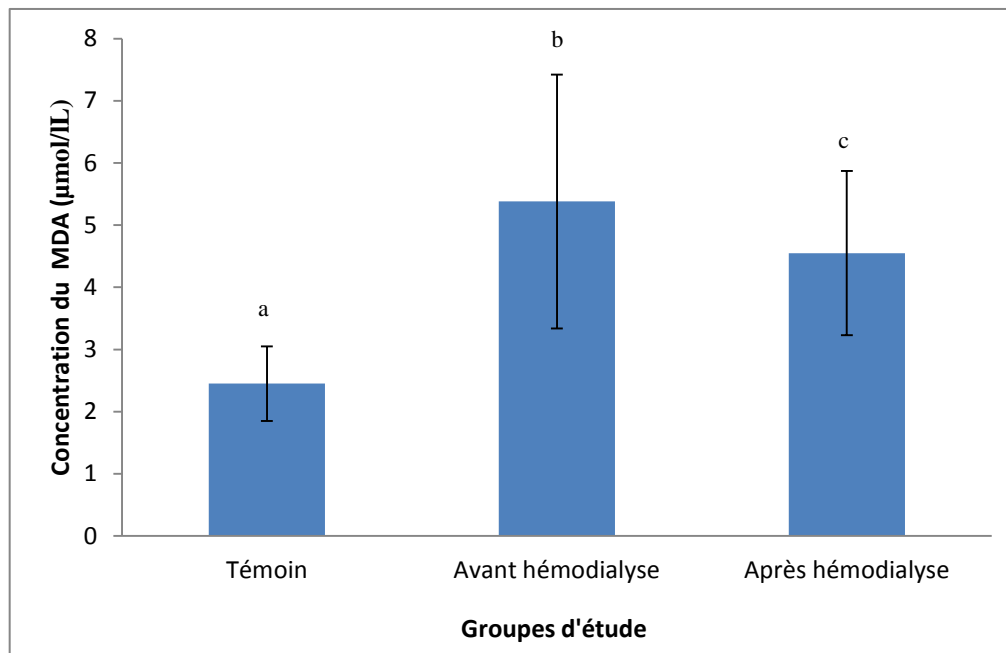
Figure 20: Répartition des patients en fonction du taux normal et anormal d'albumine avant et après la dialyse.

Les résultats présentés par la figure 22 montrent que, avant une séance de dialyse 21% de patients présentent un taux d'albumine dans la norme (35-50 g/L), 20% de patients présentent un taux d'albumine au-dessus de la normale (> 50 g/L) contre 59% présentent un taux d'albumine en dessous de la normale (<35 g/L). Après la dialyse, 21% de patients sont maintenus dans un taux acceptable, 12% de patients présentent un taux d'albumine au-dessus de la normale contre 67% présentent un taux d'albumine en dessous de la normale. Cette perte de l'albumine au cours d'une séance de dialyse est préoccupante compte tenue de l'importance de l'albumine dans la prévention des décès par MCV chez les patients en insuffisance rénale chronique.

I.4.2. Niveau d'oxydation des lipides sériques des groupes expérimentaux

I.4.2.1. Concentration sérique en malondialdéhyde des groupes expérimentaux

La peroxydation lipidique à travers le dosage sérique du MDA a été évaluée chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse et dans le groupe témoin. La figure 21 ci-dessous représente les résultats obtenus.



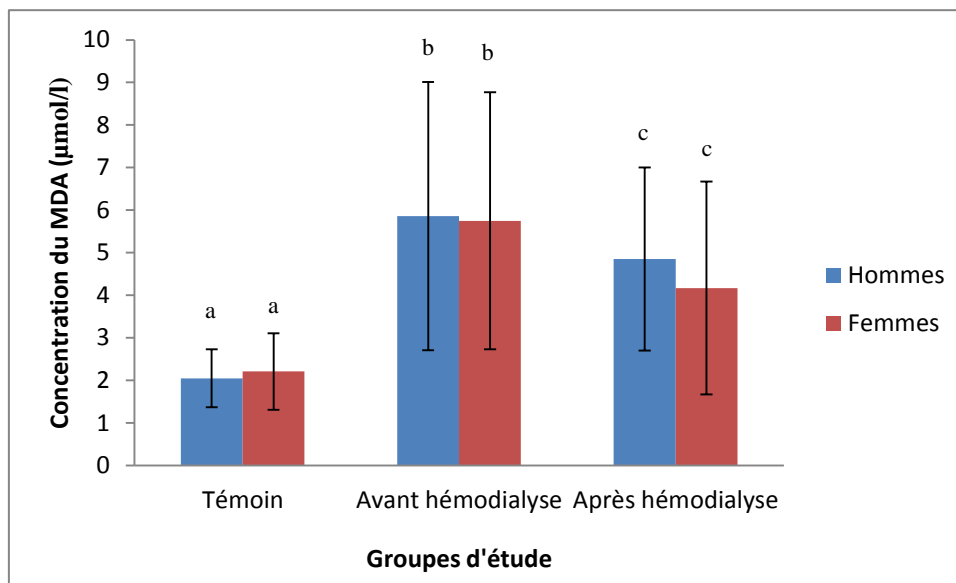
Les valeurs portant les différentes lettres sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 21: Taux de malondialdéhyde des groupes expérimentaux

Les résultats présentés par la figure 21 montrent que le taux de MDA est significativement plus élevés chez les patients avant et après une séance de dialyse comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Bien qu'on note une diminution significative du taux de MDA chez les patients après une séance de dialyse, ce taux reste significativement deux fois plus supérieure au taux de MDA du groupe témoin ($p < 0,05$). Ceci met en évidence une augmentation des réactions de peroxydation lipidique au sein de la population des patients hémodialysés.

I.4.2.2. Concentration sérique en malondialdéhyde des groupes expérimentaux en fonction du genre.

Le taux sérique de MDA a été évalué chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse et dans le groupe témoin en fonction du genre. Ceci afin de voir les variations du taux plasmatique de MDA survenues au cours d'une séance d'hémodialyse chez les hommes comme chez les femmes hémodialysés. La figure 22 ci-dessous représente les résultats obtenus.



Les valeurs portant les différentes lettres sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Figure 22: Taux de MDA sérique des groupes expérimentaux en fonction du genre.

Les résultats présentés par la figure 22 montrent que le taux de MDA est significativement plus élevé chez les hommes comme chez les femmes avant une séance de dialyse comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Après la dialyse, bien que le taux de MDA diminue significativement dans le genre masculin comme féminin, ce taux reste supérieur dans la population des patients hémodialysés comparé au groupe témoin.

I.4.3. Marqueurs antioxydants.

I.4.3.1. Concentration sérique en antioxydant enzymatique des groupes expérimentaux.

Le taux d'antioxydant enzymatique a été évalué chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse et dans le groupe témoin. Le tableau XVIII ci-dessous représente les résultats obtenus.

Tableau XVIII: Concentration d'antioxydant enzymatique des groupes expérimentaux

Paramètres	Patients sous traitement		Témoin
	Avant hémodialyse	Après hémodialyse	
SOD (U/ml)	2.77 ± 0.73 ^a	2.90 ± 0.76 ^a	1.71 ± 0.24 ^b
GPX (U/ml)	0.03 ± 0.03 ^a	0.03 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.01 ^a
Catalase (U/ml)	94.35 ± 57.85 ^a	86.62 ± 62.28 ^a	98.96 ± 54.43 ^a

Dans la même colonne, les valeurs portant les différents lettres sont significativement différent ($p < 0,05$)

La comparaison des différents paramètres dans le tableau XVIII montre un taux de SOD avant et après la dialyse significativement plus élevé dans la population des patients hémodialysés comparé au groupe témoin. Par ailleurs, aucune différence significative n'est observée pour le GPX et la catalase avant et après la dialyse comparée au groupe témoin. Le taux de SOD serait donc augmenté au cours d'une séance de dialyse.

I.4.3.2. Concentration sérique en antioxydant enzymatique des groupes expérimentaux en fonction du genre

Le taux d'antioxydant enzymatique a été évalué chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse et dans le groupe témoin en fonction du genre. Le tableau XIX ci-dessous représente les résultats obtenus.

Tableau XIX: Concentration d'antioxydant enzymatique des groupes expérimentaux en fonction du genre.

Paramètres	Patients sous traitement/ hommes		Témoin
	Avant hémodialyse	Après hémodialyse	
SOD (U/ml)	2,70 ± 0,38 ^a	2,83 ± 0,47 ^a	1,81 ± 0,25 ^b
GPX (U/ml)	0,03 ± 0,04 ^a	0,03 ± 0,02 ^a	0,02 ± 0,02 ^a
Catalase (U/ml)	84,65 ± 55,50 ^a	61,09 ± 40,62 ^b	107,80 ± 62,41 ^c

Paramètres	Patients sous traitement / femmes		Témoin
	Avant hémodialyse	Après hémodialyse	
SOD (U/ml)	2,86 ± 1,02 ^a	2,99 ± 1,03 ^a	1,58 ± 0,17 ^b
GPX (U/ml)	0,03 ± 0,02 ^a	0,03 ± 0,03 ^a	0,03 ± 0,01 ^a
Catalase (U/ml)	106,83 ± 59,20 ^{ab}	119,44 ± 70,04 ^a	87,59 ± 40,10 ^b

Dans la même colonne, les valeurs portant les différents lettres sont significativement différent ($p < 0,05$)

La comparaison des différents paramètres dans le tableau XIX montre un taux de SOD significativement plus élevé avant et après la dialyse dans le genre masculin comme féminin ($p < 0,05$) comparé au groupe témoin. Par ailleurs, aucune différence significative n'est notée entre le GPX avant et après la dialyse comparée au groupe témoin dans les deux genres comparé au groupe témoin. Le taux de catalase est significativement plus faible chez les patients hémodialysés de sexe masculin avant et après la dialyse comparée au groupe témoin. Ce taux diminue significativement après une séance de dialyse ($p < 0,05$). Par ailleurs, chez les patients hémodialysés de sexe féminin le taux de catalase est significativement plus élevé avant et après la dialyse comparé au groupe témoin. Ce taux ne change pas significativement après une séance de dialyse ($p > 0,05$).

I.4.3.3. Concentration sérique en antioxydant non enzymatique des groupes expérimentaux.

Le taux d'antioxydant non enzymatique a été évalué chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse et dans le groupe témoin. Le tableau XX ci-dessous représente les résultats obtenus.

Tableau XX: Concentration d'antioxydant non enzymatique des groupes expérimentaux.

Paramètres	Patients sous traitement		Témoin
	Avant hémodialyse	Après hémodialyse	
FRAP ($\mu\text{mol/ml}$)	18.83 \pm 3.72 ^a	15.07 \pm 3.11 ^b	17.81 \pm 4.73 ^a
GSH ($\mu\text{mol/L}$)	6,92 \pm 4,98 ^a	11,36 \pm 6,99 ^b	6,40 \pm 9,56 ^a
Vitamine C ($\mu\text{g/mL}$)	19,79 \pm 9,08 ^a	13,51 \pm 7,58 ^b	20,13 \pm 9,18 ^a
Vitamine E ($\mu\text{g/mL}$)	36,32 \pm 3,40 ^a	34,54 \pm 4,65 ^b	37,63 \pm 3,23 ^c

Dans la même colonne, les valeurs portant les différents lettres sont significativement différent ($p < 0,05$)

La comparaison des différents paramètres dans le tableau XX ne montre aucune différence significative entre le taux de FRAP avant une séance de dialyse et comparé au groupe témoin ($p > 0,05$). Après la dialyse, le taux de FRAP diminue significativement et reste faible comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée entre le taux de GSH avant la dialyse et le groupe témoin. Toutefois, ce taux augmente significativement après une séance de dialyse et reste supérieur au taux du groupe

témoin ($p < 0,05$). Aucune différence significative n'est observée entre le groupe témoin et les patients hémodialysés avant la séance de dialyse pour le taux de vitamine C. Après traitement, on note une diminution significative de la vitamine C qui reste faible comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Le taux de vitamine E est significativement faible avant et après une séance de dialyse comparée au groupe témoin. Ceci montre que la capacité antioxydant totale du serum, la vitamine C et E seraient dialysée au cours d'une séance d'hémodialyse d'où leurs taux tendent à diminuer alors que le GSH n'est pas dialysé et son taux tend à augmenter.

I.4.3.4. Concentration sérique en antioxydant non enzymatique des groupes expérimentaux en fonction du genre

Le taux d'antioxydant non enzymatique a été évalué chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse et dans le groupe témoin en fonction du genre. Le tableau XXI ci-dessous représente les résultats obtenus.

Tableau XXI: Taux d'antioxydant non enzymatique des groupes expérimentaux en fonction du genre.

Paramètres	Patients sous traitement / Hommes		Témoin
	Avant hémodialyse	Après hémodialyse	
FRAP ($\mu\text{mol/ml}$)	20,90 \pm 1,85 ^a	15,73 \pm 2,70 ^b	18,31 \pm 4,45 ^c
GSH ($\mu\text{mol/L}$)	7,32 \pm 4,54 ^a	10,76 \pm 7,68 ^a	8,40 \pm 12,22 ^a
Vitamine C ($\mu\text{g/mL}$)	19,25 \pm 5,59 ^a	10,81 \pm 6,36 ^b	23,70 \pm 9,35 ^c
Vitamine E ($\mu\text{g/mL}$)	36,87 \pm 3,55 ^a	34,81 \pm 5,59 ^b	37,82 \pm 2,89 ^a

Paramètres	Patients sous traitement / Femmes		Témoin
	Avant hémodialyse	Après hémodialyse	
FRAP ($\mu\text{mol/ml}$)	16,17 \pm 3,84 ^{ab}	14,23 \pm 3,42 ^a	17,17 \pm 5,06 ^b
GSH ($\mu\text{mol/L}$)	6,40 \pm 5,51 ^a	12,14 \pm 6,01 ^b	3,83 \pm 2,03 ^c
Vitamine C ($\mu\text{g/mL}$)	20,50 \pm 12,21 ^a	16,99 \pm 7,69 ^{ab}	15,54 \pm 6,63 ^b
Vitamine E ($\mu\text{g/mL}$)	35,61 \pm 3,10 ^a	34,21 \pm 3,11 ^a	37,38 \pm 3,64 ^b

NB : Dans la même colonne, les valeurs portant les différents lettres sont significativement différent ($p < 0,05$)

La comparaison des différents paramètres dans le tableau XXI montre que, chez les patients hémodialysés de sexe masculin, le taux de FRAP avant la dialyse est

significativement plus élevé comparé au groupe témoin. Chez les femmes par contre, aucune différence significative n'a été observée entre le taux de FRAP avant la dialyse et le groupe témoin ($p > 0.05$). Après la dialyse, le taux de FRAP diminue significativement et reste faible comparé au groupe témoin ($p < 0.05$) dans les deux genres. Chez les patients de sexes masculins, il n'existe aucune différence significative entre le GSH avant et après la dialyse comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Chez les patients hémodialysés de sexe féminin par contre, on note une différence significative entre le GSH avant et après la dialyse comparée au groupe témoin ($p < 0,05$). Avant la dialyse, la vitamine C est significativement plus faible dans le genre masculin alors que dans le genre féminin, elle est plus élevée comparé au groupe témoin. Après la séance de dialyse, ce taux diminue significativement dans le genre masculin alors que dans le genre féminin, elle reste non significative comparée au groupe témoin. Le taux de vitamine E diminue significativement après une séance de dialyse chez les patients de sexe masculin comparé au témoin. Chez les femmes par contre bien que le taux de vitamine E soit significativement plus faible avant et après hémodialyse comparé au groupe témoin, nous n'avons noté aucune différence significative entre le taux de vitamine E avant et après dialyse. Les patients hémodialysés de sexe masculin présenteraient une susceptibilité accrue à perdre leurs capacités antioxydant totale du sérum comparé aux patients hémodialysés de sexe féminin ce qui les exposerait plus au stress oxydatif.

I.4.3.5. Classification des patients en fonction des concentrations plasmatiques en vitamine C avant et après hémodialyse.

Afin de voir le nombre de patients en carence de vitamine C après une séance d'hémodialyse, une classification des patients en fonction de leurs concentrations plasmatiques en vitamine C a été effectuée. La figure 23 ci-dessous représente les résultats obtenus.

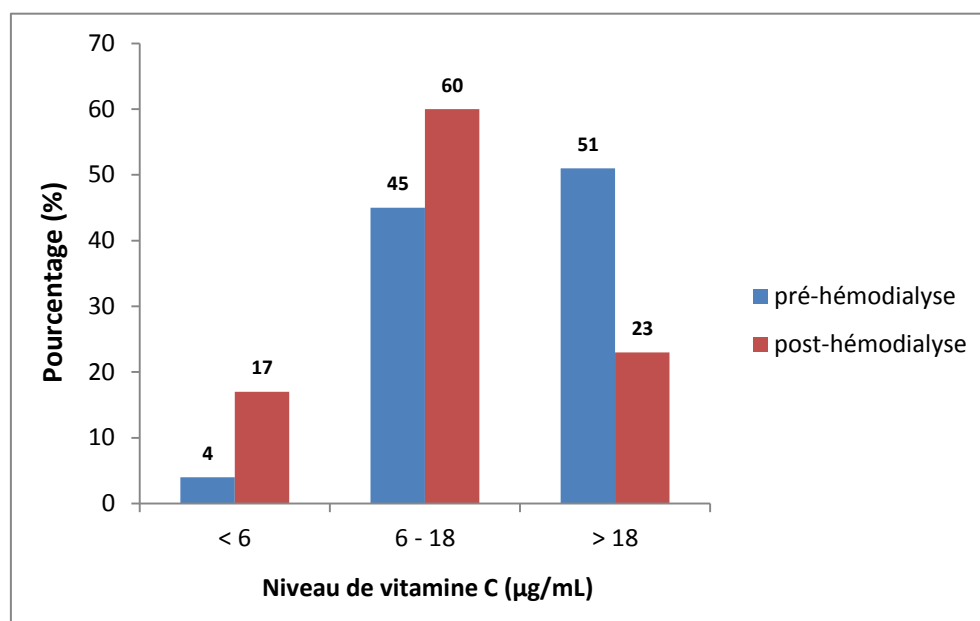


Figure 23 : Classification des patients en fonction des concentrations plasmatiques en vitamine C avant et après hémodialyse.

On constate qu'avant une séance d'hémodialyse, 45% des patients ont une concentration de vitamine C dans la normale, 51 % de patients au-dessus de la normale et 4% en carence de vitamine C. Après une séance d'hémodialyse, 23% des patients sont maintenus au-dessus du taux normal de vitamine C, 60% dans la normale contre 17% de patients en carence de vitamine C. soit une augmentation de 13% de patients en état de carence de vitamine C après hémodialyse.

I.4.4. Corrélation entre le MDA et les différents paramètres avant et après la dialyse.

I.4.4.1 Dans la population générale

Une corrélation entre le MDA et les différents paramètres a été effectuée chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse. Le tableau XXII ci-dessous représente les résultats obtenus des paramètres présentant une différence significative.

Tableau XXII: Matrice de corrélation des différents paramètres avant et après la dialyse.

	GPx Avant	GPx Après	VIT E Avant	VIT E Après
MDA avant	-0,1601	-0,0932	-0,2457*	0,0015
p-value	p=0,156	p=0,411	p=0,028	p=0,990
MDA après	0,1211	0,2269*	-0,1886	-0,1963
p-value	p=0,284	p=0,043	p=0,094	p=0,081

Il existe une corrélation négative significative ($p < 0,05$) entre le MDA et la vitamine E avant la dialyse. Une corrélation positive significative ($p < 0,05$) entre le MDA et le GPX après la dialyse.

I.4.4.2. Chez les patients de sexe masculin

Une corrélation entre le MDA et les différents paramètres a été effectuée chez les patients hémodialysés de sexe masculin avant et après la dialyse. Le tableau XXIII ci-dessous représente les résultats obtenus des paramètres présentant une différence significative.

Tableau XXIII: Matrice de corrélation des différents paramètres avant et après la dialyse chez les patients de sexe masculin.

	MDA avant	p-value	MDA après	p-value
SOD avant	0,3231	p=0,030*	0,0793	p=0,605
SOD après	0,4185	p=0,004	0,1707	p=0,262
GPX avant	-0,1817	p=0,232	-0,1541	p=0,312
GPX après	-0,0058	p=0,970	-0,0191	p=0,901
GSH avant	-0,4824	p=0,001**	-0,1853	p=0,223
GSH après	-0,5419	p=0,000	-0,0045	p=0,976
Catalase avant	0,5043	p=0,000**	0,3514	p=0,018*
Catalase après	0,4229	p=0,004	-0,0101	p=0,948
Albumine avant	-0,5547	p=0,000**	-0,2125	p=0,161
Albumine après	-0,5404	p=0,000	-0,2027	p=0,182
Vit E avant	-0,4390	p=0,003**	-0,2809	p=0,062
Vit E après	-0,1873	p=0,218	-0,1852	p=0,223

** la corrélation est significative à $p < 0,01$; *la corrélation est significative à $p < 0,05$

Il existe une corrélation positive significative ($p < 0,05$) entre le MDA, la SOD et la catalase avant la dialyse. Une corrélation négative significative ($p < 0,05$) entre le MDA, le GSH, l'albumine et la vitamine E avant la dialyse.

I.4.4. 3 Chez les patients de sexe féminin

Une corrélation entre le MDA et les différents paramètres a été effectuée chez les patients hémodialysés avant et après la dialyse chez les patients de sexe féminin. Le tableau XXIV ci-dessous représente les résultats obtenus des paramètres présentant une différence significative.

Tableau XXIV: Matrice de corrélation des différents paramètres avant et après la dialyse chez les patients de sexe féminin.

	MDA avant	<i>p-value</i>	MDA après	<i>p-value</i>
SOD avant	0,0170	p=0,923	-0,3794	p=0,025
SOD après	0,1082	p=0,536	-0,3362	p=0,048*
GPX avant	-0,1781	p=0,306	0,6240	p=0,000
GPX après	-0,1501	p=0,389	0,4901	p=0,003**
GSH avant	0,4951	p=0,002**	-0,1581	p=0,364
GSH après	-0,0845	p=0,630	-0,1157	p=0,508
Catalase avant	-0,1334	p=0,445	0,1363	p=0,435
Catalase après	-0,2572	p=0,136	0,4997	p=0,002**
Albumine avant	0,2943	p=0,086	-0,3689	p=0,029
Albumine après	0,2408	p=0,163	-0,1906	p=0,273
Vit E avant	-0,1012	p=0,563	-0,1513	p=0,386
Vit E après	0,2756	p=0,109	-0,2931	p=0,087

** la corrélation est significative à $p < 0,01$; *la corrélation est significative à $p < 0,05$

Il existe une corrélation positive et significative ($p < 0,05$) entre le MDA et le GSH avant la dialyse. Une corrélation positive et significative ($p < 0,05$) entre le MDA, le GPX et la catalase après la dialyse, une corrélation négative et significative ($p < 0,05$) entre le MDA et la SOD après la dialyse.

I.4.5. Impact de quelques facteurs étudiés sur la variation des différents paramètres avant et après une séance de dialyse.

Une analyse de la covariance (ANCOVA) entre l'âge, l'IMC, la durée d'hémodialyse et le sexe sur les différents paramètres étudiés avant et après la dialyse a été effectuée. Les résultats des paramètres présentant une différence significative ($p < 0.05$) sont consignés dans le tableau XXV.

Tableau XXV : Impact de quelques facteurs étudiés sur la variation des différents paramètres avant et après une séance de dialyse.

	Age	IMC	durée d'HD	Sexe	R ²	p
Diff FRAP						
SS	1,8775	0,2966	0,1959	200,0464		
F	0,21362	0,03375	0,02229	22,76121	0,241391	0,000318
p	0,645286	0,854737	0,881719	0,000009		
Diff GRX						
SS	0,122	4,409	270,597	141,129		
F	0,002460	0,089192	5,473967	2,854932	0,093	0,113
p	0,960572	0,766033	0,021965	0,095247		
Diff Catalase						
SS	447,8	1289,1	2291,1	27176,4		
F	0,091159	0,262413	0,466388	5,532154	0,077	0,192
p	0,763545	0,609972	0,496758	0,021296		

IMC= Indice de masse corporelle ; SS = Superior Square F = Fisher P = seuil de significativité
R² = Coefficient de détermination

Nos résultats montrent que, le sexe aurait un impact significatif sur la variation de FRAP ($R^2 = 0,241$; $p = 0,0003$) après une séance de dialyse.

I.5. Qualité bactériologique de l'eau pour hémodialyse

I.5.1. Dénombrement des colonies après culture

Afin de voir si le nombre de germes susceptibles d'être présents dans l'eau pour hémodialyse au CHUY et à l'HGD respecte les normes internationales, les colonies ont été dénombrées au niveau de chaque point de prélèvement et exprimées en UFC/ml. Le tableau XXVI et XXVII ci-dessous représente les résultats obtenus.

Tableau XXVI: Dénombrement des colonies après filtration sur membrane pour le centre du CHUY

nombre de colonies en UFC/ml pour chaque prélèvement/mois				
	Prélèvement 1 /juillet 2015	Prélèvement 2/ Aout 2015	Prélèvement 3/ Septembre 2015	Prélèvement 4/ Octobre 2015
Point A	PC	PC	PC	PC
Point B	PC	PC*	PC	PC
Point C	PC	PC*	PC	PC

Point A = Entrée des filtres (eau du réseau) ; **Point B** = Sortie des filtres/entrée de l'osmoseur ; **Point C** = Sortie de l'osmoseur/entrée du générateur d'hémodialyse. **PC** = Présence des colonies (>100 UFC/ml), **PC*** = Présence des colonies (<100 UFC/ml).

On observe d'après le tableau XXVI un nombre de colonies largement au-dessus de la norme (>100UFC/ml) pour les prélèvements de Juillet, Septembre et Octobre au niveau des points A, B et C. Nos résultats bactériologiques montrent ainsi la présence d'un biofilm dans le circuit de distribution car il n'existe pas de différences quant au nombre de colonies isolées entre les points de prélèvement A, B et C.

Pour les prélèvements du mois d'Août 2015, seul le dénombrement des colonies du point A était supérieur à la norme. Ceci laisse penser que la désinfection mensuelle du circuit effectuée à l'aide du produit *Tiutol* après le premier prélèvement a été efficace alors qu'elle reste inefficace après le deuxième et le troisième prélèvement.

Tableau XXVII: Dénombrement des colonies après filtration sur membrane pour le centre de l'HGD

nombre de colonies en UFC/ml pour chaque prélèvement/mois				
	Prélèvement 1 /Novembre 2015	Prélèvement 2/ Décembre 2015	Prélèvement 3/ Janvier 2016	Prélèvement 4/ Février 2016
Point A	PC	PC	PC	PC
Point B	PC	PC*	PC*	PC*
Point C	PC	PC*	PC*	PC*

Point A = Entrée des filtres (eau du réseau) ; **Point B** = Sortie des filtres/entrée de l'osmoseur ; **Point C** = Sortie de l'osmoseur/entrée du générateur d'hémodialyse. **PC** = Présence des colonies (>100 UFC/ml), **PC*** = Présence des colonies (<100 UFC/ml).

On observe d'après le tableau XXVII un nombre de colonies largement au-dessus de la norme (>100UFC/mL) pour les prélèvements de Novembre 2015 au niveau des points A, B et C.

Pour les prélèvements du mois de Décembre 2015, Janvier et Février 2016, seul le dénombrement des colonies du point A était supérieur à la norme. Ceci laisse penser que la désinfection mensuelle du circuit effectuée après le premier prélèvement a été efficace.

I.5.2. Conformité après culture.

On observe d'après la figure 24 que pour le centre d'hémodialyse du CHUY, 83,3% des échantillons étaient non conformes, avec un nombre de colonies largement supérieur à la norme (>100UFC/mL) contre 16,7% des échantillons conformes (<100UFC/mL). Pour le centre d'hémodialyse de l'HGD, nous avons obtenue 50% des échantillons non conformes contre 50% d'échantillons conformes

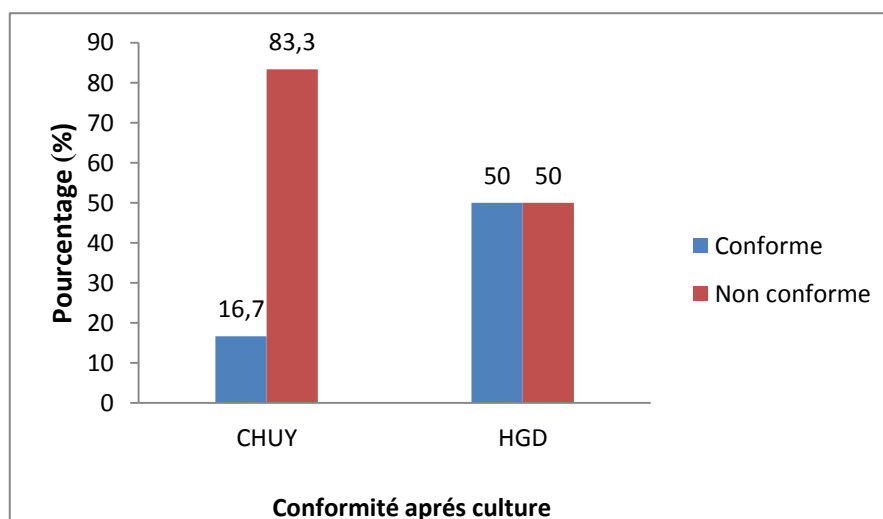


Figure 24: Pourcentage de conformité après culture

I.5.3. Identification des colonies après culture.

I.5.3.1. Résultat de l'examen microscopique après coloration de Gram

Des colorations de Gram ont été effectuées afin de déterminer le type de bactéries présent dans chaque point de prélèvement de nos différents centres d'hémodialyse retenu pour l'étude. Les tableaux XXVIII et XXIX ci-dessous représentent les résultats obtenus.

Tableau XXVIII: Type de bactérie en fonction de chaque point de prélèvement pour le centre du CHUY.

Type de Bactéries	Prélèvement 1/ juillet 2015			Prélèvement 2/ Aout 2015			Prélèvement 3/ Septembre 2015			Prélèvement 4/ Octobre 2015			Total/ Pourcentage
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
	Bacilles Gram -	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Bacilles Gram +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	16,7%
Cocci Gram +	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	33,3%

(+) = Présence (-) = Absence

Tableau XXIX: Type de bactérie en fonction de chaque point de prélèvement pour le centre de l'HGD.

Type de Bactéries	Prélèvement 1/			Prélèvement 2/			Prélèvement 3/			Prélèvement 4/			Total/ Pourcentage
	Novembre 2015			Décembre 2015			Janvier 2016			Février 2016			
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
Bacilles Gram -	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	54%
Bacilles Gram +	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23%
Cocci Gram +	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23%

(+) = Présence (-) = Absence

Il ressort de nos résultats que, dans les deux centres, les Bacilles Gram négatif ont été les plus isolées (50% dans le centre du CHUY et 54 % dans centre de l'HGD), ensuite les Cocci Gram positif (33,3% dans le centre du CHUY et 23 % dans centre de l'HGD), et enfin les Bacilles Gram positif (16,7% dans le centre du CHUY et 23 % dans centre de l'HGD).

I.5.3.2. Bactéries isolés dans l'eau pour hémodialyse dans les différents centres.

Des tests biochimiques utilisant des galeries Api 20E et API 20NE ont été effectuées afin d'identifier le type de bactéries présent dans chaque point de prélèvement de nos différents centres d'hémodialyse retenu pour l'étude. Les tableaux XXX et XXXI ci-dessous représentent les résultats obtenus.

Tableau XXX: Bactéries isolés dans l'eau pour hémodialyse entre Juillet et Octobre 2015 pour le centre d'hémodialyse du CHUY.

Bactéries isolées	Prélèvement 1			Prélèvement 2			Prélèvement 3			Prélèvement 4		
	Juillet 2015			Août 2015			Septembre 2015			Octobre 2015		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>Aeromonas salmonicida</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp Ozaenae,	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pasteurella haemolytica</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylocoque à coagulase</i> <i>négative</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+

(+) = Présence ; (-) = Absence ; **A** = Entrée des filtres (eau du réseau) ; **B** = Sortie des filtres/entrée de l'osmoseur ; **C** = Sortie de l'osmoseur/entrée du générateur d'hémodialyse.

Tableau XXXI: Bactéries isolés dans l'eau pour hémodialyse entre Juillet et Octobre 2015 pour le centre d'hémodialyse de l'HGD.

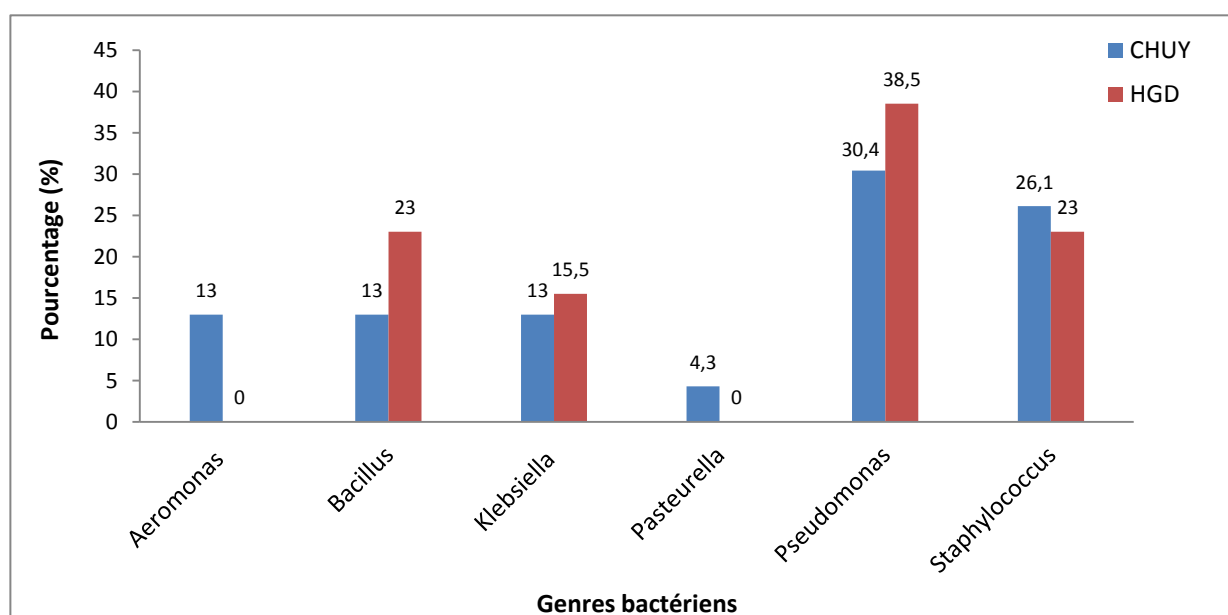
Bactéries isolées	Prélèvement 1			Prélèvement 2			Prélèvement 3			Prélèvement 4		
	Novembre 2015			Décembre 2015			Janvier 2016			Février 2016		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>Bacillus sp</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp Ozaenae,	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Staphylocoque à coagulase</i> <i>négative</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) = Présence ; (-) = Absence ; **A** = Entrée des filtres (eau du réseau) ; **B** = Sortie des filtres/entrée de l'osmoseur ; **C** = Sortie de l'osmoseur/entrée du générateur d'hémodialyse.

On observe d'après le tableau XXX et XXXI que les bactéries isolées varient en fonction du prélèvement. Ceci peut-être dû aux différentes désinfections mensuelles effectuées qui cependant n'éliminent pas complètement la présence des bactéries dans le système.

I.5.4. Repartition des genres bactériens.

La figure 25 ci-dessous représente une répartition en pourcentage des genres bactériens isolés dans l'eau pour hémodialyse dans les deux centres d'hémodialyse retenus pour l'étude.

**Figure 25:** Bactéries isolées en fonction du genre

Dans le centre d'hémodialyse du CHUY, le genre *Pseudomonas* représentait 30,4% des bactéries isolées, *Staphylococcus* à 26,1%, *Aeromonas*, *Bacillus*, et *Klebsiella* 13% enfin *Pasteurella* 4,3%. Dans le centre d'hémodialyse de l'HGD, le genre *Pseudomonas* représentait 38,5% des bactéries isolées, *Staphylococcus* 23%, *Bacillus* 13% et *Klebsiella* 13%. On note ainsi l'absence du genre *Aeromonas* et *Pasteurella* sur le genre de bactéries isolées dans le centre d'hémodialyse de l'HGD.

II. DISCUSSION

Durant les dernières années, on a pu démontrer que le stress oxydatif est une composante majeure de l'inflammation associée à l'insuffisance rénale chronique et qui sera majorée par l'hémodialyse (**Favier, 2006**).

Lors de l'hémodialyse chronique, les interactions sang/membrane artificielle sont répétées et indéfinies ; elles entraîneront à long terme des effets cliniques délétères, notamment des complications cardiovasculaires, des complications infectieuses, cancer, diabète, anémie et vieillissement accéléré. Limiter le développement de ces complications à long terme est l'objectif majeur des études concernant l'insuffisance rénale chronique. Différentes orientations peuvent être définies notamment : limiter la production d'oxydants, via l'activation ou non du système de complément en utilisant des membranes de plus en plus biocompatible, augmenter les capacités anti-oxydantes ou encore utiliser une eau ultra pure pour la dilution des concentrés d'hémodialyse.

Dans notre étude, le premier objectif a consisté en l'évaluation des paramètres reflétant les capacités épuratives de la membrane d'hémodialyse utilisée dans les centres d'hémodialyse retenus pour notre étude.

Il ressort de cette analyse que, avant la dialyse les patients HD ont un taux d'urée et de créatinine significativement plus élevé comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). De même, avant la dialyse tous les patients ont une VFG < 15 (stade 5), ce qui confirme leurs statuts d'insuffisance rénale chronique terminale. Après la dialyse, le taux d'urée et de créatinine baisse significativement et aucune différence significative n'est notée entre le taux d'urée et de créatinine après la dialyse et le groupe témoin. Par ailleurs, après une séance de dialyse la distribution de la VFG chez les patients HD était de : **22,5%** de patients au stade 1, **31,25%** au stade 2, **36,25%** au stade 3 et **10%** de patients au stade 4 contre **71,25%** de personnes sains classés au stade 1, et **28,75%** au stade 2 dans le groupe témoin. Le traitement des patients hémodialysés sous membrane en polysulfone baisse donc significativement le taux d'urée et de créatinine ($p < 0,05$), ce qui permet d'améliorer de façon significative l'état clinique du patient. Nos résultats confirment ceux de **Batta, (2011)**; **Eiselt et al., (1996)** qui après étude de l'effet des différentes membranes de dialyse sur différents paramètres biologiques, rapportent que, le traitement sous membrane en polysulfone des patients hémodialysés baisse significativement les paramètres, reflétant les capacités épuratives de la membrane avec réduction significative du taux d'urée et de créatinine. Dans l'étude de **Batta, (2011)** cependant, il ressort qu'une seule séance d'hémodialyse, même avec une membrane

biocompatible telle que la membrane en Polysulfone, contribue à un déséquilibre oxydatif mais à un degré moins important avec une membrane en Helixone. De même, les travaux de **Eiselt et al., (1996)** portant sur l'évaluation des effets de deux membranes de dialyse (cellulose et polysulfone) sur le statut antioxydant et la peroxydation lipidique des patients HD chroniques suggèrent qu'il existe une perte d'antioxydant et une peroxydation lipidique accrue au cours de l'HD, probablement à travers les membranes du dialyseur, et le type de membrane de dialyse aurait un rôle important dans le degré de stress oxydatif.

Le traitement des patients sous hémodialyse à travers une membrane en polysulfone, bien que efficace pour l'épuration en quelques heures des déchets métaboliques afin de maintenir un bon état général du patient, pourrait contribuer à un déséquilibre de la balance oxydant/antioxydant et par conséquent à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires.

L'insuffisance rénale chronique est généralement associée à une dyslipidémie et à une athérosclérose accélérée. Les patients souffrant ainsi d'insuffisance rénale chronique (IRC) sont dans la catégorie de risque le plus élevé, c'est-à-dire un risque coronarien équivalent, pour la prise en charge des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires (**National Kidney Foundation., 2002**). L'objectif de cette partie du travail était d'évaluer le profil lipidique chez les patients en hémodialyse chronique dans les deux centres d'hémodialyse retenus pour notre étude.

Les résultats obtenues à l'issue de nos analyses statistiques montrent que, le cholestérol total (CT), C-LDL et le C-HDL ont été significativement plus faibles avant et après une séance d'hémodialyse comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Nos résultats sont similaires à ceux de **Kalantar-Zadeh et al., (2003)**, qui ont également observé une baisse significative du cholestérol total, du C-LDL et du C-HDL chez les patients en hémodialyse chronique comparé aux témoins sains. En outre nous n'avons noté aucune différence significative entre les triglycérides (TG) avant et après la dialyse comparée au groupe témoin ($p > 0,05$). Chez les patients masculins, aucune différence significative n'a été notée pour le C-HDL avant et après une séance d'hémodialyse ($p > 0,05$). Par ailleurs, un taux de C-HDL < 27 mg / dl a été trouvé avant et après hémodialyse chez 65% des patients sous hémodialyse, contrairement au 81% et 51% d'incidence respectivement trouvés par **Ashfaq et al., (2007)** et par **Pennell et al., (2006)**.

Dans notre étude, 2% des patients sous hémodialyse avaient un taux de TG supérieur à 16 mg/dl. Cependant, dans l'étude de **Longenecker et al., (2002)**, 36% des patients sous hémodialyse ont eu une hypertriglycémie tandis que **Pennell et al., (2006)**, a constaté que

l'incidence était de 52% . La collecte d'échantillons chez les patients n'étant pas à jeûn par Pennell peut être la cause de cette différence car les niveaux de triglycérides augmentent après un repas.

Chez les patients hémodialysés de sexe féminin, le CT, le C-LDL, le C-HDL et les TG étaient plus faibles comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Toutefois, la différence n'était pas statistiquement significative avant et après la dialyse ($p > 0,05$). Les patients hémodialysés de sexe féminin ont également présenté un indice de risque cardiovasculaire nettement supérieur après une séance de dialyse comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Par ailleurs, chez les patients de sexe masculin, aucune différence significative sur l'indice de risque cardiovasculaire avant et après la dialyse comparée au groupe témoin ($p > 0,05$) n'a été notée. L'une des raisons de cette observation pourrait se situer au niveau de l'âge moyen des patientes hémodialysées qui était de 45 ans et près de 66% d'entre elles étaient post-ménopausées. Après la ménopause, le cholestérol total et le C-LDL augmentent et le C-HDL diminue (**Trémollières *et al.*, 1999 ; Caparevic *et al.*, 2007**). Ceci est dû à une diminution du taux d'œstrogène. Au stade d'insuffisance rénale chronique, les femmes sont susceptibles d'avoir une ménopause précoce et un profil lipidique défavorable pouvant conduire aux maladies cardiovasculaires (**Jang *et al.*, 2001**)

Dans cette étude, 3% des patients en état de malnutrition ($IMC < 18,5$) auraient exigé un traitement selon les directives de la fondation nationale américaine de néphrologie par rapport à 37% dans l'étude d'**Ashfaq *et al.*, (2007)**. Le faible taux de cholestérol sérique chez les patients atteints d'IRC est associé à une augmentation de la mortalité due aux MCV. Ce modèle d'épidémiologie inverse pour les facteurs de risque de maladie cardiovasculaire a été associé à un syndrome complexe de malnutrition - inflammation / malnutrition - complexe d'athérosclérose (MICS / MIA) (**Kalantar-Zadeh, 2005**).

Les patients HD malnutris sont hypocholestéroémiques, déficients en antioxydants et sont prédisposés à une infection qui peut diminuer la capacité d'éliminer les endotoxines circulantes (**Rauchhaus *et al.*, 2002**). Sur la base de l'hypothèse lipoprotéine/endotoxine, il existe une concentration optimale de lipoprotéines sériques en dessous de laquelle la réduction lipidique est préjudiciable car elle entraîne une diminution de la capacité des lipoprotéines à se lier au lipopolysaccharide, qui peut empêcher les lipoprotéines de neutraliser les effets néfastes des endotoxines (**Rauchhaus *et al.*, 2000**). L'insuffisance rénale chronique et la technique d'hémodialyse elle-même augmentent le développement du stress oxydatif chez les patients hémodialysés. La production de fragments de compléments et de cytokines, des molécules d'adhésion accrues dans les cellules endothéliales lors de la séance

de dialyse entraîne des réactions d'inflammation et de malnutrition avec développement à long terme d'une athérosclérose (**Bro et al., 2003 ; Horl et al., 2004**)

L'hypocholestérolémie et la diminution du C-HDL seraient donc fréquents chez les patients sous hémodialyse. Ceci est susceptible d'augmenter le taux de mortalité chez ces patients grâce à un complexe d'inflammation, de la malnutrition et d'athérosclérose, processus menant à des complications de maladies cardiovasculaires. Ce risque est également évident chez les patients de sexe féminin avec un indice de risque cardiovasculaire plus élevé.

Le contact direct du sang avec la membrane de dialyse pendant l'hémodialyse entraîne une série de changements dans les cellules sanguines. Les interactions des granulocytes avec la membrane de dialyse stimulent la production des EOR et activent des réactions aérobie déclenchant un stress oxydatif. Les rapports sur les effets de l'hémodialyse sur le système antioxydant du sang chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique sont contradictoires et l'objectif de cette partie du travail consistait à évaluer quelques marqueurs de l'inflammation, le statut en oxydant et antioxydant avant et après une séance de dialyse.

Les résultats obtenus à l'issue de nos analyses statistiques montrent que, l'albumine est significativement plus faible avant et après une séance d'hémodialyse comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Nous n'avons noté aucune différence significative entre l'albumine avant et après la dialyse. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Mehryar et Omid, (2015)** qui ont également rapporté un taux faible d'albumine chez les patients hémodialisés comparé au groupe témoin. Par ailleurs, dans l'étude de Mehryar et Omid., (2015) le taux d'albumine était significativement plus élevé après une séance de dialyse comparé à avant. De nombreuses études épidémiologiques ont montrés une forte association entre l'albumine sérique et la mortalité par maladie cardiovasculaire (MCV) chez les patients HD (**Kaysen et al., 2002**). L'hypoalbuminémie est considérée comme un indicateur fiable de la présence de syndrome complexe de la malnutrition et de l'inflammation (MICS) et un fort prédicteur de décès par MCV chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique. Dans notre étude, 67% des patients avaient un taux d'albumine inférieure à 35 g/L contre 59% avant la séance de dialyse. Ces résultats sont préoccupants compte tenu de l'importance de l'albumine dans la prévention des décès par MCV chez les patients en insuffisance rénale chronique. En effet, Dans l'étude de **kamyar et al., (2005)** effectué sur une population américaine, 50% des patients sous HD étaient hypoalbuminémies ($< 38\text{g/L}$) et le décès pour ce niveau d'hypoalbuminémie était de 19%, alors qu'une albumine sérique supérieure ou égale à 44g/L était associée à une survie 48% supérieure et à un décès de MCV de 40% moins qu'une

albumine sérique inférieure à 38g/L. Par ailleurs, **Kaysen et al., (2002)** ont montré que la concentration d'albumine sérique chez les patients en HD change avec l'inflammation et l'état nutritionnel par leurs effets sur le catabolisme et la synthèse de l'albumine respectivement. Ils ont montré que les variables nutritionnelles ont principalement affecté la synthèse de l'albumine, alors que l'inflammation a provoqué une hypoalbuminémie en augmentant le taux catabolique fractionnaire de l'albumine. La CRP a un rôle dans le développement de l'inflammation par liaison avec les lipoprotéines et l'activation du système du complément (**Arici et al., 2001; Menon et al., 2003**). En plus d'être un marqueur inflammatoire, la CRP intervient comme médiateur pour le développement de l'athérosclérose, affecte directement les cellules endothéliales, les monocytes, les macrophages et les cellules lisses et contribue à la survenue de l'athérosclérose (**Stenvinkel, 2005 ; Van et al., 2006**). Dans notre étude, le taux de CRP était significativement plus élevée avant une séance de dialyse comparée au groupe témoin ($p < 0,05$). Ce taux augmente significativement après une séance d'hémodialyse et reste environ 10 fois supérieur au taux du groupe témoin. Dans une étude de 757 patients hémodialysés suivis pendant 30 mois, la relation entre CRP, IL-6, IL-8 et l'albumine sérique avec mortalité et morbidité a été déterminée par une analyse multivariée. Dans cette étude, la CRP a été considéré comme le facteur prédictif le plus puissant des événements cardiovasculaires (**Menon et al., 2003**). Par ailleurs, dans l'étude de **Poon et al., (2012)** les taux sériques de CRP supérieurs à 6 mg/L ont augmenté la probabilité de maladies cardiovasculaires de 1,73 fois chez les patients hémodialysés. Dans notre étude, 66% des patients ont eu un taux de CRP supérieur à 6 mg/L après une séance de dialyse contre 55% avant la dialyse alors que dans le groupe témoin, ce taux était de 9%. Ce taux met en évidence une susceptibilité accrue à l'augmentation des réactions inflammatoire et un risque évident de MCV. Le taux de CRP sérique augmente avec la diminution de la concentration d'albumine sérique. La réduction de l'albumine sérique au stade précoce des maladies rénales non diabétiques serait donc associée à une inflammation et à un risque accru de maladies cardiovasculaires (**Yeo et al., 2010**). La baisse du taux d'albumine suivie d'une augmentation du taux de CRP dans notre étude permet ainsi de confirmer ses affirmations. Le taux d'acide urique était significativement faible après une séance de dialyse ($p < 0,05$) et avait une corrélation positive significative avec la réduction du taux de FRAP ($r = 0,241, P = 0,031$). Par conséquent, la baisse du taux d'acide urique pourrait contribuer à une augmentation du stress oxydatif chez les patients HD. Avec la perte de l'acide urique, ceci suggère une faiblesse dans le système de défense contre le stress oxydatif. Des résultats similaires ont été enregistrés par **Gerardi et al., (2002)** et **Mahryar et Omid, (2015)**. Il est bien connu que

l'acide urique possède des capacités de réduction des radicaux libres (**Tarng et al., 2000**). Toutefois, l'acide urique seul ne peut être considéré comme suffisant pour se protéger contre le stress oxydatif déjà accentué chez les patients atteints d'IRCT car d'autres composés endogènes y contribuent également (**Mahryar et Omid, 2015**).

Le taux significativement élevé ($p < 0,05$) du malondialdéhyde (MDA) avant la séance d'hémodialyse comparé au groupe témoin dans cette étude témoigne de l'oxydation des lipides des membranes cellulaires par les radicaux libres. Bien qu'il y ait des résultats controversés dans la littérature indiquant que les séances d'hémodialyse pourraient améliorer le profil lipidique chez les patients avec un état pro-oxydant préalable tels que l'état d'urémie (**Steghens et al., 2005 ; Ramin et al., 2017**), nos résultats confirment ceux d'autres études qui ont suggérées une augmentation de la peroxydation des lipides chez les patients en IRC (**Gonzalez et al., 2006 ; Bhaskaran et al., 2007; Varan et al., 2010 ; Mahryar et Omid, 2015**). Par ailleurs, certaines études n'ont rapporté aucune différence significative dans le taux plasmatique du MDA après la dialyse et le groupe contrôle (**Erdogan et al., 2002**). Dans notre étude, bien que le taux de MDA baisse significative après une séance de dialyse, ce taux est resté deux fois supérieur au groupe témoin chez les patients de sexe masculin. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Steghens et al., (2005)** qui ont également rapporté un taux de MDA deux fois supérieur au groupe témoin sur une population française. La baisse significative du taux de MDA après une séance de dialyse est probablement due à l'effet utile de l'HD sur les aminothiols plasmatique qui sont les principaux marqueurs de l'oxydation (**Himmelfarb et al., 2002**). Par ailleurs, les études de **Steghens et al., (2005)** effectué sur l'influence de l'hémodialyse sur les concentrations de MDA totales et libres, mesurées par une nouvelle technique HPLC spécifique affirment que, les séances d'hémodialyse entraînent une diminution très significative du MDA total et libre. Cependant, la diminution du MDA libre serait plus faible que celle de l'urée et de la créatinine. Or, leurs Poids moléculaires respectifs (60, 72 et 113 Da pour l'urée, le MDA et la créatinine) n'expliquent pas la différence des pourcentages d'épuration ($74,3 \pm 1,3\%$; $48,7 \pm 2,5\%$ et $63,2 \pm 1,1\%$). D'une part, cela suggère que le MDA libre, par sa haute réactivité chimique, est plus ou moins lié à des composés inconnus de faible poids moléculaire, diminuant son passage transmembranaire. Les travaux de **Morena et al., (2000)** sur une population française montrent que le traitement par hémodialyse est la principale source de l'augmentation de dommages oxydatifs chez les patients hémodialisés plutôt que la maladie elle-même. Dans notre étude, le taux de MDA significativement élevé avant et après une séance de dialyse comparée au groupe témoin

témoigne une production des radicaux libres avec augmentation du stress oxydatif chez nos patients hémodialysés.

Les résultats des études de l'effet de l'hémodialyse sur les antioxydants enzymatiques sont controversés. Dans la présente étude, aucune différence significative ($p > 0.05$) n'a été observée pour les antioxydants enzymatiques GPX et catalase avant et après la dialyse comparée au groupe témoin. Nos résultats sont similaires à d'autres études (**Durak et al., 1994 ; Ozden et al., 2002 ; González et al., 2006**). Cependant **Meerashivashekar et al., (2012)** ont rapporté que le taux plasmatique de GPX et de catalase augmentent significativement après une séance d'HD chez les patients en IRC. Des travaux récents suggèrent que la membrane de dialyse affecte l'activité antioxydante enzymatique. **Eiselt et al., (1996)** ont rapporté que l'activité de la SOD et de la GPX étaient plus élevées chez les patients dialysés avec la membrane de l'acétate de cellulose par rapport à ceux dialysés avec de la membrane de polysulfone. Dans notre étude, que ce soit dans la population générale comme dans le genre, la SOD était significativement plus élevée avant et après une séance de dialyse comparée au groupe témoin ($p < 0.05$). Nos résultats sont similaires à ceux de **Aysun, (2008)** qui après étude de l'effet de l'hémodialyse sur le stress oxydatif chez les patients Turques atteints d'insuffisance rénale chronique a également rapporté un taux de SOD significative élevé comparé au groupe témoin. En effet, la SOD est un antioxydant enzymatique essentiel du mécanisme d'élimination des radicaux libres (**Mates et al., 1999**). L'augmentation de l'activité de la SOD serait un mécanisme de protection pour les cellules à cause de l'hyperproduction des radicaux libres dans les maladies d'IRC (**Aysun, 2008**).

Plusieurs études ont rapporté une variation du taux de FRAP, de vitamine C et E avant et après une séance d'hémodialyse. Dans notre étude, les résultats sur la baisse significative du taux de FRAP après une séance d'hémodialyse confirment ceux d'autres études qui ont également rapporté un taux significativement faible de FRAP après une séance de dialyse comparé à ceux du groupe témoin (**Montazerifar et al., 2010 ; Ogunro et al., 2014**). Le taux de vitamine C et E était significativement faible dans la population générale après une séance d'hémodialyse comparé au groupe témoin ($p < 0,05$). Chez les patients hémodialysés de sexe masculin, le taux de vitamine C et E significativement faible après une séance d'hémodialyse comparé au groupe témoin a été signalé par d'autres études (**Morena et al., 2000 ; Block et al., 2009 ; Hamid et al., 2011**). En outre, l'étude de **Hamid et al., (2011)** montrent que, la vitamine C est effectivement dialysée et son taux a tendance à être faible en absence de supplémentation. Chez les patients hémodialysés de sexe féminin, le taux de vitamine C était significativement plus élevé avant la dialyse par rapport au groupe témoin ($p < 0.05$). En effet,

les patients en hémodialyse dans les deux centres retenus pour notre étude sont généralement sous médication. Ainsi, le taux de vitamine C élevé observé dans notre étude pourra être dû à une consommation d'aliments ou de médicaments contenant de la vitamine C. Les études épidémiologiques, notamment SU-VI-MAX (**Hercberg, 2006**) sur une population occidentale rapporte que les femmes ont un meilleur statut en vitamines antioxydants que les hommes, en valeur relative la part des fruits et légumes dans le modèle alimentaire des femmes étant nettement plus importante. Par ailleurs, cette étude situe à $6\mu\text{g/ml}$ le taux de vitamine C nécessaire pour lutter contre la production des radicaux libres. Dans notre étude, après une séance d'hémodialyse 23% des patients avaient un taux de vitamine C au-dessus du taux acceptable, 60% dans la normale contre 17% de patients tous de sexe masculin en carence de vitamine C. Cette carence pourra être impliquée dans les complications observées à long terme chez nos patients hémodialysés tels que l'anémie, la malnutrition et l'athérogénèse.

La vitamine E est l'antioxydant lipophile le plus important chez les êtres humains. La baisse du taux de vitamine E chez les patients hémodialysés pourrait être due en partie à sa surconsommation comme antioxydant après augmentation de la production des radicaux libres. Le radical de vitamine E formé par attaque des radicaux libres interagit avec la vitamine C et régénère la vitamine E. Dans ce processus, la vitamine C est consommée et la vitamine E est formée (**Aymeleck et al., 2002**). La baisse du taux de vitamine C chez nos patients hémodialysés serait due à une augmentation du stress oxydatif qui provoque la conversion de la vitamine E en radical de vitamine E. Afin de générer la vitamine E, la vitamine C serait donc utilisée, ce qui entraîne sa diminution.

Le glutathion est le principal antioxydant hydrosoluble du cytosol et participe directement à la destruction des composés oxygénés réactifs. Dans notre étude, nous n'avons noté aucune différence significative ($p>0,05$) du taux de GSH chez les patients avant la séance de dialyse par rapport au groupe témoin. Nos résultats sont similaires à d'autres études **Durak et al., (1994)**. Cependant, dans une étude pilote effectuée par **Nnanga et al., (2014)** sur un groupe de patients camerounais hémodialysés, le taux de glutathion réduit (GSH) était significativement faible avant une séance de dialyse comparé à ceux du groupe témoin puis augmente significativement après la séance de dialyse. De même, dans l'étude de **Ozden et al., (2002)** les niveaux de GSH étaient significativement faible par rapport au groupe témoin avant la dialyse. En plus de son pouvoir antioxydant, le GSH joue un rôle clé dans le réseau antioxydant en recyclant les formes oxydées de la vitamine C, restaurant ainsi son pouvoir antioxydant. L'augmentation significative ($p<0,05$) du GSH après une séance d'hémodialyse chez nos patients pourrait donc s'expliquer par une diminution significative du taux

plasmatique de vitamine C suivie d'une augmentation significative des réactions inflammatoires. Cette augmentation significative du GSH pourra être coûteuse pour la cellule dans la mesure où les réserves cellulaires en glutathion se trouvent ainsi diminuées. Ceci est attesté par la baisse significative des capacités d'antioxydants totales du sérum après une séance de dialyse comme observé dans notre étude.

Dans la population générale des patients hémodialysés, nous avons noté une corrélation négative ($r = -0,2457$) et significative ($p < 0,05$) entre le MDA et la vitamine E avant la dialyse. Une corrélation positive ($r = 0,2269$) et significative ($p < 0,05$) entre MDA et le GPX. En outre, chez les patients de sexe masculin, le taux de MDA avant la séance d'hémodialyse était positivement corrélé à la SOD ($r = 0,3231$; $p = 0,03$) et la catalase ($r = 0,5043$; $p = 0,0001$) d'une part et d'autre part négativement corrélé au GSH ($r = -0,4824$; $p = 0,001$), l'albumine ($r = -0,5547$; $p = 0,0001$) et la vitamine E ($r = -0,4390$; $p = 0,003$). Chez les patients de sexe féminin, le MDA était positivement corrélé au GSH ($r = 0,4951$; $p = 0,002$) avant la séance de dialyse. Après la séance de dialyse, le MDA était négativement corrélé à la SOD ($r = -0,3362$; $p = 0,0048$) et positivement corrélé au GPX ($r = 0,4901$; $p = 0,003$) et la catalase ($r = 0,4997$; $p = 0,002$).

Des études suggèrent que l'âge est associé à l'activité antioxydant. C'est-à-dire que l'augmentation de l'âge serait associée à la diminution de l'activité antioxydant. Dans notre étude, les facteurs associés (âge, IMC, sexe et durée d'hémodialyse) à un changement des différents paramètres étudiés avant et après la dialyse ont été évalués. Le sexe avait un impact significatif sur la variation de FRAP ($r^2 = 0,241$; $p = 0,0003$) après une séance de dialyse et un impact non significatif sur la catalase ($r^2 = 0,07$; $p > 0,05$). En outre, la durée d'hémodialyse avait un impact non significatif sur le GRx ($r^2 = 0,093$; $p > 0,05$) alors que l'âge et l'IMC n'avaient aucun impact sur les différents paramètres étudiés. Nos résultats sont contraires à ceux de **Steghens *et al* (2005)**, qui n'ont trouvé aucune association entre d'une part l'âge des patients, leur sexe, leur IMC, leur durée d'HD et d'autre part les paramètres du stress oxydant. Le recrutement des patients non randomisés par Steghens *et al* ainsi que l'absence de prise en compte de plusieurs facteurs biologiques connus pour influencer la balance oxydants/antioxydants expliquerait ce résultat. Ces facteurs étant connus pour influencer la balance oxydants/antioxydants, respectivement chez les sujets sains et les insuffisants rénaux.

L'hémodialyse conduirait à des changements importants dans le système antioxydant du sang des patients atteints d'insuffisance rénale chronique. L'effet est perceptible avec l'augmentation des réactions inflammatoire, de l'activité des antioxydants enzymatiques et les

concentrations de composants non enzymatiques. Cela est susceptible d'entraîner un risque accru de trouble cardiovasculaire chez les patients souffrant d'IRCT et un risque évident de décès par maladie cardiovasculaire.

Le fonctionnement correct des chaînes de traitement des eaux pour hémodialyse a besoin d'un entretien préventif, périodique et le remplacement régulier des composants usés ou épuisés par un personnel compétent et formé. La désinfection de routine des membranes d'osmose inverse et le système de distribution d'eau, y compris les générateurs d'hémodialyse connectés au système devraient être soumis à la désinfection au moins une fois par mois voire une fois par semaine pour minorer le risque d'entretenir un état inflammatoire source de malnutrition et de maladies cardiovasculaires (**Roux, 2001**). Il est actuellement possible d'utiliser des agents chimiques et physiques selon les recommandations du fabricant pour une désinfection mensuelle du circuit de traitement des eaux d'HD.

Dans les centres d'hémodialyse du CHUY et de l'HGD retenus pour notre étude, la désinfection du circuit de traitement des eaux était réalisée mensuellement avec du **TIUTOL KF**, une solution concentrée à haute efficacité pour la désinfection thermochimique et ayant une activité bactéricide, tuberculocide, fongicide et virucide.

Chaque semaine, les patients sous HD sont exposés à environ 400 et 600 litres d'eau utilisées pour HD (**Pontoriero et al., 2003**). Des concentrations élevées de bactéries peuvent présenter des risques de bactériémie ou d'endotoxémie chez les patients en HD en raison de la possibilité de passage des endotoxines bactériennes à travers la membrane d'hémodialyse (**Hoenich et al., 2007**).

Une variété de microorganismes peut se multiplier rapidement dans l'eau pour HD. Si le niveau de contamination bactérienne dépasse alors les limites actuellement acceptables (<100UFC/mL), les patients HD se trouvent exposés à des septicémies ou à des endotoxémies par les bactéries à Gram négatif avec des conséquences à long terme comme : La malnutrition, l'inflammation et l'athérosclérose à l'origine de maladie cardiovasculaire.

La charge bactérienne élevée (200 à 350 UFC/mL) détectée dans notre étude démontre qu'elle était au-dessus des normes internationales (>100UFC/mL). Ces résultats sont différents de ceux de **Montanarie et al., (2009)** effectué dans un centre d'hémodialyse de la ville de Sao Paulo au Brésil, avec une charge faible de (2,5 à 3,0 UFC/mL) bactéries détectées. Nos résultats sont toutefois similaires à ceux de **Pisani et al., (2000)** effectués à l'hôpital de Campinas au Brésil qui rapportent une charge de 300 UFC/ml dans l'eau pour HD.

D'après **Ragon, (2004)** le circuit de distribution de l'eau pour HD doit être désinfecté régulièrement (au minimum 1 fois par mois voire 1 fois par semaine) pour éviter le développement d'un biofilm. Nos résultats montrent la présence d'un biofilm dans le circuit de distribution de l'eau du centre d'hémodialyse du CHUY car il existe peu de différences sur le nombre de colonies isolées entre les points de prélèvement A, B et C. Ceci pourrait traduire une faiblesse dans le système de désinfection du circuit de distribution de l'eau pour HD au CHUY.

La plupart des micro-organismes isolés dans l'eau pour HD au CHUY étaient des bacilles à Gram négatif (50%), les Cocci à Gram positif (33,3%) et les Bacilles à Gram positif (16,7%). Dans le centre D'HD de l'HGD, nous avons eu respectivement 54%, 23% et 23% pour les bacilles Gram négatifs, les Cocci à Gram positif et les Bacilles à Gram positif. Ces résultats sont superposables à ceux de (**Silva et al., 1996 ; Reis et al., 1998 ; Santos et al., 2000 et Rebecca, 2013**). Dans l'étude de **Santos et al., (2000)** cependant, environ 90% des bactéries isolées étaient Gram négatif, avec une nette prédominance du genre *Pseudomonas*, qui était capable de se multiplier rapidement, même dans l'eau stérile, atteignant des concentrations élevées (> 100 000 UFC/mL) en moins de 48 h. La présence du glucose et du bicarbonate dans les solutions de dialyse, favoriserait une croissance bactérienne encore plus rapide et par conséquent une production importante de toxine provoquant des infections fréquentes en hémodialyse, la principale cause de morbidité chez ces patients (**Oth et al., 2000 ; Hoenich et Ronco, 2007**).

Les bactéries les plus fréquemment isolées dans l'eau pour HD au CHUY étaient des genres *Pseudomonas sp* (30,6%), *Staphylococcus sp* (26,1%), *Bacillus sp* (13%), *Klebsiella sp* (13%), *Aeromonas sp* (13%) et *Pasteurella sp* (4,3%). Dans le service d'HD de l'HGD ils étaient du genre *Pseudomonas sp* (38.5%), *Staphylococcus sp* (23%), *Bacillus sp* (23%), et *Klebsiella sp* (15.5%). Ces résultats se rapprochent de ceux de **Arvanitidou et al., (2003)** qui rapportent une prédominance de *Pseudomonas* (44%) et de *Staphylococcus* (23%) dans l'eau pour HD. Des fréquences très différentes d'isolement de 1,6% et 56% respectivement, ont été décrites toute fois pour le genre *Pseudomonas* par **Zunino et Beltran, 2002 ; Pisano et al.,(2000)**

Les études d'**Arduino, (1991)** et de **Bambauer et al., (1994)** ont montré que les bactéries les plus couramment isolées dans l'eau potable et l'eau pour HD étaient du genre *Pseudomonas*. Dans notre étude, la fréquence du genre *Pseudomonas* isolée dans les deux centres est préoccupante, compte tenu de la résistance bien connue du genre *Pseudomonas* aux biocides et aux antibiotiques. Le genre *Pseudomonas* est souvent cité comme agent causal

dans les rapports de septicémie et d'endotoxémie (**Arduino et al., 1991 ; Oie et al., 2003 ; Jaber, 2005**).

L'identification majoritaire des bactéries à Gram négatif dans cette étude pose un réel problème de santé publique dans la mesure où, les éléments constitutif de la membrane externe de la paroi des bactéries Gram négatif (endotoxines) sont capables de stimuler les monocytes (globules blancs du sang circulant) et les macrophages (monocytes résidents dans les tissus). Ceux-ci vont sécréter des cytokines (médiateurs cellulaires) provoquant l'inflammation de différents tissus de l'organisme à l'origine de multiples complications dégénératives (**Man, 2007**). De même, les médiateurs cellulaires générés par les monocytes sous l'action des bactéries à Gram négatif peuvent augmenter la dégradation des protéines, une diminution de la synthèse hépatique de l'albumine et une anorexie (**Man, 2007**). Des études à long terme ont ainsi montré une corrélation étroite entre la présence de bactéries et d'endotoxines dans l'eau pour hémodialyse et les taux des marqueurs de l'inflammation (C-reactive protein) et de malnutrition (albumine). Le changement de qualité microbiologique de l'eau pour hémodialyse, de contaminé à ultrapur est accompagné par une réduction significative du taux de CRP et l'augmentation significative du taux d'albumine, attesté par un gain de poids et l'augmentation des muscles du bras (**Sitter et al., 2000 ; Schiffli et al., 2001**). Semblable aux lipoprotéines, l'albumine sérique peut se lier aux bactéries à Gram négatif et donc atténuer l'activation de la cascade de cytokines qui se produirait autrement chez les patients hypoalbuminémiques (**Rauchhaus et al., 2000 ; Jurgens et al., 2002**). Conformément à cette hypothèse, dans notre étude, l'augmentation du risque de décès due à une infection serait plus élevée au vue du taux faible d'albumine chez nos patients HD comparé au groupe contrôle.

**CONCLUSION GÉNÉRALE,
RECOMMANDATIONS ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif général de ce travail était d'évaluer les marqueurs du stress oxydant chez les patients camerounais en hémodialyse chronique et d'étudier la qualité bactériologique de l'eau pour hémodialyse dans deux centres de référence d'hémodialyse. Il en découle les conclusions suivantes :

- ❖ L'hémodialyse sur membrane en polysulfone diminue significativement le taux d'urée (92%) et de créatinine plasmatique (84%), ce qui permet d'améliorer l'état clinique du patient.
- ❖ La diminution cholestérol total (42,5%) et du Cholestérol-HDL (33%) sont fréquentes chez les patients sous hémodialyse. Ceci entraîne l'augmentation de l'indice d'athérosclérose de 29% avec pour conséquence un risque accru de développement de maladie cardiovasculaire après une séance de dialyse.
- ❖ L'hémodialyse affecte significativement les paramètres du stress oxydatif par l'augmentation du taux de Malondialdéhyde (58%) et la diminution des agents antioxydants, principalement la capacité antioxydante totale du sérum (20%) et le taux de vitamine C (49%).
- ❖ L'eau utilisée pour hémodialyse dans les deux centres d'hémodialyse est majoritairement contaminée par les bactéries à Gram négatif en l'occurrence des genres *Pseudomonas sp* qui contribuent à l'augmentation des réactions inflammatoires et du stress oxydatif.

RECOMMANDATIONS

Après changement complet du circuit de traitement de l'eau pour hémodialyse par la direction générale du CHUY à la suite de nos travaux, nous recommandons aux personnes intervenant dans la prise en charge des patients en insuffisance rénale chronique au Cameroun :

- ❖ D'améliorer l'éducation nutritionnelle dans les programmes de prise en charge des patients en IRC.
- ❖ De désinfecter régulièrement le circuit de distribution de l'eau pour HD au moins une fois par mois, voire une fois par semaine.
- ❖ D'effectuer un contrôle microbiologique mensuel de l'eau pour hémodialyse afin de s'assurer de sa conformité.

PERSPECTIVES

Dans l'optique de l'amélioration de ce travail, nous proposons dans un futur proche de :

- ❖ Déterminer l'influence de l'hémodialyse sur les concentrations d'urée et de créatinine, mesurées par une nouvelle technique HPLC;
- ❖ Evaluer l'effet d'une supplémentation en Oméga 3 issus d'huile de poissons sur le profil lipidique des patients camerounais atteints d'insuffisance rénale chronique;
- ❖ Rechercher l'effet de l'hémodialyse sur les paramètres immunologique ;
- ❖ Etendre notre étude d'analyse bactériologique de l'eau pour hémodialyse à d'autres centres au Cameroun.

RÉFÉRENCES

I- Bibliographie

- 1- **Abderrahim, B., Darkaoui, A., Houari, N., Attaraf K., Youssef B., Labib S., Harandou, M.** (2010). Perforation iléale iatrogène: complication mécanique exceptionnelle de la pose du cathéter d'hémodialyse au niveau du site fémoral. *Pan African Medical Journal*, 5: 24.
- 2- **Aebi, H.** (1984). Catalase in vitro. Methods. *Journal of Enzymology*, 105 ; 121-126.
- 3- **Aparicio M (2000)**. Traitement des dyslipidémies de l'insuffisance rénale chronique : Place respective des statines et de la diététique. *Journal of Néphrology*, 21 (7) : 381-382
- 4- **Arduino, M.J., Bland, L.A., Agüero, S.M.** (1991). Comparison of microbiologic assay methods for hemodialysis fluids. *Journal of clinical Microbiology*, 29: 592-594.
- 5- **Arici, M., Walls, J.** (2001). Maladie rénale terminale, athérosclérose et mortalité cardiovasculaire: la protéine C-réactive est-elle le chaînon manquant? *Kidney International journal*, 59: 407-14.
- 6- **Arvanitidou, M., Vayona, A., Spanakis, N et Tsakris, A.** (2003). Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. *Journal of Applied Microbiology.*, 95: 180-185.
- 7- **Ashfaq, A., Abdul, H., Dilshad, A., Muhammad, K., Fatima T., Imran, S.** (2007). Assessment of lipid dysfunction in patients on maintenance haemodialysis; *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 19(4): 32-36.
- 8- **Aymelek, G., Yesim, A., Mehmet, N., Bolkan, S.** (2002). Lipid peroxidation and antioxidant systems in hemodialyzed patients. *Néphrology Dialysis Transplant Journal*, 31:88-96.
- 9- **Aysun, H.** (2008). Effect of hemodialysis on oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Journal of Pharmacology*, Ankara 37 (2) 91 – 100
- 10- **Bambauer, R., Schauer, M., Jung, W., Daum, V. et Vienken, J.** (1994). Contamination of dialysis water and dialysate. A survey of 30 centers. *ASAIO Journal.*, 40: 1012-1016.
- 11- **Batta, F.** (2011). Caractérisation de l'impact de la biocompatibilité des membranes d'hémodialyse et leur changement sur le stress oxydant : étude biologique et par IRMF-BOLD p 70-75. Thèse doctorale en médecine. Université SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH, Maroc
- 12- **Beaman, L., Beaman, L.** (1984). The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Annual Review of Microbiology.*, 38 ; 27-48.
- 13- **Béani, J.** (1995). Actions biologiques du rayonnement solaires sur la peau. *Revue Internationale de Pédiatrie*, 259bis ; 2-7.

-
- 14- **Beaudeau, J., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A., Peynet, J.** (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 21 ; 144-150.
- 15- **Beaudreuil, S., Hebibi, H., Charpentier, B. et Durrbachr, A.** (2008). Les infections graves chez les patients en dialyse péritonéale et en hémodialyse chronique conventionnelle: péritonites et infections de la voie d'abord vasculaire. *Journal of Nephrology*, 17 (3): 233-241.
- 16- **Beebe, D., Holekamp, N. M., Shui, Y.-B.** (2010). Oxidative Damage and the Prevention of Age-Related Cataracts. *Ophthalmic Reseach Journal.*, 44 ; 155-165.
- 17- **Belaich, S., Marck, Y.** (1997). Les dermatoses allergiques professionnelles. *Revue Francaise Allergologie.*, 37 bis ; 943-946.
- 18- **Berliner, J., Hzincke, J. W.** (1996). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology and Medecine.*, 20 ; 707-727
- 19- **Bhaskaran, M., Radhakrishnan, N., patni, H., Singh, P., Chaudhary, A., Singhal, P.**, (2007). Dialysis membrane-induced oxidative stress: Role of heme oxygenase-1. *Nephron Experimental Nephrology journal*, 105: e24-e32
- 20- **Blanc, D, (2012).** « l'eau a l'hôpital quelle qualité pour quelle utilisation, quels contrôle ? »
- 21- **Block, G., Jensen, C., Dalvi, T., Norkus, E., Hudes, M., Crawford, P. B.** (2009). Vitamin C treatment reduces elevated C-reactive protein. *Free Radical Biology and Medicine*, 46: 70-77.
- 22- **Bostom, A. et Lathrop, L.** (1997). Hyperhomocysteinemia in end stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerosis outcomes. *Kidney International Journal*, 52:10-20.
- 23- **Bostom, A., G., Kronenberg, F., Ritz, E.** (2002). Predictive performance of renal function equation for patients with chronic kidney disease and normal serum creatinine levels. *Americal Society of Nephrology Journal*, 13: 2140-2144.
- 24- **Bro, S., Bentzon, J., Falk, E., Andersen, C., Olgaard, K., Nielsen, L.** (2003). Chronic renal failure accelerates atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Americal Society of Nephrology Journal*, 14(10):2466-74.
- 25- **Brunet, P. et Berland, Y.** (2000). Water quality and complications of haemodialysis. *Journal of Nephrology and Dialysis Transplantation*, 15, 578-580.
- 26- **Cachofeiro, V., Goicochea, M., Garcia, D., Vinuesa, S., Oubina, P., Lahera, V. et Luno, J.**, (2008). Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney International Journal*; 74: 54-59.

-
- 27- **Caparevic, Z., Kostic, N.** (2007). The influence of age and the beginning of menopause on the lipid status, LDL oxidation, and CRP in healthy women. *Serbian Archives of biology*, 135(5-6):280-5.
- 28- **Carbonneau, M., Peuchant, E., Sess, D., Canioni, P., Clerc, M.** (1991). Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clinical Chemical Acta.*, 37 ; 1423-1429
- 29- **Cartizone, L.** (1999). Guide de la dialyse. Paris : springer p.102
- 30- **Chan, A.** (1993). Parteniers in defense, vitamine E and vitamine C. *Canadian Journal of Psychology and pharmacology*, 71: 725-731
- 31- **Charmes, J., Merle, L.** (1996). Les conséquences du vieillissement rénal en thérapeutique. *Revue Gériatrie*, 21: 447-52
- 32- **Charriere, S., Rognant, N., Chiche, F., Cremer, A., Deray, G., Priou, M.** (2009). Insuffisance rénale chronique et maladie cardiovasculaire. *Annal de Cardiologie et d'Angéiologie*; 58: 40-52.
- 33- **Chellan, P. et Nagaraj, R.** (1999). Protein crosslinking by the Maillard reaction : dicarbonyl-derived imidazolium crosslinks in aging and diabetes. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 386: 98-104.
- 34- **Christen, Y.** (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Journal of American College of Nutrition*, 71 ; 621-629.
- 35- **Cook, N., Albert, C., Zaharris, E., Gaziano, J. M., Mac Fadyen, J., Danielson, E., Buring, J. E., Manson, J. E.** (2007). A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women : results from the women's antioxidant cardiovascular study. *Archives of International Medecine*, 167; 1610-1618.
- 36- **Couchoud, C., Lassalle, M., Stengel, B., Jacquelinet, C.** (2008). Registre du Réseau Epidémiologie Information en Néphrologie (REIN) Rapport p99
- 37- **Cousin, P.** (1999). Traitement d'eau en hémodialyse, Stage SPIBH, UTC, 98-99, pp 59
- 38- **Dialysis-associated complications and their control.** (2007). in bennett and branchman's hospital infections, 5th ed., Philadelphia : Wolters Kluwer Health/lippincott Williams and Wilkins, p. 344
- 39- **Durak, I., Akyol, O., Basesme, E., Canbolat, O., Kavutçu, M.** (1994). Reduced erythrocyte defense mechanisms against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. *Journal of Nephrology*, 66:76-80.

-
- 40- **Eiselt, J., Racek, J., Holecek, V., Krejcova, I., Opatrny, K.** (1996). Antioxidants and malondialdehyde during hemodialysis with cellulose diacetate and polysulfone membranes. *Cas Lek Cesk*, 135.
- 41- **Ellman, G., C.** (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 82: 70-77.
- 42- **Erdogan, C., Unlucerci, Y., Turkmen, A.** (2002). The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Clinical Chimical Acta*, 322 (1-2):157-61.
- 43- **Favier, (1997).** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en evidence en biologie médicale et probleme posés par le choix d'un marqueur. *Annal de Biologie Clinic*, 55:9-16.
- 44- **Favier, (2006).** Stres oxidant et pathologie humaines. *Annal de Pharmacologie Francaise*, 64 : 390-396
- 45- **Fernandez-reyes, M., Alvarez, F., Sanchez, R., Mon, C., Iglesias, P., Diez, J.** (2002). Inflammation and malnutrition as predictors of patints on hemodialysis. *Journal of Nephrology*, 15:136-143.
- 46- **Ferradini, C.** (1986) ; Espèces activées radicalaires de l'oxygène. *Biochimie*, 68 ; 779-785.
- 47- **Filiopoulos, V., Hadjiyannakos, D., Takouli, L., Metaxaki, P., Sideris, V., et Vlassopoulos, D.** (2009). Inflammation and oxidative stres in end stage renal disease patients treated with hemodialysis or peritoneal dialysis. *The International Journal of Artificial Organs*; 32, 12: 872-882.
- 48- **Gallo, C., Renzi, P., Loizzo, S., Loisso, A., Festa, M., Caputo, M., Tecce, M., F., Capasso, A.** (2010). Potential Therapeutic Effects of vitamine E and C on placental Oxidative stress Induced by Nicotine: An Vitro Evidence. *Open Biochemitry Journal*, 4: 77-82.
- 49- **Gambro.** (2010). « mesure de la pureté de l'eau ». Une approche en 3 étapes pour comprendre, évaluer et éviter la contamination microbiologique, www.gambro.com, Consulté le 20-09-2015 à 22h
- 50- **Gazdik, Z., Zitka, O., Petrlova, J., Adam, V., Zehnalek, J., Horna, A., Reznicek, V., Beklova, M., Kizek, R.** (2008). Determination of vitamin C (ascorbic acid) using high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Journal of Biochemistry*, 8 ; 7097-7112.
- 51- **Gerardi, G., Usberti, M., Martini, G., Albertini, A., Sugherini, L., Pom-pella, A.** (2002). Plasma total antioxidant capacity in hemodia-lyzed patients and its relationships to other biomarkers of oxi-dative stress and lipid peroxidation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40 (2) 104-110

- 52- **Giasson, B., Duba, J. E.** (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, 290 ; 985-989.
- 53- **Gilbert, D.** (1997). Oxygen and living processes. Springer-Verlag ed, New York, 73 ; 102.
- 54- **Glade, M.,** (1999). Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. *Journal of Nutrition*, 15; 523-526.
- 55- **Glaser, D., Rogers, C.** (2001). Tropical and systemic therapies for the aging face. *Facial Plast. Surgical Clinics of North America.*, 9 ; 189-196.
- 56- **Go, A. S., Chertow, G. M., Fan, D., McCulloch, C. E., Hsu, C. Y.** (2004). Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *England Journal of Medecine*, 351:1296– 1305.
- 57- **Gonzalez, Rico, M., Puchades, M., Garcia, Ramon, R.** (2006). Effect of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Journal of Nefrologia*, 26(2):218-25.
- 58- **Goodlick, L., Kane, A.** (1986). Role of reactive oxygen metabolites in crocidolite asbestos toxicity to mouse macrophages. *Cancer Reseach Journal.*, 46 ; 5558-5566.
- 59- **Guebre-Egziabher et Fouque, D.** (2003). Consequences métaboliques de l'inflammation au cours des néphropathies. *Journal de Néphrologie*, 24 (7): 383-386.
- 60- **Guérin, A. et London, G.** (2001). Facteurs de risque vasculaire chez l'insuffisance rénale. *Edition Cardinale*, France, Tome XIII 8:10.
- 61- **Guillang, J., Lhuissier, M.** (1996). Vitamine E et activité sportive. *Cahier de Nutrition et Dietetique*. 31; 267-276.
- 62- **Hamid, T. K., Yashar, T., Siamar, A., Afshin, H., Seyyed, E. M., Mohammadreza, K.** (2011). The Effects of Intravenous Vitamin C Administration on hs-CRP and Tumor Necrosis Factor- α Levels in Haemodialysis Patients. *Functional Foods in Health and Disease*, 8:255-261
- 63- **Hassan, H.** (1988) Biosynthesis and regulation of superoxide dismutase. *Free Radical. Biology and. Medecine.*, 5 ; 377-385.
- 64- **Hercberg, S.** (2006) The supplementation en vitamines et minéraux antioxydants (SU.VI.MAX) study, a randomized, placebo controlled trial on the effets of antioxidant vitamins and minerals on health]. *Annales Pharmaceutiques Francaise* 64(6): 397-401.
- 65- **Himmelfarb, J., McMonagle, E., McMenamin, E.** (2000). Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney International Journal*, 58:2571-8.
- 66- **Hoenich, A. et Ronco, C.** (2007). Hemodialysis fluid: composition and clinical importance. *Journal of Blood Purification*, 25: 62-68.

-
- 67- **Honda, H. et al.** (2009). Ultrapure dialysate influences serum myeloperoxidase levels and lipid metabolism. *Journal of Blood Purification*, 28:29-39
- 68- **Horl, W., Cohen, J., Harrington, J., Madias, N., Zusman, C.** (2004). Atherosclerosis and uremic retention solutes. *Kidney International Journal*, 66(4):1719-31.
- 69- **Hoshino, E., Shariff, R., Gossum, A.** (1990). Vitamin E suppresses increased lipid peroxidation in cigarette smokers. *J. Parent. Enter. Nutr.*, 14 ; 300-305.
- 70- **Human, D.** (2002). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Sci. Aging Knowl. Environ.*, 37 ; 14.
- 71- **INSERM**, (1998). Expertise collective. Insuffisance rénale chronique : étiologie, moyen de diagnostic précoce, prévention ? Paris, *INSERM* p88
- 72- **Jaber, B.** (2005). Bacterial infections in hemodialysis patients: pathogenesis and prevention. *Kidney International Journal*, 67: 2508-2519.
- 73- **Jang, C., Bell, R., White, V., Lee, P., Dwyer, K., Kerr, P. et al.** (2001). Women's health issues in haemodialysis patients. *Australian Medicine Journal*, 175(6):298-301.
- 74- **Jungers, P., Joly, D., Man, N. K., Legendre, C.** (2011). L'insuffisance rénale chronique, prévention et traitement Paris, *Lavoisier*
- 75- **Jurgens, G., Muller, M., Garidel, P. et al.** (2002). Investigation sur l'interaction de l'albumine sérique humaine recombinante avec le re-lipoplysaccharide et le lipide A. *Journal of Endotoxine Reseach*, 8 : 115-126
- 76- **Kalantar-Zadeh, K.** (2005). Recent advances in understanding the malnutrition-inflammation-cachexia syndrome in chronic kidney disease patients: What is next? Seminar Dialysis. Sep-Oct;18 (5):365-9.
- 77- **Kalantar-Zadeh, K., Block, G., Humphreys, M., Kopple, J.** (2003). Reverse epidemiology of cardiovascular risk factors in maintenance dialysis patients. *Kidney International Journal*, 63(3):793-808
- 78- **Kalantar-Zadeh, K., Kilpatrick, R., Kopple, J., Stringer, W.** (2005). A matched comparison of serum lipids between hemodialysis patients and nondialysis morbid controls. *Hemodialysis International Journal*, Jul; 9 (3):314-24.
- 79- **Kamyar, k., Ruan, D., Noriko, K., Charles, J., Harry, A., Kopple, J.** (2005). Revue de la prévisibilité de la mortalité de l'albumine sérique dans la population de dialyse: dépendance au temps, changements longitudinaux et fraction attribuable à la population. *Journal of Nephrology Dialysis and Transplantation*, 20 (9): 1880-1888.

- 80- **Kaplan, M., Hayek, T., Raz, A.** (2001). Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *Journal of Nutrition*, 131 ; 2082-2089.
- 81- **Karelson, E., Bogdanovic, N., Garlind, A.** (2006). The cerebrocortical areas in normal brain aging and in Alzheimer disease : noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Reseach Journal.*, 26 ; 353-361.
- 82- **Kato, A., Odamak, M., Hishida, A.** (2003). Blood 8-hydroxy-20-deoxyguanosine is associated with erythropoietin rsistance in haemodialysepatients. *Journal of Nephrology Dialysis and Transplantation*, 18: 931-936.
- 83- **Kaysen, G.** (2000). Inflammation et stress oxidant dans l'insuffisance rénale terminale. *Actualités Néphrologique, inflammation Medicine-Sciences*: p35-46.
- 84- **Kaysen, G. A., Dubin, J. A., Muller, H. G., Mitch, W. E., Rosales, L. M., Levin, N. W.** (2002). Relations entre inflammation, nutrition et mécanismes physiologiques établissant des niveaux d'albumine chez les patients hémodialysés. *Kidney international journal*, 61 : 2240-2249
- 85- **Kiswaya Sumaili** (2009). Épidémiologie de la maladie rénale chronique à Kinshasa p 60-78. Thèse de Doctorat présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Médicales. Université de Liège, Belgique. Consulté le 23/08/2015 à 24h
- 86- **Klein, E., Pass, T., Harding, G.B., Wright, R0, Million, C.** (1990). « Microbial and endotoxin contamination in water and dialysate in the central United States », *Artif Organs*, vol.14, n°2, p.85-94
- 87- **Korantzopoulos, P., Kolettis, T. M., Kountouris, E., Dimitroula, V., Kranikis, P., Pappa, E., Siogas, K., Goudevenos, J. A.** (2005). Oral vitamin C administration reduces early recurrence rates after electrical cardioversion of persistent atrial fibrillation and attenuates associated inflammation. *International Journal of Cardiology.*, 102 ; 321-326.
- 88- **Laguerre, J., Lecomte, P., Villeneuve,** (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipide Reseach*, 46: 244-282.
- 89- **Larrick, J., Graham, D., Toy, K.** (1897). Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes. *Journal of Blood Purification*, 69 ; 640-644.
- 90- **Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F.** (1998). Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annal de Biologie Clinique.*, 56 ; 305-319.

-
- 91- **Lehucher-Michel, M. J. F., Lesgards, O., Delubac, P., Stocker, P., Durand, M.** (2001). Prost ; Stress oxydant et pathologies humaines. *Presse Medicale Journal*, 30 ; 1076-1081.
- 92- **Levey, A. S., Bosch, J. P., Lewis, J. B., Greene, T., Rogers, N., Royh, D.** (1999). A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Annal of Internal Medecine*, 130: 461-470.
- 93- **Lewis, J., Agodoa, L., Cheek, D., Green, T., Middleton, J., O'Connor, D., Ojo, A., Philips, R., Sika, M., Wright, J.** (2001). African-American Study of Hypertension and Kidney Disease: Comparison of cross-sectional renal function measurements in African American with hypertensive nephrosclerosis and of primary formulas to estimate glomerular filtration rate. *American Journal of Kidney Disease*, 38: 744-753.
- 94- **Li, Y., Schellhorn, H.** (2007). New developments and novels therapeutic perspectives for vitamin C. *Journal of Nutrition.*, 137 2171-2184.
- 95- **Lin, J., Cook, N. R., Albert, C., Zaharris, E., Gaziano, J. M., Van Denburgh, M., Buring, J. E., Manson, J. E.** (2009). Vitamins C and E and beta carotene supplementation and cancer risk : a randomized controlled trial. *Journal of Nutrition and. Cancer.*, 101 14-23.
- 96- **Locatelli F, Canaud B, Eckardt K, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C** (2003). Oxidative stress in end stage renal disease : an emerging threat to patient outcome. *Journal of Néphrology and Dialysis Transplantation*, 18 : 1272-1280.
- 97- **Longenecker, J., Coresh, J., Powe, N., Levey, A., Fink, N., Martin A., et al.** (2002). Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE Study. *American Journal of Nephrology*, 13(7):1918-27.
- 98- **Magder, S.** (2006). Reactives oxygen species : toxic molecules or spark of life? . *Crit. Care*, 10 ; 208.
- 99- **Magnani, L. Gaydou M, and Jean C** (2000). Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Clinical Chemical Acta*, 2000, 411(1-2) 1: 209-216.
- 100- **Marieb, E., Hohn, K.** (2010). Biologie humaine : principes d'anatomie et de physiologie Paris, Paerson.
- 101- **Mates, J. M., Perez-Gomez, C., Nunez de Castro, I.** (1999). Antioxidant enzymes and human diseases, *Journal of Clinical Biochemistry.*, 32: 595-603

- 102- **McCord, J., Fridovich, I.** (1970). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrom C reduction by a variety of electron carriers. *Journal of Biological Chemistry*, 245; 1374-1377.
- 103- **McCord, J., Fridovich, I.** (1969). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 244; 6056-6063.
- 104- **Meerashivashekar, W., Revathi, R. P.** (2012). Effect of oxydative stress in pre and post hemodialysis in chronic renal failure patients. *International Journal of Biology and Medicinal Reseach*, 3(1): 1335-7.
- 105- **Mehryar et Omid, S.** (2015). Influence of hemodialysis on lipid peroxidation, enzymatic and non-enzymatique antioxidant capacity in chronic reanl failure patients. *Nephrology Urology Monthly*, 7(4) :e28526.
- 106- **Mekki, K., Bouzidi-bekada, N., Kaddous, A., Bouchenak, M.** (2010). Mediterranean diet improves dyslipidemia and biomarkers in chronic renal failure patients. *Food and Function Journal*, 1: 110-115.
- 107- **Menon, V., Wang, X., Gerald, T. et al.** (2003). Relation entre la proteine C-réactive, l'albumine et les maladies cardiovasculaires chez les patients souffrant de la maladie rénale chronique. *American Journal of Kidney Disease*, 42 : 44-52.
- 108- **Michelson, A.** (1986). Oxygen radicals. Agents. Actions. Suppl., 11 ; 179-201.
- 109- **Milman, U., Blum, S., Shapira, C., Aronson, D., Miller-Lotan, R., Anbinder, Y., Alshiek, J., Bennett, L., Kostenko, M., Landau, M.** (2008). Vitamin E Supplementation Reduces Cardiovascular Events in a Subgroup of Middle-Aged Individuals With Both Type 2 Diabetes Mellitus and the Haptoglobin 2-2 Genotype. A Prospective Double-Blinded. *Journal of Clinical Trial*, 28 (2) 341-7
- 110- **Miyata, K., Rahman, M., Shokoji, T., Nagai, Y., Zhang, Gx., Sun, Gp., Kimura, S., Yukimura, T., Kiyomoto, H., Kohno, M., Abe, Y., Nishiyama, A.** (2005). Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *American Journal of Kidney Disease*, 16(10): 2906-2912.
- 111- **Montanarie, B., Flávio, G.S., Miguel, J.O.C., Samuel, D.V., Regina, H. P., Clarice, Q.F.L, Karina, P. et Carlos H.G.M.** (2009). *Revue Internationale de Médecine tropicale . Sao Paulo* 51(1):37-43.
- 112- **Montazerifar, F., Hashemi, M., Karajibani, M., Dikshit, M** (2010). Hemodialysis alters lipid profiles, total antioxidant capacity, and vitamins A, E, and C concentrations in humans. *Journal of Medicinal Food*. 13 (6):1490–3.

- 113- **Morena, M., Canaud, B., Terrier, N., Canaud, L., Cristol, J.** (2007). Oxidative stress complex syndrome: The dark side of the malnutrition-inflammation complex syndrome. *Hemodialysis International Journal*, 11: 32-38.
- 114- **Morena, M., Cristol, J., Dantoine, T., Carbonneau, M., Descamps, B., Canaud, B.** (2000). Protective effect of high-density lipoprotein against oxidative stress are impaired in hemodialysis patients. *Journal of Nephrology and Dialysis Transplantation*, 15: 389-395.
- 115- **Morena, M., Martin-Mateo, M., Cristol, J. P., Canaud, B.** (2002). Stress oxydant, hémoincompatibilité et Complications de la dialyse au long cours. *Journal of Nephrology and Dialysis Transplantation*, 23(5): 201-208.
- 116- **Nathan, C.** (1987). Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to product of macrophages and lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 80 ; 1550-1560.
- 117- **National Kidney Foundation, KDOQI**, (2002) clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Part 5. Evaluation of laboratory measurements for clinical assessment of kidney disease. Guideline 4. Estimation of GFR.
- 118- **Nasstrom B, Stegmayr B, Olivecrona G, Olivecrona T** (2004). Lipoprotein lipase in hemodialysis patients: indications that low molecular weight heparin depletes functional stores, despite low plasma levels of the enzyme. *BMC Nephrology Journal*. 5 :17
- 119- **Nnanga N., Goulé C., Gueguim C., Etame L., Dimodi H., Halle M., Pieme C and Djokam D.** (2014). Évaluation of Malondialdehyde, vitamine C and Reduced Glutathion Levels in Pre and Post Hémodialysis Patients. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 28 (2): 297-302
- 120- **Nève, J.** (1991). Methods in determination of selenium states. J. Trace Elem. Electrolytes. *Health Science and Diseases Journal.*, 5; 1-17.
- 121- **Nilsson, E., Mikaelsson, B., Atopy, S.** (1985). Occupation and domestic work as risk factors for hand eczema in hospital workers. *Contact Dermatitis journal*, 13 ; 16-23.
- 122- **Norme Francaise.** (2008). Système de traitement et de distribution d'eau pour dilution des solutions concentrées pour hémodialyse – Exigences de conception, exploitation, performance et sécurité. S93-315
- 123- **Ogunro, P., Olujobo, F., Ajala, M., Oshodi, T.** (2014). The effect of a membrane dialyzer during hemodialysis on the antioxidant status and lipid peroxidation of patients with end-stage renal disease. *Saudia Journal of Kidney Disease and Transplantation*. 25(6):1186–93.

- 124- **Oie, S., Kamiya, A., Yoneda, I.** (2003). Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. *Journal of Hospital Infection*, 54: 115-119.
- 125- **Omaye, S., Turbull, T., Sauberlich, H.** (1979). Selected methods for determination of ascorbic acid in cells, tissues and fluids. *Methods in enzymology journal.*, 6: 3-11.
- 126- **Oth, V.R. & Jarvis, W.R.** (2000). Outbreaks of infection and/or pyrogenic reaction in dialysis patients. *Seminar in Dialysis Journal*, 13: 92-96.
- 127- **Ozden, M., Maral, H., Akaydin, D., Cetinalp, P., Kalender, B.** (2002). Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. *Clinical Biochemistry Journal*, 35(4):269-273.
- 128- **Paglia, D. et Valentine, W.** (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxydase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70 ; 158-168.
- 129- **Palloza, P., Krinsky, N. I.** (1992) β -carotène and α -tocophérol are synergistic antioxidants. *Archive Biochemistry and Biophysics*, 297 ; 184-187.
- 130- **Paniez D** (2000). Profil lipidique en dialyse péritoneale. *Néphrologie journal* ; 21 (7) : 361-362
- 131- **Patterson, R. E. T. M., Horsley, D. S., Leake, P.** (2003). Prooxidant and antioxidant properties of human serum ultrafiltrates toward LDL: important role of uric acid. *Journal of Lipid Reseach.*, 44 512-520.
- 132- **Pennell, P., Leclercq, B., Delahunty, M., Walters, B.** (2006). The utility of non-HDL in managing dyslipidemia of stage 5 chronic kidney diseases. *Journal of Clinical Nephrology*, 66(5), 336-47.
- 133- **Pisani, B., Simões, M., Prandi, M.A.G., Rocha, M.M., Gonçalves, C.R., Vaz, T.M., Irino, K.** (2000). Surto de bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. *Revue Insternational Adolfo Lutz*. 59 (1/2), 51-56.
- 134- **Prior, R., Cao, G.** (1999). In vivo total antioxidant capacity : comparison of different analytical methods. *Free Rad. Biol. Med.*, 27 ; 1173-1181.] H. Aebi ; Catalase in vitro. *Methods in Enzymology Journal*, 105 (1984) 121-126.
- 135- **Pontoriero, G., Pozzoni, P., Andrulli, S., Locatelli, F.** (2003). The quality of dialysis water. *Journal of Nephrology and Dialysis Transplantation*, 18 (suppl.7): 21-25.
- 136- **Ramin, T., Mostafa, Q., Golbarg, M., Mitra, R., Mohammad, M., Hossein, M.** (2017). Effect of hemodialysis on oxidants and antioxidant factors in chronic renal failure. *Saudi journal of kidney Disease Transplantation*, 28(3):507-516

- 137- **Rauchhaus, M., Coats, A., Anker, S.** (2000). L'hypothèse endotoxine-lipoprotéine. *Lancette*, 356 : 930-933
- 138- **Rauchhaus, M., Coats, A., Anker, S.** (2002). The endotoxin-lipoprotein hypothesis. *Lancet*, 356(9233):930-3.
- 139- **Rebecca Amato., Curtis, J., & Payne, G.M.** (2013). Water treatment for hemodialysis: An update. *Nephrology Nursing Journal*, 40(5), 383-404, 465.
- 140- **Reis, J.D.P., Faria, N.C., Filter, A.** (1998). Qualidade bacteriológica da água para hemodiálise do Distrito Federal. *Review Saúde Distritos Federal*, 9 (2).
- 141- **Renaud, A.** (2003). Fer, vitamine C et acide folique : convergence sanguine. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 16 281-283.
- 142- **Richard, M., Belleville, F., Chalas, J.** (1997). Les glutathions peroxydases : intérêt de leur dosage en biologie clinique. *Annal de Biologie Clinique.*, 55 ; 195-207.
- 143- **Rieu, P.** (2003). L'insuffisance rénale terminale est une maladie inflammatoire chronique. *Journal de nephrology*, 24(7): 329-333.
- 144- **Roselaar, S., Nazhat, N., Winyard, P., Jones, P., Cunningham, J. et Blake, D.** (1995). Detection of oxidants in uremic plasma by electron spin resonance spectroscopy. *Kidney International Journal*, 48: 199-206.
- 145- **Roux, C., Legoubé, C., Gregoire, M., Marques, E.** (2001). Guide des pratiques pour le traitement de l'eau en unité d'autodialyse et à domicile. *Editions Scientifiques et Médicales*, 22 :299-303
- 146- **Saito, A.** (2011). high performance membrane dialysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 51 ; 522-530.
- 147- **Samuni, A., Aronovitch, J., Godinger, D., Chevion, M. et Czapski, G.** (1983). – On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific Fenton mechanism. *European Journal of Biochemistry*, 137: 119-124.
- 148- **Santos, F, Santos, A, Biernat, J, Souza, M, Raubach, A, Aguirre, A, Antoniazzi, V, Scorsatto, K, Seibel, I, Demin, S, Hickmann, A., Oliveira, F, Borba, E, Simon, S., Santos, S.** (2000). Detecção de endotoxina pelo teste do limulus amoebocyte lysate (LAL) em unidades de hemodiálise. *Rev. Virt. Med.* 54: 115-119
- 149- **Schiffl, H., Lang, S. M., Stratakis, D., Fischer, R.** (2001). Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrology and Dialysis Transplantation Journal*, 16(9) : 1863-9.
- 150- **Schoneich, C.** (2002). Redox processes of methionine relevant to beta-amyloid oxidation and Alzheimer diseases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397 ; 370-376.

- 151- **Sekli-belaidi, F (2011)**. Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly(3,4-éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin. These doctorale en génie chimique. Université Toulouse III, France.
- 152- **Senji, O., Ishimura, E., Kohno, K., Fujino-Katoh, Y., Maeno, Y., Yamakawa, T., Inaba, M., Nishizawa, Y. (2008)**. Serum β_2 -microglobulin level is a significant predictor of mortality in maintenance haemodialysis patients. *Nephrology and Dialysis Transplantation.*, 24 (2): 571-577.
- 153- **Sesso, H., Bring, J. E., Christen, W. G., Kurth, T., Belanger, C., Mac Fadyen, J., Bubes, V., Manson, J. E., Glynn, R. J., Gaziano, J. M. (2008)**. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men : the physician's health study II randomized controlled trial. *American Journal of Medecine and Association*, 300 ; 2123-2133.
- 154- **Sies, H. (1985)**. Oxidative stress : introductory remarks. H. Sies editor: *Academic Press*, London 1-2.
- 155- **Silva, A.M., Martins, C.T.B., Ferraboli, R., Jorgetti, V., Junior, R., Egidio, J. (1996)**. Revisão/Atualização em Diálise: Água para Hemodiálise *Journal Brasileiro de Nefrologia*, 18(2), 180-8.
- 156- **Simon, P. (2007)**. L'insuffisance rénale: prévention et traitements Issy-les-Moulineaux, Elsevier Masson.
- 157- **Sitter, T., Bergner, A., Schiffl, H. (2000)**. Dialysate related cytokine induction and response to recombinant human erythropoietin in haemodialysis patients. *Nephrology and Dialysis Transplantation*, 15(8): 1207-11
- 158- **Slater, T. (1984)**. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochemistry Journal*, 222; 1-15.
- 159- **Smith, L., Shamsuddin, M., Sporn, P. H. (1997)**. Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, 22 1301-1307.
- 160- **Steghens, J. P., Combarous, F., Arkouche, W., Flourie, F., Hadj-Aissa, A. (2005)**. Influence de l'hémodialyse sur les concentrations de MDA total et libre, mesurées par une nouvelle technique HPLC spécifique. *Néphrologie and Thérapeutique Journal*, (1) 121-125
- 161- **Stenvinkel, P. et Alvertrand, A. (2002)**. Inflammation in end-stage renal disease : Sources, consequences and Therapy. *Seminar Dialysis Journal*, 15 : 329-37.
- 162- **Sugiyama, M., Tsuzuki, K., Hidad, T. (1991)**. Reduction of chromium (VI) in Chinese hamster V-79 cells. *Biology and Trace Elements Reseach Journal.*, 30 1-8.

- 163- **Swain, S.T., Rohn, T., Quinn, M. T.** (2002), Neutrophil priming in host defense : role of antioxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signaling*, 4 ; 69-83.
- 164- **Tarng, D. C., Huang, T. P., Wei, Y. H., Lin, T. Y., Chen, H. W., Wen-Chen, T., Yang, W. C.** (2000). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Disease*, 36 (5): 934-944.
- 165- **Tihan, D. Erbil, Y., Seven, R., Arkaya, S., Turkoglu, U., Hepgul, G., Borucu, I.** (2011). The effect of glutamine on oxidative damage in an experimental abdominal compartment syndrome model in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 17 (1):1-8.
- 166- **Trémollières, F., Pouilles, J., Cauneille, C., Ribot, C.** (1999). Coronary heart disease risk factors and menopause: a study in 1684 French women. *Atherosclerosis journal*, 142(2):415-23.
- 167- **Trenam, C., Dabbagh, A. J., Blake, D. R.** (1992). The role of iron in acute model of skin inflammation induced by reactive oxygen species. *British Journal of Dermatology.*, 126 ; 250-256.
- 168- **Van der Sande, F. M., Kooman, J. P., Leunissen, K. M.** (2006). La valeur predictive de la protéine C-reactive dans une maladie rénale en phase terminale : est-elle cliniquement significative ? *Purifiant sanguin*, 24: 335-41.
- 169- **Varan, H., Dursun, B., Dursun, E., Ozben, T., Suleymanlar, G.** (2010). Acute effects of hemodialysis on oxidative stress parameters in chronic uremic patients : comparison of two dialysis membranes. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 3: 39-45.
- 170- **Vervoort, G., Willems, H.** (2002). Assesment of glomerular filtration rate in healthy subjects and normoalbuminuric diabetic patients: Validity of a new (MDRD) prediction equation. *Journal of Nephrology and Dial Transplantation*, 17: 1909-1913.
- 171- **Wada, K., Saniabadi, A., Nakano, M.** (1995). Direct measurement of superoxide-dependent chemiluminescence from rat skin following UV-dependent fluoroquinolone-induced dermatitis. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, 18; 923-927.
- 172- **Wagner, A., Boesch-Saadatmandi, C., Breckwoldt, D., Schrader, C., Schmelzer, C., Doring, F., Hashida, K., Hori, O., Matsugo, S., et Rimbach, C.** (2011). Ascorbic acid partly antagonizes resveratrol mediated heme oxygenase-1 but no paraoxonase-1 induction in cultured hepatocytes-role of the redox-regulated transcription factor Nrf2. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11:1.

- 173- **Wanner, C. et Metzger, T.** (2002). C-reactive protein a marker for all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Journal of Nephrology and Dialysis Transplantation*, 17: 29-32.
- 174- **Winterbourn, C.** (1993). Superoxide as intracellular radical sink. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, 14: 85-90.
- 175- **Yagi K.** (1976). Simple Fluorometric Assay for lipoperoxyde in blood plasma. *Biochemical Medecine*, 15 : pp 212-216.
- 176- **Yatin, S., Varadarajan, S., Link, C. D., Butterfield, D. A.** (1999). In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Neurobiology of Aging*, 20; 325-330.
- 177- **Yeun, J., Levine, R., Mantadilok, V. et Kaysen, G.** (2000). C-reactive protein predicts all-cause and cardiovasculaire mortality in hémodialysis patients. *American Journal Kideney disease*, 35 : 469-476.
- 178- **Ziouzenkova, O., Asatryan, L., Tetta, C.** (2002). Oxidative stress during ex vivo hemodialysis of blood is decreased by a novel hemolipodialysis procedure utilizing antioxidants. *Free Radical of Biology Medecine* 33(2) : 248-258.
- 179- **Zunino, P. et Beltrán, L.** (2002). Microbiological quality of hemodialysis water in a three-year multicenter study in Uruguay. *Journal of Nephrology.*, 15: 374-379.

II- WEBOGRAPHIE

- 1- **Man, N. K. (2007).** Revue critique du risque infectieux des générateurs (biofilm). Consulté le 22 Mai 2016 à 16h
- 2- **Man, N. K., Jungers, P. (2007).** <http://www.nephrohus.org/s/spip.php> article337 consulté le 17 Août 2015 à 23h
- 3- **Ragon, A. (2004).** « l'eau et la santé dans les établissements de soins » Consulté le 12/7/2015 a 11h
- 4- **Tonga V (2015).** Dr Fouda Hermine « 2 millions de personnes touchées au Cameroun par l'insuffisance rénale » : Camer.be, consulté le 04/05/2016 à 24h

ANNEXES

ANNEXE 1 : Clairance éthique

COMITE NATIONAL D'ETHIQUE DE LA RECHERCHE POUR LA SANTE HUMAINE

Arrêté N° 0977/A/MINSANTE/SESP/SG/DROS/ du 18 avril 2012 portant création, organisation et fonctionnement des comités d'éthique de la recherche pour la santé humaine au sein des structures relevant du Ministère en charge de la santé publique

N° 2015/12/-7.09/CE/CNERSH/SP

Yaoundé, le 17 décembre 2015

Cnethique_minsante@yahoo.fr

CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Éthique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH), en sa session ordinaire du 17 décembre 2015, a examiné le projet de recherche intitulé : «**Évaluation du taux d'antioxydants et marqueurs du stress oxydants chez les patients en hémodialyse chronique au Cameroun**» soumis par M. GUEGUIM Cédric, Investigateur Principal, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I.

Le projet est d'un grand intérêt scientifique et social. L'objectif de cette étude est d'évaluer le taux d'antioxydants et les marqueurs du stress oxydant chez les patients en hémodialyse dans deux Centres de référence au Cameroun. Les risques liés au prélèvement de sang sont présentés ainsi que les mesures pour les éviter et les minimiser. La notice d'information et le formulaire de consentement éclairé, en français et en anglais, sont bien élaborés et simples à comprendre. Les mesures prises pour garantir la confidentialité des données collectées sont présentes dans le document. Les CVs des Investigateurs les décrivent comme des personnes compétentes, capables de mener à bien cette étude. Pour toutes ces raisons, le Comité National d'Éthique approuve pour une durée d'un an, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

L'étudiant GUEGUIM Cédric est responsable du respect scrupuleux du protocole approuvé et ne devrait y apporter aucun amendement aussi mineur soit-il, sans avis favorable du CNERSH. L'investigateur est appelé à collaborer pour toute descente du CNERSH pour le suivi de la mise en œuvre du protocole approuvé. Le rapport final du projet devra être soumis au CNERSH et aux autorités sanitaires du Cameroun.

La présente clairance peut être retirée en cas de non respect de la réglementation en vigueur et des recommandations susmentionnées.

En foi de quoi, la présente clairance éthique est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Ampliations

- MINSANTE

LE PRESIDENT

Pr Lazare KAPTUE

N.B : cette clairance éthique ne vous dispense pas de l'autorisation administrative de recherche (AAR) exigée pour mener cette étude sur le territoire camerounais. Cette dernière vous sera délivrée par le Ministère de la Santé Publique.



ANNEXE 2 : Autorisation de la Direction Générale de l'Hôpital Général de Douala



MINISTÈRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE
HÔPITAL GÉNÉRAL DE DOUALA
DIRECTION MÉDICALE

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix – Travail – Patrie

BP : 4856 Douala
Tel : 33.37.02.53/33.37.02.54/33.37.02.48
33.37.02.49/33.37.02.50/33.37.02.52
Fax : 32.37.01.46
E-mail : directionmedicalehgd@yahoo.fr

Douala, le 14/07/2015

N° 191 AR /MINSANTE/HGD/DM/07/15

AUTORISATION DE RECHERCHE

Je soussigné Pr LUMA Henry, Directeur Médical de l'Hôpital Général de Douala,

Autorise M. **GUEGUIM Cédric**, étudiant en 2^e Année Doctorat/Ph.D Biochimie à la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, à effectuer ses travaux de recherche dans notre Formation Sanitaire pour la rédaction de sa thèse intitulée : «**Evaluation du taux d'antioxydants et marqueurs du stress oxydants chez les patients en hémodialyse au Cameroun.**» sous la supervision du Dr HALLE Marie Patrice, Interniste Néphrologue.

Période de recherche : Septembre - Novembre 2015

L'étudiant(e) devra se conformer au règlement intérieur en vigueur dans l'établissement et déposer obligatoirement une copie finale de sa thèse à la Direction Médicale de l'hôpital.

La présente Autorisation est délivrée à l'intéressé(e) pour servir et valoir ce que de droit.



Pr. Henry NAMME LUMA

ANNEXE 3 : Autorisation de la Direction Générale du CHUY

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

MINISTRE DE LA SANTE PUBLIQUE



YAOUNDE

CENTRE HOSPITALIER ET UNIVERSITAIRE DE YAOUNDE
UNIVERSITY HOSPITAL CENTER YAOUNDE

Tél. 22 31 21 03 / 22 31 25 66 Fax 22 31 25 67

Site web : www.chu-yaounde.org

REPUBLIC OF CAMEROON

Peace – Work – Fatherland

MINISTRY OF PUBLIC HEALTH

DIRECTION GENERALE – BUREAU DES STAGES

AUTORISATION DE RECHERCHE

Monsieur GUEGUIM Cédric, étudiant en Doctorat/PhD en Biochimie à la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I – Département de Biochimie ; est autorisé à mener une recherche au Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé sur le thème : «EVALUATION DU TAUX D'ANTIOXYDANTS ET MARQUEURS DU STRESS OXYDANTS CHEZ LES PATIENTS EN HEMODIALYSE CHRONIQUE AU CAMEROUN»

Ces travaux s'effectueront dans le service de la Réanimation Polyvalente (Unité d'Hémodialyse) du Centre Hospitalier et Universitaire de Yaoundé (CHUY) et seront supervisés par le Professeur MBACHAM Wilfred et co-supervisés par les Docteurs NNANGA NGA et KAZE FOLEFACK François.

L'étudiant s'engage à remercier le CHUY dans son mémoire et à déposer un exemplaire de dudit mémoire au Bureau des Stages.

En foi de quoi la présente autorisation est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.



Fait à Yaoundé, le 17 4 SEPT 2015
 Le Directeur Général Adjoint

Pr. Kathleen NGU BLACKETT

ANNEXE 4 : NOTICE D'INFORMATION DU PARTICIPANT

ÉVALUATION DU TAUX D'ANTIOXYDANTS ET MARQUEURS DU STRESS OXYDANTS CHEZ LES PATIENTS EN HEMODIALYSE CHRONIQUE AU CAMEROUN

1. Investigateur principal :

GUEGUIM Cédric, Doctorant / Ph.D en Biochimie, Université de Yaoundé 1.

2. Invitation à participation

Madame, Mademoiselle, Monsieur,

La présente étude de recherche consiste à analyser certaines molécules dans le sang des patients souffrant d'une insuffisance rénale chronique, en relation avec le système de défense antioxydant dans l'organisme humain. Ces molécules peuvent jouer un rôle aussi bien dans la protection que dans l'agression de structures cellulaires dans l'organisme à l'échelle d'un organe, comme le cœur, le rein, le foie ou tout autre organe.

3. Objectif de la recherche

L'intérêt de cette étude est de déterminer le taux de ces molécules avant et après la dialyse, et évaluer leur impact sur la physiopathologie du rein, et sur celles d'autres organes comme le cœur. Une meilleure compréhension de l'impact de molécules objets de la présente étude, pourraient envisager de nouveaux outils thérapeutiques dans l'insuffisance rénale et favorisé une meilleure prise en charge thérapeutique des patients en hémodialyse chronique au Cameroun.

4. Période de l'étude

L'étude s'étendra sur une période de 6 mois (juin 2015 à novembre 2015) chez les patients en insuffisance rénale chronique avec un groupe contrôle correspondant à des volontaires sains.

5. Procédure

L'étude va consister avec votre permission à la collecte de vos informations personnelles (âge, profession, niveau d'éducation...), votre état de santé, vos habitudes

alimentaires et votre mode de vie tel que présenté dans le questionnaire. Pour compléter ces données, certains paramètres seront obtenus à partir de votre dossier médical (poids, taille...).

Nous allons également effectuer un prélèvement d'échantillon de sang d'environ 4 mL dans deux tubes au bout de l'aiguille à fistule avant et après la dialyse puis transfert au Centre de Recherche en Alimentation et Nutrition de l'Institut de recherche Médicales et d'études des Plantes Médicinales (IMPM).

6. Devenir des échantillons et durée de leur conservation.

Les échantillons de sang seront congelé à -20°C et utilisés sur une période de trois mois pour évaluer certains marqueurs biochimiques notamment le bilan lipidique (taux de cholestérol total, triglycérides, cholestérol HDL et LDL...), le taux de vitamines antioxydants, les marqueurs de l'inflammation et du stress oxydatifs qui permettront d'évaluer votre susceptibilité à l'anémie, la mal nutrition, l'athérosclérose et aux risques de maladies cardiovasculaires.

7. Dans quels cas peut-on me retirer de la recherche ou l'arrêter prématurément?

La participation à cette étude est entièrement volontaire. Vous êtes entièrement libre d'accepter ou de refuser d'y participer ou même d'interrompre votre participation sans que cela ne pose préjudice quelconque.

8. Quels sont les inconvénients et les risques ?

Vous pouvez avoir quelques désagréments au cours de cette étude notamment au cours du prélèvement de sang, et éventuellement des risques d'infection. Pour éviter ce risque d'infection, le matériel à usage unique sera utilisé, associés aux agents antiseptiques et un personnel médical qualifié sera dévoué à cette tâche. Le questionnaire qui vous sera administré nécessitera également une certaine patience de votre part.

9. Quels sont les avantages et bénéfices ?

Si les résultats nous révèlent que vous souffrez ou vous êtes à risque d'une athérosclérose, d'une malnutrition ou d'une maladie cardiovasculaire, nous vous informerons et vous bénéficierez des conseils nutritionnels gratuits et même vous proposer un suivi nutritionnel. Tous les examens cliniques et biologiques (profil lipidique, vitamines

antioxydants, marqueurs de l'inflammation et du stress oxydatif) que vous accepterez de réaliser seront gratuits.

10. Comment la confidentialité est-elle assurée ?

Des codes vous seront attribués pour préserver l'anonymat et assurer la confidentialité de vos données.

A votre demande, les résultats obtenus lors de cette étude vous seront communiqués.

11. Quels sont les arrangements financiers ?

Il n'y a aucune mesure de compensation ou un arrangement durant l'étude, vous ne recevrez pas les soins de routine pour une précédente maladie ou une situation qui n'est pas directement liée à l'étude.

Pour plus d'information sur cette recherche, contactez :

L'investigateur principal :

GUEGUIM Cédric, Doctorant / Ph.D en Biochimie, Université de Yaoundé 1.

Tel 6 73 82 73 65

Superviseurs des Travaux :

Pr. MBACHAM FON Wilfred, UY1 Tel : 677 57 91 80

Co-directeur des travaux :

Dr. NNANGA NGA, UDla Tel : 694 61 11 98

Dr. HALLE Marie patrice, Néphrologue, HGD/UDla Tel : 699.80.72.33

Dr. KAZE Folefack François Jérôme, Néphrologue, CHUY/UY1 Tel : 699.33.34.67

Le Comité National d'Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine :

Tel: + 237 243 67 43 39

ANNEXE 5 : Consentement éclairé

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTEMENT OF BIOCHEMISTRY



REPUBLIQUE DU CAMEROUN
REPUBLIC OF CAMEROUN

FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

CONSENTEMENT ECLAIRE

**ÉVALUATION DU TAUX D'ANTIOXYDANTS ET MARQUEURS DU STRESS
OXYDANTS CHEZ LES PATIENTS EN HEMODIALYSE CHRONIQUE AU
CAMEROUN**

Je soussigné :

Nom et prénom du volontaire.....code.....

Date et lieu de naissancetel.....

Domicilié à.....CNI n°..... Délivré le/...../..... à

Déclare avoir été invitée à participer à l'étude intitulée « **Evaluation du taux d'antioxydants et marqueurs du stress oxydants chez les patients en hémodialyse chronique au Cameroun** » et d'avoir pris connaissance des informations qui y sont relatives. Je précise que l'objectif de l'étude, les conditions et la durée de sa réalisation m'ont été clairement indiqués oralement et par écrit par les investigateurs. J'accepte de participer par la présente en toute connaissance de cause et en toute liberté à ce projet de recherche, sous l'investigation principale de : GUEGUIM Cédric, étudiant en Doctorat Biochimie, Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé 1.

Fait à Yaoundé, le...../...../2015

Signature de l'investigateur

Signature du volontaire

ANNEXE 6: Fiche technique

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTEMENT OF BIOCHEMISTRY



REPUBLIQUE DU CAMEROUN
REPUBLIC OF CAMEROUN

FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

FICHE TECHNIQUE

EVALUATION DU TAUX D'ANTIOXYDANTS ET MARQUEURS DU STRESS OXYDANTS CHEZ
LES PATIENTS EN HEMODIALYSE CHRONIQUE AU CAMEROUN

• IDENTIFICATION DU PATIENT

<p>Code :...../.....(n° dossier/année)</p> <p>Initiales du Nom (3 1^{ers} caractères) <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>Initiales du prénom (3 1^{ers} caractères) <input type="text"/><input type="text"/><input type="text"/></p> <p>N° tel :</p>	<p>Antécédents familiaux : Oui(1) <input type="checkbox"/> Non(0) <input type="checkbox"/></p> <p>Type d'antécédents : Obésité(1) <input type="checkbox"/></p> <p>Diabète(2) <input type="checkbox"/></p> <p>HTA(3) <input type="checkbox"/></p> <p>Autres(4) <input type="checkbox"/></p>
<p>Age :</p> <p>Sexe : Féminin(1) <input type="checkbox"/> Masculin(2) <input type="checkbox"/></p>	<p>Consommation : -alcool : Oui(1) <input type="checkbox"/> Non(0) <input type="checkbox"/></p> <p>Si oui à quelle fréquence (Nbre de fois/semaine)?</p> <p>Tabac : Oui(1) <input type="checkbox"/> Non(0) <input type="checkbox"/></p> <p>Si oui à quelle fréquence (Nbre de fois/semaine)?</p>
<p>Profession :</p> <p>Religion : Chrétienne (0) <input type="checkbox"/> Musulman(1) <input type="checkbox"/></p> <p>animiste(2) <input type="checkbox"/> Athée (3) <input type="checkbox"/> Autre (4) <input type="checkbox"/></p>	<p>1. Année de dépistage de l'insuffisance rénale :.....</p>
<p>Province d'origine :</p> <p>Domicile actuel : milieu urbain (1) <input type="checkbox"/> rural(0) <input type="checkbox"/></p>	<p>2. Durée du traitement par hémodialyse:</p>
<p>Statut matrimonial :</p> <p>- Marié (e) (1) <input type="checkbox"/></p> <p>- Célibataire (2) <input type="checkbox"/></p> <p>- Veuf (3) <input type="checkbox"/></p> <p>- Divorcé(e) (4) <input type="checkbox"/></p>	<p>Noms des médicaments administrés :</p> <p>-vitamine A : Oui(1) <input type="checkbox"/> Non(0) <input type="checkbox"/></p> <p>vitamine E : Oui (1) <input type="checkbox"/> Non(0) <input type="checkbox"/></p> <p>-Vitamine C: Oui(1) <input type="checkbox"/> Non(0) <input type="checkbox"/></p> <p>Autres médicaments <input type="checkbox"/></p>

	(précisez)..... -Prise de suppléments nutritionnels (compléments alimentaires) : Oui(1) <input type="checkbox"/> Non(2) <input type="checkbox"/> Prise des médicaments traditionnels : Oui(1) <input type="checkbox"/> Non(0) <input type="checkbox"/>
Niveau de scolarisation : - Primaire (1) : <input type="checkbox"/> - Secondaire (2) : <input type="checkbox"/> -Universitaire (3) : <input type="checkbox"/>	-diarrhées persistantes (1) : <input type="checkbox"/> -Nausées, Vomissement(2) : <input type="checkbox"/> -Perte d'appétit (3) : : <input type="checkbox"/> - Anémies (4) : <input type="checkbox"/> -Edèmes (5) : <input type="checkbox"/> -Fièvre (6) : <input type="checkbox"/> -Toux (7) : <input type="checkbox"/> -Grippe (8) : <input type="checkbox"/> -Autres (9) (précisez) : <input type="checkbox"/> Pratique de l'activité physique : Oui (0) <input type="checkbox"/> Non (1) <input type="checkbox"/> Mode de déplacement au cours d'une journée: à pied(0) <input type="checkbox"/> Voiture (1) <input type="checkbox"/> Vélo(2) <input type="checkbox"/>

MESURES ANTHROPOMETRIQUES

paramètres	
Poids (Kg)	
Taille (m)	
Indice de masse corporelle (IMC) (Kg/m ²)	

PARAMETRES BIOCHIMIQUES ET BIOLOGIQUES

paramètres		Avant la dialyse	Après la dialyse
1.	Créatinine (mg/l)		
2.	Urée (mg/l)		
3.	Cholestérol total (g / l)		
4.	Cholestérol HDL (g / l)		
5.	Cholestérol LDL (g / l)		
6.	Triglycérides (g / l)		
7.	Albumine (g/l)		
8.	CRP (mg/l)		
9.	MDA ($\mu\text{mol/l}$)		
10.	Capacité antioxydante totale du sérum ($\mu\text{mol/l}$)		
11.	Acide urique (mg/l)		
12.	SOD (U/ml)		
13.	Glutathion peroxydase (U/ml)		
14.	Catalase (U/ml)		
15.	Glutathion réduit ($\mu\text{mol/l}$)		
16.	Vitamine C ($\mu\text{g/ml}$)		
17.	Vitamine E ($\mu\text{g/ml}$)		
18.	Autres paramètres (préciser)		

Annexe 7 : Matériel de travail

➤ Pour analyses biochimiques

✓ Matériel de prélèvement

Pour les différents prélèvements sanguins, nous avons eu besoin de :

- Gants non stériles,
- Coton et de l'alcool,
- Un garrot,
- Des aiguilles stériles à usage unique,
- Des tubes sans anticoagulant et héparinés,
- du sparadrap,
- une glacière contenant des accumulateurs et du papier aluminium.

✓ Matériel de laboratoire

Comme matériel de laboratoire nécessaire au dosage des différents paramètres nous avons utilisés :

- Les réactifs de dosage (vitamines C, E, créatinine, urée...)
- Des tubes à essai,
- Des tubes en verre et à vis,
- Des tubes Eppendorf,
- Des micropipettes de tailles variables,
- Des embouts,
- Des portoirs pour tubes,
- un spectrophotomètre (722-2000),
- une centrifugeuse (Rotofix 32),
- un bain marie,
- un congélateur à -20°C
- un incubateur (HUMAN).

➤ Pour les analyses Bactériologiques.

✓ Petit matériel

- Anse d'inoculation et support ;
- Bec Bunsen ;
- Boîtes de Pétri stériles ;

-
- Disque d'oxydase, disque d'ONPG ;
 - Eau distillée stérile ;
 - Eau physiologique ;
 - Eau stérile pour injection ;
 - Flacons stériles pour échantillons ;
 - Filtres à eau ;
 - Lames porte-objet, Lames couvre-objet ;
 - Papier filtre (0,45 µm) ;
 - Pincés en acier stériles ;
 - Pipettes graduées ;
 - Pipettes Pasteur stériles ;
 - Portoir pour tubes à essai;
 - Tubes à essai.
 - **Milieux de culture**
 - Chapman ;
 - Gélose au sang ;
 - Gélose au chocolat+polyvitex ;
 - Mueller Hinton ;
 - Mannitol mobilité ;
 - MacConkey ;
 - Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA).
 - **Réactif**
 - Kit Gram ;
 - Kit pour identification des bactéries à Gram négatif (Galeries Api 20NE et 20E) ;
 - Eau oxygénée ;
 - Urée, indole.

Annexe 8 : Protocole dosage de la créatinine



Créatinine

Test cinétique. Jaffe.
Sans déprotéinisation.

Code HB0080 2 x 125 ml

Conserver entre 2-25°C. Liquide. Standard inclus.

Signification clinique

La créatinine est présente principalement dans le tissu musculaire où elle est stockée sous la forme de phosphate de créatine et constitue une réserve d'énergie de potentiel élevé pour la conversion en ATP. La créatinine, le produit de dégradation de cette réaction, est acheminée aux reins et éliminée. La concentration sérique de créatinine est indépendante du régime alimentaire et dépend quasi entièrement de son taux d'excrétion rénale. C'est la raison pour laquelle, son élévation est très spécifique des affections rénales.

Principe

La créatinine forme un complexe rouge dans une solution picrate basique comme décrit par Jaffé. La Δ absorbance, à de temps prédéterminés pendant la conversion, est proportionnelle à la concentration de la créatinine dans l'échantillon. Les intervalles de temps optés pour la mesure évitent des interférences d'autres constituants de sérum.

Réactifs

Réactif 1 Réactif Picric	Solution Picrate.....25 mmol/l
Reagent 2 Réactif Alkaline	Hydroxide Sodium 0,29 mol/l
Standard	Créatinine aqueux.....2 mg/dl

Pour le diagnostic *in vitro*.

Précautions

Réactif 1 : EUH001: Explosif à l'état sec. H314: Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
Réactif 2 : H314: Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
Standard : H290: Peut être corrosif pour les métaux.
P280 : Porter des gants de protection, des vêtements de protection, équipement de protection des yeux et du visage. P501 : Élimination des contenus/contenants conformément aux dispositions locales/régionales/nationales/internationales en vigueur.

Préparation

La solution de travail s'obtient en mélangeant proportionnellement 1:1 les réactifs R1 Réactif Picric et R2 Réactif Alkaline. Cette solution est stable 10 jours entre 15-25°C.

Conservation et stabilité

Tous les réactifs sont stables entre 2 et 25°C jusqu'à la date de péremption indiquée, à condition d'être conservés dans un récipient fermé hermétiquement et à l'abri de la lumière et d'éviter les contaminations lors de leur utilisation. Manipuler le standard très soigneusement pour prévenir les contaminations. Le réactif doit se présenter sous l'aspect d'une solution limpide. Jeter le réactif, si une turbidité ou une précipitation a été constatée ou si l'absorbance à blanc à 505 nm est $\geq 1,80$.

Équipement supplémentaire

- Spectrophotomètre ou colorimètre permettant des mesures à 505 nm
- Cuvettes assorties (trajet optique 1,0 cm)
- Équipement général de laboratoire

Échantillons

Sérum ou plasma à l'héparine. Créatinine est stable 24 heures entre 2 et 8°C

Urine diluée 1:50 avec l'eau distillée et les résultats sont à multiplier par 50 (facteur de dilution). Créatinine est stable 7 jours entre 2 et 8°C.

Procédure

1. Longueur d'onde 505 nm (500-510); Température 37°C/15-25°C; Cuvette trajet optique 1 cm.
2. Ajuster le zéro de l'instrument avec de l'eau distillée.
3. Pipeter dans une cuvette:

	Blanc	Standard	Échantillon
Standard	---	100 μ l	---
Échantillon	---	---	100 μ l
Solution de travail	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger et démarrer le chrono. Lire l'absorbance 1 (abs 1) après 30 secondes et abs 2 après 90 secondes de l'addition de l'échantillon.

Calcul

Calculer le Δ Abs. = (Abs. 2 - Abs. 1).

Sérum et plasma: Créatinine (mg/dl)

$$= \frac{\Delta \text{Abs Échant}}{\Delta \text{Abs Stand}} \times 2 (\text{conc. Stand.})$$

Urine 24h: Créatinine (mg/kg/24h)

$$= \frac{\Delta \text{Abs Échant}}{\Delta \text{Abs Stand}} \times 2 (\text{conc. Stand.}) \times \frac{\text{vol(dl)urine 24h} \times f^*}{\text{poids du patient}}$$

*f = facteur de dilution

Facteur de conversion: mg/dl \times 88,4 = μ mol/l.

Contrôle de qualité

Il est recommandé d'utiliser des contrôles pour contrôler le fonctionnement de la méthode. Si les valeurs de contrôle se situent en dehors de la plage définie, contrôler si l'instrument, les réactifs et le calibre ne présentent pas d'anomalies. Chaque laboratoire doit élaborer son propre système de contrôle de la qualité et des mesures correctives si les contrôles ne sont pas conformes aux tolérances admissibles. Sérums normale et pathologique humains (HBC01, HBC02) sont disponibles.

Valeurs de référence

Sérum ou plasma		
Homme	0,7 - 1,4 mg/dl	\approx 61,8 - 123,7 μ mol/l
Femme	0,6 - 1,1 mg/dl	\approx 53 - 97,2 μ mol/l

Urine: 15-25 mg/Kg/24h

Homme	10 - 20 mg/kg/24h	\approx 88 - 177 μ mol/kg/24h
Femme	8 - 18 mg/kg/24h	\approx 71 - 77 μ mol/kg/24h

Ces valeurs sont données à titre indicatif. Chaque laboratoire doit élaborer sa propre plage de référence.

Caractéristiques de fonctionnement

Plage de mesure: de 0,115 mg/dl (limite de détection) jusqu'à 15 mg/dl (limite de linéarité). Si les résultats obtenus sont supérieurs à 15 mg/dl, diluer l'échantillon 1:2 avec une solution saline, répéter la mesure et multiplier le résultat par le facteur 2.

Précision:

Moyenne (mg/dl)	Intra-assai (n=20)		Inter-assai (n=20)	
	1,07	3,47	1,05	3,41
SD	0,021	0,04	0,018	0,052
CV (%)	1,99	1,17	1,68	1,53

Sensibilité: 1 mg/dl = Δ 0,0288 A/min

Exactitude: les résultats obtenus à l'aide des réactifs CYPRESS DIAGNOSTICS n'ont pas présenté de différence systématique par rapport aux autres réactifs disponibles dans le commerce. Les résultats des caractéristiques de fonctionnement dépendent de l'analyseur utilisé.

Interférences

Hémoglobine (22 mg/dl) et Acide ascorbique (34 mg/dl) n'interfèrent pas. Une liste de médicaments et d'autres substances interférant avec la détermination de créatinine a été publiée par Young et al.

Notes

L'étalonnage avec le standard aqueux peut provoquer une erreur systématique dans les systèmes automatiques. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser un calibre de sérum (HBC03).

Pour la meilleure utilisation de cette trousses sur un analyseur Cypress Diagnostics (CYANSmart, CYANstart, CYANPro, CYANExpert 130) nous vous conseillons d'utiliser les fiches d'automatisation de l'instrument en question. Vous pouvez télécharger les fiches d'automatisation de notre site internet (www.diagnostics.be) après enregistrement.

Bibliographie

- Murray R.L. Creatinine. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby CO. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1261-1266 and 418.
Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press 1995
Young DS. Effects of diseases on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001
Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 4th ed AACC 1999
Tietz NW et al. Clinical Guide to Laboratory tests, 4th ed AACC 1995.

Langdorp, 07.2016



Cypress Diagnostics: Langdorpsesteenweg 160 • 3201 Langdorp • Belgium
www.diagnostics.be • Tel: ++ 32 15 67 67 68 • e-mail: cypress@diagnostics.be

Annexe 9 : Protocole dosage de l'Urée



Urée

Berthelot

Test enzymatique et colorimétrique.

Code HB022 4 x 250 ml

Code HB029 2 x 125 ml

Lyophilisée, conserver entre 2-8°C. Standard inclus.

Usage prévu

Détermination quantitative des niveaux d'urée dans le sérum, le plasma héparinisé ou l'urine.

Pour diagnostic in vitro. Pour utilisation professionnelle uniquement.

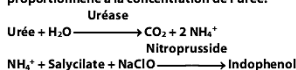
Signification Clinique

L'urée est le produit final du métabolisme des protéines; elle est formée dans le foie suite à leur destruction.

Des taux sanguins élevés d'urée (urémie) peuvent être observés en cas de régime hyperprotéiné, d'affection rénale, d'insuffisance cardiaque, d'hémorragie gastro-intestinale, de déshydratation ou d'obstruction rénale.

Le diagnostic clinique ne doit pas être établi sur un seul résultat de test, mais il doit intégrer les données cliniques et les autres paramètres de laboratoire.

Principe

L'urée est hydrolysée en ammoniac et CO₂. L'ammoniac réagit avec le salicylate et l'hypochlorite pour former l'indophénol vert. La couleur de celle-ci est proportionnelle à la concentration de l'urée.

Composition de réactifs

Réactif 1	Phosphate pH 6,7	50 mmol/l
Tampon	EDTA	2 mmol/l
	Sodium salicylate	400 mmol/l
	Sodium Nitroprussiate	10 mmol/l
Réactif 2	Sodium Hypochlorite	140 mmol/l
NCIO	Sodium Hydroxide	150 mmol/l
Réactif 3	Urée	30000 U/l
Enzymes		
Standard	Urée aqueux	50 mg/dl

Précaution

Réactif 2 : H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. P280 : Porter des gants de protection, des vêtements de protection, équipement de protection des yeux et du visage. P501 : Élimination des contenus/contenants conformément aux dispositions locales/régionales/nationales/internationales en vigueur.

Préparation

Dissoudre le contenu d'un flacon enzymes R3 dans un flacon tampon R1. Couvrir d'un capuchon et mélanger doucement pour résoudre le contenu.

Cette solution de travail (R1+R3) est stable 4 semaines entre 2-8°C ou une semaine à la température ambiante. Le réactif R2 est prêt à l'emploi. Le standard est prêt à l'emploi.

Conservation et stabilité

Tous les réactifs sont stables entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée, à condition d'être conservés dans un récipient fermé hermétiquement et à l'abri de la lumière et d'éviter les contaminations lors de leur utilisation. Manipuler le standard très soigneusement pour prévenir les contaminations.

Le réactif doit se présenter sous l'aspect d'une solution limpide. Jeter le réactif, si une turbidité ou une précipitation est constatée ou si l'absorbance à blanc à 580 nm est $\geq 0,32$.

Équipement supplémentaire

- Spectrophotomètre ou colorimètre permettant des mesures à 580 nm
- Cuvettes assorties (trajet optique 1,0 cm)
- Équipement général de laboratoire (note 1)

Échantillon

Sérum ou plasma à l'héparine. N'utiliser pas des sels d'ammoniac ou fluorure comme anticoagulant.

Urines, diluées 1:50 avec l'eau distillée. Mélanger. Multiplier les résultats par 50 (facteur de dilution). Conserver les échantillons d'urine à pH < 4.

Urée set stable 5 jours entre 2-8°C.

Méthode

1. Longueur d'onde 580 nm; Température 37°C/15-25°C; Cuvette trajet optique 1 cm.
2. Ajuster le zéro de l'instrument avec de l'eau distillée ou de l'air.

3. Pipeter dans une cuvette:

	Blanc	Standard	Echantillon
R1 + R3	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
Standard	---	10 μ l	---
Echantillon	---	---	10 μ l

Mélanger et Incuber à 37°C pour 5 min ou 10 min à 15-25°C. Puis ajouter le réactif 2.

Réactif 2 1,00 ml 1,00 ml 1,00 ml

Mélanger et incuber 5 min à 37°C ou 10 min à 15-25°C. Mesurer l'absorbance (abs) de l'échantillon et du standard versus le blanc. La couleur est stable au moins 30 minutes à 15-25°C.

Calcul

Sérum et plasma :

$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{\text{Abs}_{\text{échant.}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}}{\text{Abs}_{\text{Standard}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}} \times 50 \text{ (conc. standard)}$$

Urine 24hr :

$$\text{Urée (g/24hr)} = \frac{\text{Abs}_{\text{échant.}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}}{\text{Abs}_{\text{Standard}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}} \times 0,050 \text{ (conc. standard(g/l))} \times 50 \text{ (facteur dil.)} \times V$$

V = Vol urine (l)/24 hr

$$\text{BUN [mg/dL]} = \text{Urée [mg/dl]} / 2,14 = \text{Urée [mmol/l]} / 0,357$$

Facteur de conversion: mg/dl x 0,1665 = mmol/l.

Contrôle de qualité

Il est recommandé d'utiliser des contrôles pour contrôler le fonctionnement de la méthode. Si les valeurs de contrôle se situent en dehors de la plage définie, contrôler si l'instrument, les réactifs et le calibreur ne présentent pas d'anomalies. Chaque laboratoire doit élaborer son propre système de contrôle de la qualité et des mesures correctives si les contrôles ne sont pas conformes aux tolérances admissibles. Sérums normale et pathologique humains (HBC01, HBC02) sont disponibles.

Valeurs de référence

Sérum ou plasma :

15 - 45 mg/dl (2,49 - 7,49 mmol/l)

Urine 24hr

20 - 35 g/24hr

Ces valeurs sont données à titre indicatif. Chaque laboratoire doit élaborer sa propre plage de référence.

Caractéristiques de fonctionnement

Plage de mesure: de 0,001 mg/dl (limite de détection) jusqu'à 225 mg/dl (limite de linéarité). Si les résultats obtenus sont supérieurs à 225 mg/dl, diluer l'échantillon 1:2 avec NaCl 9 g/l, répéter la mesure et multiplier le résultat par le facteur 2.

Précision:

Moyenne (mg/dl)	Intra-assai (n=20)		Inter-assai (n=20)	
	39	126	40.0	127
SD	0.55	2.12	0.93	2.48
CV (%)	1.43	1.68	2.33	1.96

Sensibilité: 1 mg/dl = 0,00608 Abs

Exactitude: les résultats obtenus à l'aide des réactifs CYPRESS DIAGNOSTICS n'ont pas présenté de différence systématique par rapport aux autres réactifs disponibles dans le commerce.

Interférences

Il est recommandé d'utiliser héparine comme anticoagulant. Ne pas utiliser des sels d'ammoniac ou fluorure comme anticoagulant. Une liste de médicaments et d'autres substances interférant avec la détermination d'urée a été publiée par Young et al.

Notes

1. La verrerie et l'eau distillée doivent être libres d'ammoniac et des sels d'ammoniac.
2. L'étalonnage avec le standard aqueux peut provoquer une erreur systématique dans les systèmes automatiques. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser un calibreur de sérum (HBC03).

Bibliographie

Kaplan A. Urea. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby CO. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1257-1260 and 237 and 418
 Tabacco A et al. Clin Chem 1979; 25 : 336-337
 Fawcett JK et al. J. Clin. Path. 1960; 13, 156-169.
 Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press 1995
 Young DS. Effects of diseases on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001
 Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999
 Tietz NW et al. Clinical Guide to Laboratory tests, 3rd ed AACC 1995.

09.2017, Rev. 12.0



Cypress Diagnostics: Langdorpsesteenweg 160 • 3201 Langdorp • Belgium

www.diagnostics.be • Tel: ++ 32 15 67 67 68 • e-mail: cypress@diagnostics.be

Annexe 10 : Protocole dosage du Cholestérol



Cholestérol

Test enzymatique-colorimétrique (CHOD-POD).

Code HB006 2 x 125 ml

Conserver entre 2-8°C.

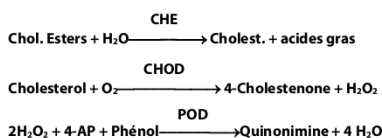
Standard Inclus.

Signification clinique

Le cholestérol est une substance grasse présente dans le sang, la bile et le tissu cérébral; elle joue le rôle de précurseur des acides biliaires, des stéroïdes et de la vitamine D. La détermination du cholestérol sérique constitue un important élément contributif au diagnostic et à la classification des lipémies. Un taux sanguin élevé de cholestérol représente l'un des principaux facteurs de risque de maladies cardiovasculaires. D'autres pathologies telles que des atteintes hépatiques au cours de maladies de la thyroïde influent sur les taux de cholestérol^{5,6}. Le diagnostic clinique ne doit pas être établi sur un seul résultat de test, mais il doit intégrer les données cliniques et les autres paramètres de laboratoire.

Principe

Le cholestérol et ses esters sont libérés des lipoprotéines par des détergents. L'estérase de cholestérol hydrolyse les esters et H₂O; est formé dans l'oxydation enzymatique suivante du cholestérol par la cholestérol-oxydase selon l'équation suivante. Dans la dernière réaction un composant coloré rouge dont l'intensité est proportionnelle à la concentration du cholestérol.



La production du quinonimine rouge est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon.

Composition de réactifs

Réactif 1	Pipes pH 6,9	90 mmol/l.
Tampon	Phénol.....	26 mmol/l.
Réactif 2 ^{note 2}	Peroxydase.....	1250 U/l.
Enzymes	Cholestérol esterase	300 U/l.
	Cholestérol oxydase	300 U/l.
	4-Aminophenazone.....	0,4 mmol/l.
Standard	Cholestérol sol	200 mg/dl

Pour le diagnostic *in vitro*.

Précautions

Standard : Liquide et vapeurs très inflammables. H318 : Provoque des lésions oculaires graves. H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. P280 : Porter des gants de protection, des vêtements de protection, équipement de protection des yeux et du visage. P501 : Élimination des contenus/conteneurs conformément aux dispositions locales/régionales/nationales/internationales en vigueur.

Préparation

Dissoudre le contenu d'un flacon R2 (enzymes) dans le contenu d'un flacon R1 (tampon). Cette solution de travail est stable 4 mois entre 2-8°C ou 40 jours à la température ambiante et à l'abri de lumière.

Conservation et stabilité

Tous les réactifs sont stables entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée, à condition d'être conservés dans un récipient fermé hermétiquement et à l'abri de la lumière et d'éviter les contaminations lors de leur utilisation. Manipuler le standard très soigneusement pour prévenir les contaminations.

Le réactif doit se présenter sous l'aspect d'une solution limpide. Jeter le réactif, si une turbidité ou une précipitation a été constatée ou si l'absorbance à blanc à 505 nm est $\geq 0,1$.

Équipement supplémentaire

- Spectrophotomètre ou colorimètre permettant des mesures à 505 nm
- Cuvettes assorties (trajet optique 1,0 cm)
- Équipement général de laboratoire

Échantillon

Sérum ou plasma.

Le cholestérol est stable 7 jours entre 2-8°C ou 3 mois à -20°C

Procédure

1. Longueur d'onde 505 nm (500-550); Température 37°C/15-25°C; Cuvette trajet optique 1 cm.

2. Ajuster le zéro de l'instrument avec de l'eau distillée.

3. Pipetter dans une cuvette:

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard ^{note 1}	---	10 µl	---
Echant.	---	---	10 µl
Sol. de travail	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger et incubé 5 min à 37°C ou 10 min à 15-25°C.
Mesurer les absorbances (Abs) de l'échantillon et du standard contre le tube blanc. La couleur est stable au moins 60 minutes.

Calcul

$$\text{Cholestérol (mg/dl)} = \frac{\text{Abs}_{\text{Echantillon}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}}{\text{Abs}_{\text{Standard}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}} \times 200 \text{ (stand. conc.)}$$

Facteur de conversion: mg/dl x 0,0258 = mmol/l.

Contrôle de qualité

Il est recommandé d'utiliser des contrôles pour contrôler le fonctionnement de la méthode. Si les valeurs de contrôle se situent en dehors de la plage définie, contrôler si l'instrument, les réactifs et le calibre ne présentent pas d'anomalies. Chaque laboratoire doit élaborer son propre système de contrôle de la qualité et des mesures correctives si les contrôles ne sont pas conformes aux tolérances admissibles.

Sérums normale et pathologique humains (HBC01, HBC02) sont disponibles.

Valeurs de référence

Évaluation du risque^{3,4}:

Moins de 200 mg/dl	Normales
200-239 mg/dl	Suspectées
240 mg/dl and above	Élevées

Ces valeurs sont données à titre indicatif. Chaque laboratoire doit élaborer sa propre page de référence

Caractéristiques de fonctionnement

Plage de mesure: de 0 mg/dl (limite de détection) jusqu'à 900 mg/dl (limite de linéarité). Si les résultats obtenus sont supérieurs à 900 mg/dl, diluer l'échantillon 1:2 avec une solution saline, répéter la mesure et multiplier le résultat par le facteur 2.

Précision:

Moyenne (mg/dl)	Intra-assai (n=20)		Inter-assai (n=20)	
	90,4	187	92,8	193
SD	1,15	1,01	1,98	2,39
CV (%)	1,27	0,54	2,14	1,24

Sensibilité: 1 mg/dl = 0,00152 Abs

Exactitude: les résultats obtenus à l'aide des réactifs CYPRESS DIAGNOSTICS n'ont pas présenté de différence systématique par rapport aux autres réactifs disponibles dans le commerce.

Interférences

Hémoglobine jusqu'à 5 g/l et bilirubine jusqu'à 10 mg/dl n'interfèrent pas^{1,2}. Une liste de médicaments et d'autres substances interférant avec la détermination de cholestérol a été publiée par Young et al.

Notes

1. L'étalonnage avec le standard aqueux peut provoquer une erreur systématique dans les systèmes automatiques. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser un calibre de sérum (HBC03).
2. LCF (Facteur de Suppression des Lipides) est intégré dans le réactif

Bibliographie

1. Naito H.K., Cholesterol. Kaplan A et al. Clin Chem. The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984: 1194-1206 and 437.
2. Melattini F. et al. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. Clin Chem 1978; 24(12): 2161-2165.
3. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press 1995
4. Young DS. Effects of diseases on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001
5. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999
6. Tietz N.W et al. Clinical Guide to Laboratory tests, 3rd ed AACCC 1995.

Langdorp, 08.2015



Cypress Diagnostics: Langdorpsesteenweg 160 • 3201 Langdorp • Belgium
www.diagnostics.be • Tel: ++32 15 67 67 68 • e-mail: cypress@diagnostics.be

Annexe 11 : Protocole dosage des Triglycérides

Triglycérides Liq
 Test enzymatique et colorimétrique.
GPO-POD

Code HBL060 2 x 125 ml

Conserver entre 2-8°C. Standard inclus.

**Usage prévu**

Détermination quantitative de la concentration de triglycérides dans du sérum et du plasma.

Pour diagnostic *in vitro*.

Pour utilisation professionnelle uniquement.

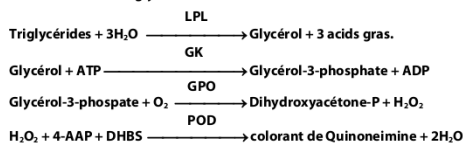
Signification clinique

Les triglycérides, des esters de glycérol et trois acides gras libres, sont le constituant principal des tissus adipeux de stockage, et servent de source d'énergie pour le corps. Ils sont transportés dans le sang comme des complexes lipoprotéiques. La signification clinique de triglycérides et d'autres lipides concerne leur contribution à la maladie cardiaque (coronarienne) et aux troubles lipoprotéiques. Des maladies ou conditions associées à une élévation des triglycérides comprennent le diabète de type 2, l'obésité, la grossesse, l'infection, l'inflammation, le syndrome néphrotique, l'insuffisance rénale chronique et la cirrhose/obstruction biliaire.

Le diagnostic clinique ne doit pas être établi sur un seul résultat de test, mais il doit intégrer les données cliniques et les autres paramètres de laboratoire.

Principe

Les triglycérides dans l'échantillon sont hydrolysés de manière enzymatique en glycérol et acides gras libres. Le glycérol libéré est d'abord phosphorylé par le glycérol kinase et est ensuite oxydé par glycérol-3-phosphate oxidase, libérant d'une quantité équivalente de l'eau oxygénée (H₂O₂). Le H₂O₂ participe à une réaction de Trinder modifiée, qui entraîne la formation d'un colorant quinoneimine rouge. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de triglycérides de l'échantillon.

**Réactifs**

Réactif	Quantité
Pipes pH 7,0	50 mmol/l
DHBS	1 mmol/l
Lipoprotéine lipase (LPL)	1500 U/l
Glycérol kinase (GK)	700 U/l
Glycérol-3-phosphate oxidase (GPO)	1500 U/l
Peroxydase (POD)	2000 U/l
4-Aminoantipyrine (4-AAP)	0,8 mmol/l
ATP	1,5 mmol/l
Standard	Triglycérides aqueux (en glycérol) 200 mg/dl

Préparation

Les réactifs et le standard sont prêts à l'emploi.

Conservation et stabilité

Tous les réactifs sont stables entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée, à condition d'être conservés dans un récipient fermé hermétiquement et à l'abri de la lumière et d'éviter les contaminations lors de leur utilisation. Manipuler le standard très soigneusement pour prévenir les contaminations.

Le réactif doit se présenter sous l'aspect d'une solution limpide. Jeter le réactif, si une turbidité ou une précipitation est constatée ou si l'absorbance à blanc à 510 nm est $\geq 0,23$.

Équipement supplémentaire

- Spectrophotomètre ou colorimètre permettant des mesures à 510 nm
- Cuvettes assorties (trajet optique 1,0 cm)
- Équipement général de laboratoire

Échantillons

Sérum ou plasma: stable 5 jours entre 2 - 8°C.

Méthode

1. Longueur d'onde 510 nm (500-550); Température 37°C/15-25°C; Cuvette trajet optique 1,0 cm.
2. Ajuster le zéro de l'instrument avec de l'eau distillée.
3. Pipeter dans une cuvette:

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard ^{note 1}	---	10 µl	---
Echantillon	---	---	10 µl
Réactif	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger et incuber 5 min à 37°C ou 10 min à température ambiante (15-25°C). Mesurer l'absorbance de l'échantillon et du standard versus le blanc. La couleur est stable au moins 30 minutes.

Calcul

$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{Abs}_{\text{Echantillon}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}}{\text{Abs}_{\text{Standard}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}} \times 200 (\text{stand. conc.})$$

Facteur de conversion: mg/dl x 0,0113 = mmol/l.

Contrôle de qualité

Il est recommandé d'utiliser des contrôles pour contrôler le fonctionnement de la méthode. Si les valeurs de contrôle se situent en dehors de la plage définie, contrôler si l'instrument, les réactifs et le calibre ne présentent pas d'anomalies. Chaque laboratoire doit élaborer son propre système de contrôle de la qualité et des mesures correctives si les contrôles ne sont pas conformes aux tolérances admissibles.

Sérums normale et pathologique humains (HBC01, HBC02) sont disponibles.

Valeurs de référence

< 150 mg/dl	Normal
150-199 mg/dl	Élevé
200-499 mg/dl	Hypertriglycéridémique
>499 mg/dl	Très élevé

Ces valeurs sont données à titre indicatif. Chaque laboratoire doit élaborer sa propre plage de référence.

Caractéristiques de fonctionnement

Plage de mesure: de 1,01 mg/dl (limite de détection) jusqu'à 1000 mg/dl (limite de linéarité). Si les résultats obtenus sont supérieurs à 1000 mg/dl, diluer l'échantillon 1:2 avec une solution saline, répéter la mesure et multiplier le résultat par le facteur 2.

Précision:

Moyenne (mg/dl)	Intra-essai (n=20)		Inter-essai (n=20)	
	1,14	2,10	1,08	2,66
SD	1,30	2,65	1,08	2,66
CV (%)	1,14	1,26	0,93	1,25

Sensibilité: 1 mg/dl = 0,0021 Abs

Exactitude: les résultats obtenus à l'aide des réactifs CYPRESS DIAGNOSTICS n'ont pas présenté de différence systématique par rapport aux autres réactifs disponibles dans le commerce.

Interférences

Aucune interférence n'a été observée avec bilirubine jusqu'à 10 mg/dl et hémoglobine jusqu'à 6 g/l. Une liste de médicaments et d'autres substances interférant avec la détermination de triglycérides a été publiée par Young et al.

Notes

1. L'étalonnage avec le standard aqueux peut provoquer une erreur systématique dans les systèmes automatiques. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser un calibre de sérum (HBC03).
2. Le glycérol libre présent dans les échantillons est également mesuré par cette méthode. Chez les personnes en santé, le glycérol endogène représente généralement une surestimation de triglycérides de ≤ 10 mg/dl.
3. L'utilisation de certains récipients en plastique peut entraîner un changement de couleur du réactif. Dans la mesure du possible, utiliser des récipients en verre pour des aliquotes du réactif (par exemple dans des procédures manuelles).
4. Pour la meilleure utilisation de cette trousse sur un analyseur Cypress Diagnostics (CYANSmart, CYANStart, CYANPro, CYANExpert 130) nous vous conseillons d'utiliser les fiches d'automatisation de l'instrument en question. Vous pouvez télécharger les fiches d'automatisation de notre site internet (www.diagnostics.be) après enregistrement.

Bibliographie

1. Trinder P. Ann. Clin. Biochem. 1969, 6(1): 24-27
2. Barham D. and Trinder P. Analyst 1972, 97(151): 142-145
3. Bucolo G. and David H. Clin. Chem. 1973, 19(5): 476-482
4. Megraw R. et al. Clin. Chem. 1979, 25(2): 273-278
5. Fossati P. and Prencipe L. Clin. Chem. 1982, 28(10): 2077-2080
6. McGowan M.W. et al. Clin. Chem. 1983, 29(3): 538-542
7. Kaplan A. et al. Triglycerides. Clin. Chem. The C.V. Mosby Co. St. Louis, Toronto, Princeton 1984; 437 and Lipids 1194-1206
8. Young D.S. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AAC Press 1995
9. Young D.S. Effects of diseases on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AAC Press 2001
10. Wu A.H.B. Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests, 4th ed. Saunders Elsevier 2006
11. Burtis C.A. and Bruns D.E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 7th ed. Elsevier 2015

10.2016, Rev. 3.0

Headquarters - Siège social: Langdorpsesteenweg 160 • 3201 Langdorp • Belgium • www.diagnostics.be

Factory - Fabrique: Industriepark 36 • Zone B5 • 2235 Hulshout • Belgium • Tel: ++ 32 15 67 67 68 • e-mail: cypress@diagnostics.be

Annexe 12: Protocole dosage du cholestérol HDL



HDL-cholestérol

Précipitation au phosphotungstique

Code HB007 3 x 10 ml

Conserver entre 2-8°C. Standard inclus.

Usage prévu

Détermination quantitative des niveaux d'HDL-cholestérol dans des échantillons de sérum ou plasma humains.

À usage diagnostique in vitro et utilisation professionnelle uniquement.

Signification clinique

Le cholestérol est une substance grasse qui se trouve dans le sang, la bile et le cerveau, et sert comme précurseur pour la synthèse des acides biliaires, des stéroïdes et de la vitamine D. La concentration de cholestérol totale au sérum sert comme indicateur des maladies métaboliques, infectieuses et cardio-vasculaires.

Dans le plasma, le cholestérol est transporté par trois lipoprotéines : lipoprotéines d'haute densité (HDL-cholestérol), lipoprotéines de basse densité (LDL-cholestérol) et lipoprotéines de très basse densité (VLDL-cholestérol).

Le diagnostic clinique ne doit pas être effectué sur un seul résultat; il devrait intégrer les données cliniques et autres données de laboratoire.

Principe

Les lipoprotéines de faible densité (LDL et VLDL) sont précipitées spécifiquement par l'acide phosphotungstique et les ions magnésiums et peuvent ainsi être séparés par centrifugation, les lipoprotéines à haute densité (HDL) restent en suspension. La détermination de HDL se fait en utilisant un surnageant clair.

Composition de réactifs

Réactif A	Acide phosphotungstique 14 mmol/l
Réactif de précipit.	Chlorure de magnésium 2 mmol/l
Standard	HDL-cholestérol aqueux 50 mg/dl
Nécessaire en plus	Réactif de cholestérol HB006 / HBL010

Précautions

Réactif A : H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. P280 : Porter des gants de protection, des vêtements de protection, équipement de protection des yeux et du visage. P501 : Élimination des contenus/contenants conformément aux dispositions locales/régionales/nationales/internationales en vigueur.

Préparation des réactifs

Le réactif A et le standard sont prêts à l'emploi.

Conservation et stabilité

Tous les réactifs sont stables entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée, à condition d'être conservés dans un récipient fermé hermétiquement et à l'abri de la lumière et d'éviter les contaminations lors de leur utilisation. Manipuler le standard très soigneusement pour prévenir les contaminations.

Le réactif doit se présenter sous l'aspect d'une solution limpide. Jeter le réactif, si une turbidité ou une précipitation est constatée.

Équipement supplémentaire

- Spectrophotomètre ou colorimètre permettant des mesures à 505 nm
- Cuvettes assorties (trajet optique 1,0 cm)
- Équipement général de laboratoire

Échantillons

Sérum ou plasma, ne pas hémolysé. Séparer du calot de sang le plus vite possible.

HDL-Cholestérol est stable 7 jours entre 2-8°C.

Méthode de test^{Note 1}ÉTAPE DE PRÉCIPITATION^{Note 2,3}

Pipeter dans les tubes à centrifuger:

Echantillon/Contrôle/Calibreur	1 ml
R.A (Réactif précipitant)	100 µl

Mixer et laisser reposer 10 minutes à température ambiante.

Centrifuger à 4000 tours/min pendant 20 min ou à 12000 tours/min pendant 2 min.

Rassembler le surnageant et mesurer le HDL-cholestérol en suivant les instructions du réactif de cholestérol

ÉTAPE DE TEST

Suivre les instructions du réactif de cholestérol.

Calcul

Avec standard:

$$\text{HDL Cholestérol (mg/dl)} = \frac{\text{Abs}^{\text{échant.}} - \text{Abs}^{\text{Blanc}}}{\text{Abs}^{\text{Standard}} - \text{Abs}^{\text{Blanc}}} \times 50 (\text{standard conc.})$$

Calcul de LDL-cholestérol suivant la formule de Friedewald:

$$\text{LDL-Chol} = \text{Total Chol.} - (\text{Triglycérides} / 5) - \text{HDL-Chol.}$$

Contrôle de qualité

Il est recommandé d'utiliser des contrôles pour contrôler le fonctionnement de la méthode. Si les valeurs de contrôle se situent en dehors de la plage définie, contrôler si l'instrument, les réactifs et le calibreur ne présentent pas d'anomalies. Chaque laboratoire doit élaborer son propre système de contrôle de la qualité et des mesures correctives si les contrôles ne sont pas conformes aux tolérances admissibles.

Un contrôle de lipide (HBC07) est disponible.

Valeurs de référence

HDL-cholestérol			
Risque	Inférieur	Standard	Élevée
Femme (mg/dl)	> 65	45-65	<45
Hommes (mg/dl)	> 55	35-55	<35
LDL-Cholestérol			
Suspects à partir de 150 mg/dl			
Élevés à partir de 190 mg/dl			

Ces valeurs sont données à titre indicatif. Chaque laboratoire doit élaborer sa propre plage de référence.

Caractéristiques de fonctionnement

Plage de mesure: de 1,57 mg/dl (limite de détection) jusqu'à 275 mg/dl (limite de linéarité). Si les résultats obtenus sont supérieurs à 275 mg/dl, diluer l'échantillon 1:2 avec une solution saline, répéter la mesure et multiplier le résultat par le facteur 2.

Précision:

Moyenne (mg/dl)	Intra-assai (n=20)		Inter-assai (n=20)	
	75,8	33,9	34,8	75,4
SD	0,89	0,85	1,25	1,95
CV (%)	1,18	2,51	3,60	2,59

Sensibilité: 1 mg/dl = 0,0015 Abs

Exactitude: les résultats obtenus à l'aide des réactifs CYPRESS DIAGNOSTICS n'ont pas présenté de différence systématique par rapport aux autres réactifs disponibles dans le commerce.

Interférences

Aucune interférence n'était observée avec des triglycérides jusqu'à 4 g/l. Une liste de médicaments et d'autres substances interférant avec la détermination de HDL-cholestérol a été publiée par Young et al.

Notes

1. L'étalonnage avec le standard aqueux peut provoquer une erreur systématique dans les systèmes automatiques. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser le calibreur HDL/LDL (HBS03).
2. L'étape de précipitation peut être réalisée avec la moitié des volumes du réactif et de l'échantillon.
3. Le standard ne doit pas être précipité. Il doit seulement être utilisé dans l'étape de Test. Cependant, le contrôle de lipide (HBC07) et le calibreur HDL/LDL (HBS03) devraient être précipités avant de procéder à l'étape de test.
4. Pour la meilleure utilisation de cette trousse sur un analyseur Cypress Diagnostics (CYANsmart, CYANstart) nous vous conseillons d'utiliser les fiches d'automatisation de l'instrument en question. Vous pouvez télécharger les fiches d'automatisation de notre site internet (www.diagnostics.be) après enregistrement.

Références

- Naito H.K. Cholesterol. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis.
 Meattini F. et al. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. Clin Chem 1978; 24(12): 2161-2165.
 Grove T.H. Clin Chem 1979; 25: 560
 US National Cholesterol Education Program of the National Institute of Health.
 Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCPress 1995
 Young DS. Effects of diseases on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCPress 2001
 Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCPress 1999
 Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory tests, 3rd ed AACCPress 1995.

02.2017, Rev. 9.0



Cypress Diagnostics: Langdorpsesteenweg 160 • 3201 Langdorp • Belgium
www.diagnostics.be • Tel: ++ 32 15 67 67 68 • e-mail: cypress@diagnostics.be

Annexe 13 : Protocole dosage de l'albumine



Albumine

Test colorimétrique "Bromocresol Green"

Code HB001 1 x 1000 ml
HB0010 2 x 125 ml

Conserver entre 2-25°C. Liquide. Standard inclus.

Signification clinique

L'albumine est le constituant protéique du sérum le plus abondant. Des taux élevés d'albumine sérique évoquent une éventuelle déshydratation. Des taux bas d'albumine sérique suggèrent l'éventualité d'une malnutrition, d'une affection hépatique, de troubles rénaux ou d'une polyarthrite rhumatoïde. Le diagnostic clinique ne doit pas être établi sur un seul résultat de test, mais il doit intégrer les données cliniques et les autres paramètres de laboratoire.

Principe

A pH 4,0, l'albumine se lie sélectivement au vert de bromocrésol. L'augmentation de l'absorbance à 630 nm du complexe d'albumine colorée est proportionnellement à la concentration de l'albumine.

Composition de réactifs

Réactif 1	Vert de Bromocresol, pH 4,00,12 mmol/l
Standard	Albumin aqueux voir la valeur sur l'étiquette

Pour le diagnostic *in vitro*.**Précautions**

Réactif 1: H319 : Provoque des lésions oculaires graves. P280 : Porter des gants de protection, des vêtements de protection, équipement de protection des yeux et du visage. P501 : Élimination des contenus/contenants conformément aux dispositions locales/régionales/nationales/internationales en vigueur.

Préparation

Réactif 1 et standard sont prêt à l'emploi.

Conservation et stabilité

Tous les réactifs sont stables entre 2 et 25°C jusqu'à la date de péremption indiquée, à condition d'être conservés dans un récipient fermé hermétiquement et à l'abri de la lumière et d'éviter les contaminations lors de leur utilisation. Du moment le flacon du standard a été ouvert, le standard reste stable pendant 3 mois. Ne pas dépasser la température de 25°C durant stockage. Le réactif doit se présenter sous l'aspect d'une solution limpide, vert-jaunâtre. Jeter le réactif, si une turbidité ou une précipitation a été constatée ou si l'absorbance à blanc à 630 nm est $\geq 0,40$.

Équipement supplémentaire

- Spectrophotomètre ou colorimètre permettant des mesures à 630 nm
- Cuvettes assorties (trajet optique 1,0 cm)
- Équipement général de laboratoire

Échantillons

Sérum ou plasma, ne pas hémolysé. Stabilité: 1 mois entre 2-8°C ou 1 semaine entre 15-25°C

Procédure

1. Longueur d'onde 630 nm (600-650); Température 15-25°C; Cuvette trajet optique 1 cm.
2. Ajuster le zéro de l'instrument avec de l'eau distillée.
3. Pipeter dans une cuvette:

	Blanc	Standard	Échantillon
Standard	---	5 µl	---
Echant.	---	---	5 µl
Réactif 1	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Mélanger bien, incuber 10 min à la température ambiante. Mesurer l'absorbance (abs) de l'échantillon et du standard versus le blanc. La couleur est stable au moins 1 heure.

Calcul

$$\text{Albumine (g/dl)} = \frac{\text{Abs}_{\text{Échant.}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}}{\text{Abs}_{\text{Standard}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}} \times \text{conc. standard}$$

Facteur de conversion : g/dl x 144,9 = µmol/l

Contrôle de qualité

Il est recommandé d'utiliser des contrôles pour contrôler le fonctionnement de la méthode. Si les valeurs de contrôle se situent en dehors de la plage définie, contrôler si l'instrument, les réactifs et le calibre ne présentent pas d'anomalies. Chaque laboratoire doit élaborer son propre système de contrôle de la qualité et des mesures correctives si les contrôles ne sont pas conformes aux tolérances admissibles.

Sérum normale et pathologique humains (HBC01, HBC02) sont disponibles.

Valeurs de référence

3,5 – 5,0 g/dl.

Ces valeurs sont données à titre indicatif. Chaque laboratoire doit élaborer sa propre plage de référence.

Caractéristiques de fonctionnement

Plage de mesure: de 0,038 g/dl (limite de détection) jusqu'à 5,8 g/dl (limite de linéarité). Si les résultats obtenus sont supérieurs à 5,8 g/dl, diluer l'échantillon 1:2 avec une solution saline, répéter la mesure et multiplier le résultat par le facteur 2.

Précision:

	Intra-assai (n=20)		Inter-assai (n=20)	
Moyenne (g/dl)	4,56	2,98	4,62	3,06
SD	0,16	0,08	0,12	0,08
CV (%)	3,43	2,78	2,54	2,77

Sensibilité: 1 g/dl = 0,126 Abs

Exactitude: les résultats obtenus à l'aide des réactifs CYPRESS DIAGNOSTICS n'ont pas présenté de différence systématique par rapport aux autres réactifs disponibles dans le commerce.

Les résultats des caractéristiques de fonctionnement dépendent de l'analyseur utilisé.

Interférences

Hémoglobine (22 mg/dl) n'interfère pas. Une liste de médicaments et d'autres substances interférant avec la détermination d'albumine a été publiée par Young et al.

Notes

L'étalonnage avec le standard aqueux peut provoquer une erreur systématique dans les systèmes automatiques. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser un calibre de sérum (HBC03).

Bibliographie

- Rodkey F.L. Clin Chem 1965; 11: 478-487
Webster D. Clin Chem. 1974; Acta 53: 109-115
Doumas BT. Clin Chem 1971; Acta 31: 87-96
Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press 1995
Young DS. Effects of diseases on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001
Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 4rd ed AACC 1999
Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory tests, 4rd ed AACC 1995.

Langdorp, 08.2015



Cypress Diagnostics: Langdorpsesteenweg 160 • 3201 Langdorp • Belgium
www.diagnostics.be • Tel: ++ 32 15 67 67 68 • e-mail: cypress@diagnostics.be

Annexe 14: Protocole dosage de l'acide urique



Acide urique Liq

Test Enzymatique et colorimétrique
URICASE-POD. Liquide.

Code HBL020 2 x 125 ml

Conserver entre 2-8°C. Standard inclus.

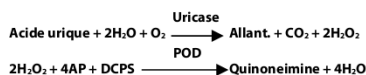
Signification clinique

L'acide urique est le produit final du métabolisme des purines. Près de la moitié de l'acide urique total est éliminée et remplacée chaque jour via l'excrétion urinaire et la dégradation microbienne dans le tube digestif. Des taux élevés d'acide urique sont généralement associés à la fois à une rétention azotée et à l'urée, à la créatinine et à d'autres constituants non protéiques. La détermination de l'acide urique représente un élément contributif au diagnostic de la goutte, de l'altération de la fonction rénale, des troubles myéloprolifératifs et à d'autres pathologies dans lesquelles la cause de l'hyperuricémie est mal connue^{1,5,6}.

Le diagnostic clinique ne doit pas être établi sur un seul résultat de test, mais il doit intégrer les données cliniques et les autres paramètres de laboratoire.

Principe

L'oxydation de l'acide urique par l'uricase produit l'allantoïne et le peroxyde d'hydrogène, lequel sous l'influence de POD, oxyde le DCPS et le 4-AP pour former un composant quinoneimine rouge.



La quantité de quinoneimine formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique^{1,5}.

Composition de réactifs

Réactif 1	Pipes pH 7,0.....50 mmol/l
Tampon	4-AP.....1 mmol/l
	Ascorbate oxydase (ASO).....1000 U/l
	Peroxidase (POD).....3800 U/l
Réactif 2	Pipes pH 7,0.....50 mmol/l
Enzymes	DCPS.....2,5mmol/l
	Uricase (UAO).....250 U/l
Standard	Uric Acid aqueous.....6 mg/dl

Pour le diagnostic *in vitro*.

Préparation

La solution de travail s'obtient en mélangeant proportionnellement 1:1 les réactifs R1 (Tampon) et R2 (Enzymes).

Cette solution de travail est stable 2 mois entre 2-8°C ou 2 semaines à la température ambiante (15-25°C).

Conservation et stabilité

Tous les réactifs sont stables entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée, à condition d'être conservés dans un récipient fermé hermétiquement et à l'abri de la lumière et d'éviter les contaminations lors de leur utilisation. Manipuler le standard très soigneusement pour prévenir les contaminations.

Les réactifs doivent se présenter sous l'aspect d'une solution limpide. Jeter les réactifs, si une turbidité ou une précipitation a été constatée ou si l'absorbance à blanc de la solution de travail à 520 nm est $\geq 0,12$.

Équipement supplémentaire

- Spectrophotomètre ou colorimètre permettant des mesures à 520 nm
- Cuvettes assorties (trajet optique 1,0 cm)
- Équipement général de laboratoire

Échantillons

Sérum ou plasma: stable pour 3-5 jours entre 2 et 8°C ou 6 mois à -20°C.

Urine (24h): stabilité 4 jours entre 15-25°C, pH>8. Diluer l'échantillon 1:50 avec l'eau distillée. Multiplier les résultats avec 50 (facteur de dilution). Si l'échantillon d'urines est trouble, chauffer-le à environ 60°C pendant 10 min pour dissoudre les précipités. Ne pas réfrigérer.

Procédure

1. Longueur d'onde 520 nm (490-550); Température 37°C/15-25°C; Cuvette trajet optique 1 cm.
2. Ajuster le zéro de l'instrument avec de l'eau distillée.
3. Pipeter dans une cuvette:

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard ^{inc}	---	25 µl	---
Echantillon	---	---	25 µl
Solution de travail	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante ou 5 min à 37°C. Mesurer l'absorbance (abs) de l'échantillon et du standard versus le blanc. La couleur est stable au moins 30 minutes.

Calcul

Sérum ou plasma:

$$\text{Acideurique(mg/dl)} = \frac{\text{Abs}_{\text{échant.}} - \text{Abs}_{\text{blanc}}}{\text{Abs}_{\text{standard}} - \text{Abs}_{\text{blanc}}} \times 6 \text{ (conc. standard)}$$

Urine 24h:

$$\text{Acide urique(mg/24h)} = \frac{\text{Abs}_{\text{échant.}} - \text{Abs}_{\text{blanc}}}{\text{Abs}_{\text{standard}} - \text{Abs}_{\text{blanc}}} \times 6 \text{ (conc. standard)} \times \text{Vol (dl) urine 24h}$$

Facteur de conversion: mg/dl x 59,5 = µmol/l.

Contrôle de qualité

Il est recommandé d'utiliser des contrôles pour contrôler le fonctionnement de la méthode. Si les valeurs de contrôle se situent en dehors de la plage définie, contrôler si l'instrument, les réactifs et le calibre ne présentent pas d'anomalies. Chaque laboratoire doit élaborer son propre système de contrôle de la qualité et des mesures correctives si les contrôles ne sont pas conformes aux tolérances admissibles.

Sérums normale et pathologique humains (HBC01, HBC02) ou bovins (HBC04, HBC05) sont disponibles.

Valeurs de références

Sérum ou plasma:

Homme	3,6 - 7,7 mg/dl	≈ 214 - 405 µmol/l
Femme	2,5 - 6,8 mg/dl	≈ 149 - 405 µmol/l
Urine:	250-750 mg/24h	≈ 1,49 - 4,5 mmol/24h

Ces valeurs sont données à titre indicatif. Chaque laboratoire doit élaborer sa propre plage de référence.

Caractéristiques de fonctionnement

Plage de mesure: de 0,06 mg/dl (limite de détection) jusqu'à 25 mg/dl (limite de linéarité). Si les résultats obtenus sont supérieurs à 25 mg/dl, diluer l'échantillon 1:2 avec une solution saline, répéter la mesure et multiplier le résultat par le facteur 2.

Précision:

Moyenne (mg/l)	Intra-assai (n=20)		Inter-assai (n=20)	
	4,37	10,00	4,38	10,10
SD	0,06	0,16	0,04	0,10
CV (%)	1,42	1,65	0,98	1,00

Sensibilité: 1 mg/dl = 0,0355 Abs

Exactitude: les résultats obtenus à l'aide des réactifs CYPRESS DIAGNOSTICS n'ont pas présenté de différence systématique par rapport aux autres réactifs disponibles dans le commerce.

Interférences

Aucune interférence n'a été observée avec bilirubine jusqu'à 10 mg/dl, hémoglobine jusqu'à 130 mg/dl et l'acide ascorbique jusqu'à 10 mg/dl. Une liste de médicaments et d'autres substances interférant avec la détermination d'acide urique a été publiée par Young et al^{1,4}.

Note

L'étalonnage avec le standard aqueux peut provoquer une erreur systématique dans les systèmes automatiques. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser un calibre de sérum (HBC03).

Bibliographie

1. Schultz A. Uric acid. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby CO. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1261-1266 and 418.
2. Fossati P et al. Clin Chem 1980; 26 :227-231
3. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press 1995
4. Young DS. Effects of diseases on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001
5. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999
6. Tietz NW et al. Clinical Guide to Laboratory tests, 3rd ed AACCC 1995.

Langdorp, 11.2015



Cypress Diagnostics: Langdorpsesteenweg 160 • 3201 Langdorp • Belgium
www.diagnostics.be • Tel: ++ 32 15 67 67 68 • e-mail: cypress@diagnostics.be

Annexe 15: Protocole analyse CRP

IVD

Conserver entre 2 - 8°C.

Ref. 22102 CRP trousse

100 t - 5 ml CRP latex
 contrôle positif 1 ml
 contrôle négatif 1 ml
 lame réutilisable en verre



CE
CRP-Latex
 Agglutination sur lame

Test sur lame pour la détermination qualitative de la protéine C-Réactive dans le sérum humain

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le réactif CRP est une suspension de particules de latex polystyrène recouvertes d'un antisérum spécifique anti-CRP humaine (fraction IgG). Une concentration égale ou supérieure à 6 mg/l de CRP dans un sérum non dilué génère une agglutination visible après mélange avec le réactif CRP.

RÉACTIFS

Latex: Latex particules recouvertes avec chèvre IgG anti-CRP humain, pH, 8.2. Conservateur.
 Control +: Sérum avec CRP concentration > 20 mg/l. Conservateur.
 Control -: Sérum animal. Conservateur.

PRÉCAUTIONS

Le contrôle positif est préparé à base de sérum humain testé par des méthodes reconnues et trouvé négatif quant à la présence d'antigène de surface de l'Hépatite B (HBsAg), et d'anticorps anti-VHC et anti-VIH (1/2). Toutefois, comme aucune méthode ne peut certifier l'absence totale d'agents infectieux, il est recommandé de manipuler tout produit à base de sérum humain avec les mêmes précautions que des échantillons potentiellement infectieux.

PRÉPARATION ET STABILITÉ

Le réactif CRP et les contrôles sont stables jusqu'à la date indiquée lorsqu'ils sont conservés à 2-8°C. Ne congeler pas les réactifs. Stocker les flacons dans la position verticale. En cas de changement de position, des agrégats visibles peuvent être présents dans le flacon. Dans ce cas, secouer vigoureusement le flacon ou placer-le sur un mélangeur vortex, afin de dissoudre les agrégats.

Une fois secoué, le réactif au latex doit être homogène et exempt d'agglutination visible.

ÉQUIPEMENT SUPPLÉMENTAIRE, NON FOURNI

- Rotatrice mécanique à vitesse réglable entre 80-100 tours/min.
- Pipettes 50 µl
- Agitateurs en plastique

CALIBRAGE

La sensibilité de latex de CRP est calibrée au Matériel de Référence ERM-DA 472/IFCC.

ÉCHANTILLONS

Utiliser des sera clairs et frais. L'utilisation des échantillons lipémiques ou hautement hémolysés ou faisant l'objet d'une contamination microbienne peut mener à des résultats erronés. Conserver les échantillons à 2-8°C durant 7 jours maximum. En cas de conservation plus longue durant 3 mois maximum, congeler les sera à -20°C. Les échantillons présentant de la fibrine doivent être centrifugés avant d'être utilisés.

MÉTHODE

Méthode qualitative

1. Laisser revenir les réactifs et les échantillons à température ambiante.
2. Placer une goutte de contrôle positif (50 µl) sur le puits #1 de la lame. Placer une goutte de contrôle négatif (50 µl) sur le puits #2 de la lame. Pipeter une goutte (50 µl) de chaque sérum non dilué sur les puits suivants.
3. Résuspendre le réactif CRP par agitation douce et placer une goutte (50 µl) sur chaque puits. A l'aide d'un agitateur, homogénéiser le mélange réactionnel dans chaque puits en étalant sur toute la surface du puits. Changer d'agitateur pour chaque échantillon afin d'éliminer les contaminations de puits à puits.
4. Mélanger par rotation de la lame (80-100 t.p.m.) pendant 2 minutes et lire immédiatement sous une lumière directe.

Méthode semi-quantitative

1. Laisser revenir les réactifs et les échantillons à température ambiante.
2. Réaliser des dilutions sériées doubles des échantillons dans une solution saline à 9 g/l.
3. Procéder pour chaque dilution comme dans la méthode qualitative.

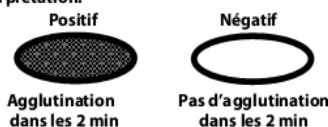
Dilutions	1/2	1/4	1/8	...
Sérum d'échantillon	100µl			
Solution saline	100µl	100µl	100µl	...
	↳	↳	↳	...
Volume d'échantillon	50 µl	50 µl	50 µl	...

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

Une réaction négative est indiquée par une suspension laiteuse uniforme, ne présentant aucune agglutination, comme observée avec le contrôle négatif.

La présence d'une agglutination visible est synonyme de réaction positive.

Interprétation:



Agglutination dans les 2 min

Pas d'agglutination dans les 2 min

Le titre dans la méthode semi-quantitative se définit comme l'inverse de la dilution la plus élevée présentant un résultat positif. La concentration est l'inverse de la dilution d'une lecture positive x 6:

6 x 1/dilution mg/l	6 x 2 12	6 x 4 24	6 x 8 48
---------------------	-------------	-------------	-------------

Taux usuels : Adultes < 6 mg/l

LIMITATIONS

La concentration en CRP augmente de manière significative en phase aiguë, notamment dans les différentes formes de lésions tissulaires. Des taux augmentés de CRP sont également rencontrés en cas de tumeur maligne, d'infarctus du myocarde, d'états inflammatoires etc.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

L'utilisation de témoins positifs et négatifs est recommandée pour contrôler le fonctionnement de la méthode, ainsi que pour obtenir un profil comparatif pour une meilleure interprétation du résultat.

Tous les résultats différents de celui du témoin négatif sont considérés comme positifs.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Sensibilité analytique: 6 (5-10) mg/l, dans les conditions de dosage décrites.
2. Effet prozone: Aucun effet prozone effet n'a été détecté jusqu'à 1600 mg/l (Notes).
3. Sensibilité diagnostique: 95.6 %.
4. Spécificité diagnostique: 96.2 %.

INTERFÉRENCES

L'hémoglobine (10 g/l), bilirubine (20 mg/dl) et les lipides (10 g/l), n'interfèrent pas. Les facteurs rhumatoïdes (100 IU/mL) interfèrent. Des autres substances peuvent interférer.

NOTES

Des échantillons avec une concentration très élevée peuvent donner des résultats faussement négatifs (effet prozone). Dans ce cas, refaire le test, utilisant une goutte de sérum de 20 µl.

Des sera contaminés et/ou un temps de réaction supérieur à 2 minutes peuvent donner des résultats faussement positifs. Comme pour toute méthode de diagnostic, une conclusion finale ne peut être envisagée que dans le cadre d'une investigation clinique complète et à la lumière des résultats d'autres analyses.

(a) Langdorp, 04.2015

Headquarters - Siège social: Langdorpsesteenweg 160 • 3201 Langdorp • Belgique • www.diagnostics.beFactory - Fabrique: Industriepark 36 • Zone B5 • 2235 Hulshout • Belgique • Tel: ++ 32 15 67 67 68 • e-mail: cypress@diagnostics.be

Annexe 16 : Préparation des réactifs pour dosage MDA

▪ Réactifs pour dosage MDA

- **Solution d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.37%**

- TBA 0.185 g
- Eau distillée 50 mL

- **Solution d'acide trichloacétique (TCA) 15%**

- TCA (cristaux) 7.5 g
- Eau distillée 50 mL

- **HCl 0.25N**

- HCl 1.04 mL
- Eau distillée 48.96mL

- **Solution de MDA**

Mélange des solutions de HCl, TCA et TBA dans les proportions 1 :1 :1

Annexe 17 : Préparation des réactifs pour dosage de la capacité antioxydante totale par la méthode FRAP

1- Tampon acétate 300 Mm. pH 3,6 ; PKa= 4,7

- Acide acétique : 4,13 ml
- Acétate de sodium : 0,66 g

Dissoudre 0,66 g d'acétate de sodium dans 200 ml d'eau, puis ajuster le pH à 3,6 par titration avec 4,13 ml d'acide acétique, et compléter le volume à 250 ml.

2- Solution de TPTZ 10 mM

- HCl 40 mM (0,86 mL HCl 12M + Eau distillée QSP 25 mL) : 25 ml
- TPTZ : 0,078 g

3- Solution de FeCl₃ 10 mM

- FeCl₃ : 0,34 g
- Eau distillée QSP : 25 ml

4- Réactif de FRAP

Mélanger les solutions de tampon acétate (300 mM ; pH 3,6), de TPTZ (10 mM) et de FeCl₃ (10 mM) dans les proportions 10 : 1 : 1.

Tableau : Tableau de dilution pour la détermination de la courbe d'étalonnage de la capacité antioxydante totale

Tube	0	1	2	3	4
[Fe ₂ SO ₄] (μM)	0	25	75	150	300
V (μl) Fe ₂ SO ₄ (mM)	0	50	150	300	600
V (μl) H ₂ O	2000	1950	1850	1700	1400
Volume final	2000	2000	2000	2000	2000

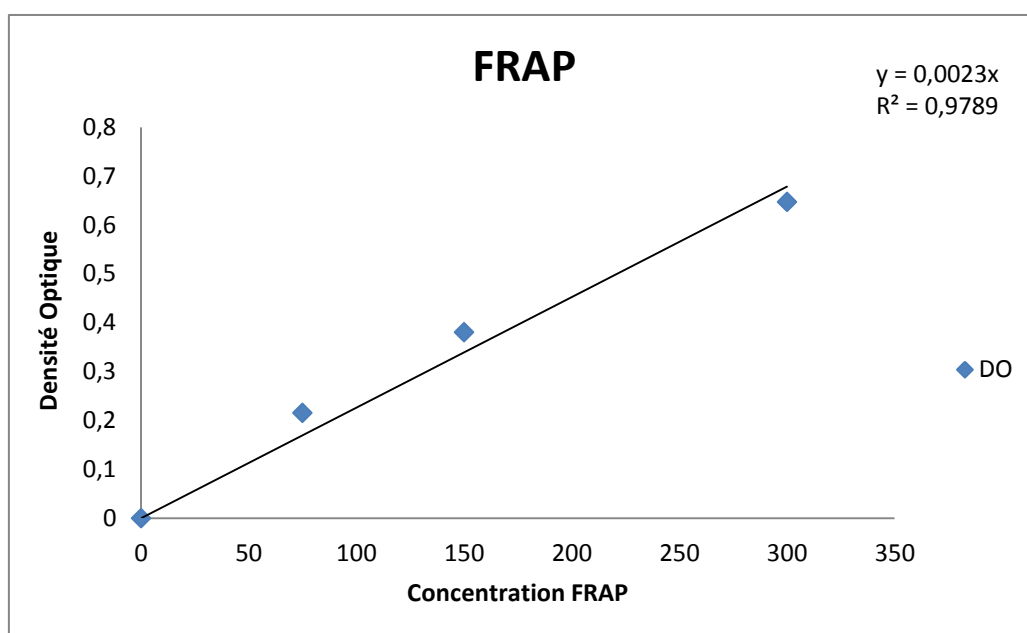


Figure : Courbe d'étalonnage du dosage de la FRAP

Annexe 18 : Preparation des Réactifs pour dosage de la SOD et GSH

▪ Preparation des Réactifs pour dosage de la Super Oxyde Dismutase (SOD)

1. Tampon Tris-EDTA pH 8.2

Un poids de 2,85 g de Tris et 1,11 g d'EDTA-Na₂ (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate) est dissous dans 1 litre d'eau distillée.

2. Solution de Pyrogallol (0.2 mM)

Un poids de 0,252 g de pyrogallol a été dissous dans une solution de 0,6 ml d'acide Chlorhydrique concentré dilué dans 1 litre d'eau distillée.

▪ Préparation du réactif d'Ellman pour dosage GSH

- Tampon phosphate (0,1M ; pH= 7,4 ; pKa=7,21 ; V = 500 ml)

- Na₂HPO₄ (disodium hydrogène phosphate) m= 10,9 g
- NaH₂PO₄ (di-natrium hydrogenphosphate-2hydrat) m= 3,06 g

Remarque : 50 ml de tampon phosphate sera prélevé des 500 ml de départ pour les blancs.

- Acide 2,2-dithio-5,5'-dibenzoïque (DTNB) (V= 450 ml)

- Acide 2,2-dithio-5,5'-dibenzoïque (DTNB) : m = 8,92 mg
- Eau distillée

Annexe 19 : Concentration etalons et courbe d'étalonnage du dosage de la Catalase

Réactifs

▪ Tampon phosphate 0,01M ; pH 7 ; PKa : 7,21

Solution A

- Na₂H₂PO₄, H₂O 83 mg
- Eau distillée QSP 50 mL

Solution B

- Na₂H₂PO₄, 12H₂O 143 mg
- Eau distillée QSP 50 mL

Mélanger les deux solutions A et B. Ajuster le pH 7

▪ Solution d'acide acétique et de dichromate de potassium (5%)

- Acide acétique glacial 75 mL
- Dichromate de potassium 1,25 g
- Eau distillée QSP 25 mL

▪ Peroxyde d'hydrogène 0,2 M

- Peroxyde d'hydrogène à 30% 0,45 mL
- Eau distillée QSP 20 MI

Tableau : Etalonnage de dosage de la catalase

Tubes	0	1	2	3	4	5
[H ₂ O ₂] (μM)	0	25	50	100	150	200
Volume H₂O₂ 200μM (μl)	0	250	500	1000	1500	2000
Tampon phosphate 0,01M (μl)	2000	1750	1500	1000	500	0
Volume final (μl)	2000	2000	2000	2000	2000	2000

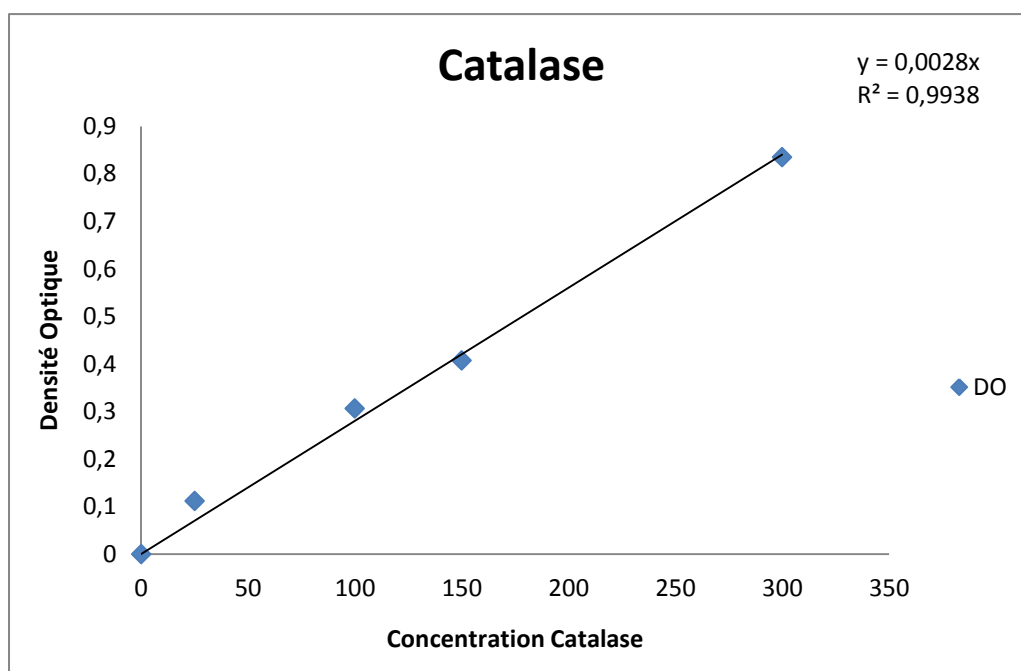


Figure : Courbe d'étalonnage dosage de la catalase

Annexe 20 : Concentration étalons et courbe d'étalonnage du dosage de la vitamine C

▪ Préparation des réactifs.

Une solution de vitamine C de concentration 100 µg/ml a été préparée en introduisant 0,1g de vitamine C pure dans une fiole de 1000 ml puis complétée avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Cette solution mère a servi à la préparation des différentes gammes d'étalons de vitamine C à différentes concentrations de 10 µg/ml ; 20 µg/ml; 30 µg/ml ; 50 µg/ml et 70 µg/ml.

Tableau: Concentrations d'étalons.

Concentrations							
vitamine C µg/ml	0	10	20	30	50	70	100
Eau distillée ml	0	9	8	7	5	3	0
Vitamine C ml	0	1	2	3	5	7	10
D.O	0	0,084	0,121	0,180	0,295	0,395	0,527

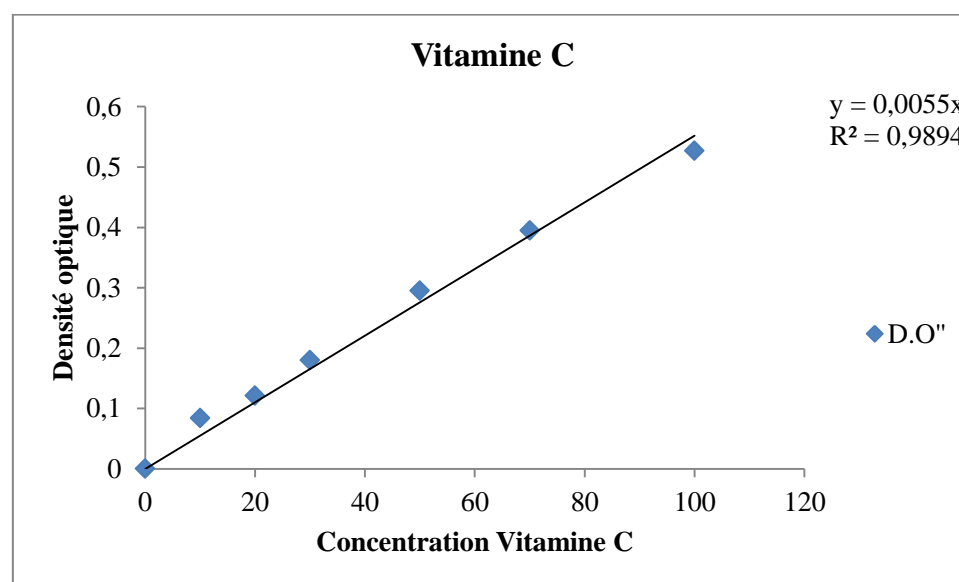


Figure : Courbe d'étalonnage du dosage de la vitamine C

Expression des résultats :

Les concentrations de vitamine C sont lues en utilisant la courbe d'étalonnage et calculées en utilisant la formule ci après : $C (\mu\text{g/ml}) = D.O/0,005$

Annexe 21: Préparation de la solution standard de vitamine E et courbe d'étalonnage

■ Préparation des réactifs.

Une solution mère de vitamine E de concentrations 200 µg/ml a servie à la préparation des différentes gammes d'étalons de vitamine E à différentes concentrations de 2,5 µg/ml ; 7,5 µg/ml; 15 µg/ml ; 25 µg/ml ; 50 µg/ml et 100 µg/ml.

Tableau: Concentrations d'étalons dosage vitamine E.

Vitamine E 200 µg/ml	0	2,5	7,5	15	25	50	100
Volume vit E 200 µg/ml (µl)	0	18.75	37.5	75	125	250	500
Méthanol ou éther de pétrole (µl)	1000	981.25	961.5	925	875	750	500
Volume final (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

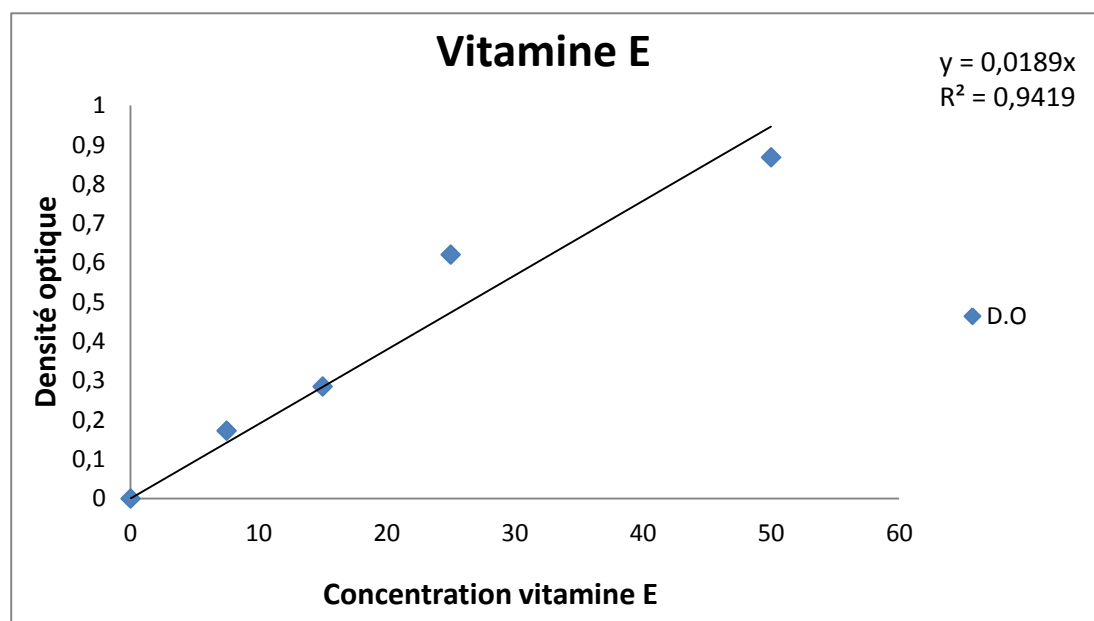




Figure : Courbe d'étalonnage du dosage de la vitamine E

Annexe 22: Procédure préparation du milieu de culture TGEA



TECHNICAL SHEET
TS610089
Rev. 0 of 14.05.2007
Page 1 of 2



TRYPTONE GLUCOSE EXTRACT AGAR
Dehydrated medium for cultivating and enumerating microorganisms in water and dairy products

TYPICAL FORMULA (g/L)

Beef extract.....	3.0
Tryptone.....	5.0
Dextrose.....	1.0
Agar.....	15.0
Final pH	7.0 ± 0.2

DESCRIPTION
TRYPTONE GLUCOSE EXTRACT AGAR is used for cultivating and enumerating microorganisms in water and dairy products.

PRINCIPLE
Beef extract, tryptone provide nitrogen, carbon, sulphur and other essential growth factors. Dextrose is the source of energy. Agar is the solidifying agent.

PREPARATION
Suspend 24.0 g of powder in 1 litre of distilled or deionized water. Heat to boiling and shake until completely dissolved.
Sterilize at 121°C for 15 minutes. Dispense in final containers.

TECHNIQUE
Consult the reference for information regarding the processing and inoculation of bottled water samples.¹
Inoculate 1 mL samples of appropriate dilutions of the test sample into sterile Petri dishes and molten, cooled TRYPTONE GLUCOSE EXTRACT AGAR is added followed by gentle mixing to distribute the sample dilution throughout the agar.
Incubate at 32±1°C, or as specified in standard methods (35±0.5°C for at least 72 hours)¹.

INTERPRETATION OF RESULTS
Follow recommended procedures for counting colonies and reporting results¹.
Because bacteria found in bottled water demonstrate a prolonged lag phase during adaptation to growth on TRYPTONE GLUCOSE EXTRACT AGAR, extended incubation beyond 48 hours may be required¹.


STORAGE
The powder is very hygroscopic; store the powder at 10-30°C, in a dry environment, in its original container tightly closed until the expiry date on the label or until signs of deterioration or contamination are evident.
Store prepared media at 2-8°C.

WARNING and PRECAUTIONS
The product is not classified as hazardous by current legislation and does not contain harmful substances in concentrations of ≥1%.
The product must be used only by properly trained operators.

DISPOSAL of WASTE
Disposal of waste must be carried out according to national and local regulations in force.

REFERENCES

- Kim and Feng.2001. In Downes and Ito (ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- American Public Health Association.1948. Standard methods for the examination of dairy products, 9th ed. American Public Health Association, New York, N.Y.
- American Public Health Association.1972. Standard methods for the examination of dairy products, 13th ed. American Public Health Association, New York, N.Y.
- American Public Health Association.1980. Standard methods for the examination of dairy products, 15th ed. American Public Health Association, New York, N.Y.



LIQFILCHEM Bacteriology Products
64026 ROSETO D.A. (TE) ITALY- Via Scozia- Zona Ind.le
Tel. +39 085 8930745 - Fax +39 085 8930330
Sito Web: <http://www.liofilchem.net> E-Mail: liofilchem@liofilchem.net

Annexe 23: Principe galerie Api 20NE

20 050

api 20 NE

076157 - FR - 2001/00

Pour diagnostic in vitro

Système d'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries

API 20 NE est un système standardisé combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation, pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Morax*, *Aeromonas*, etc.). Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. *Brucella* et *Francisella*) ne font pas partie de la base de données API 20 NE. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'identification en fin de notice.

PRINCIPE

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant milieux et/ou substrats déshydratés.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

REACTIFS

Composition du coffret (25 tests) :

- 25 galeries API 20 NE
- 25 boîtes d'incubation
- 25 ampoules de milieu synthétique AUX Medium
- 25 fiches de résultats
- 1 notice technique

Produits complémentaires non fournis

(* Produits disponibles chez bioMérieux - consulter tarif ou bioMérieux pour leur référence) :

- NaCl 0,85 % Medium, 2 ml (*)
- Réactifs : JAMES (*)
- NIT 1 (*)
- NIT 2 (*)
- Zn (*)
- Oxydase (*)
- Huile de paraffine (*)
- Pipettes ou PIPETTES (*)
- McFarland Standard (*) point 0,5
- Catalogue Analytique API 20 NE (*) ou logiciel d'identification(*)
- Protège-ampoules (*)
- Portoir pour ampoules (*)

Matériel de laboratoire nécessaire :

- Etuve (30°C)
- Réfrigérateur
- Bec Bunsen
- Crayon marqueur

COMPOSITION DES MILIEUX ET REACTIFS

NaCl 0,85 % Medium 2 ml	Chlorure de sodium Eau déminéralisée	8,5 g 1000 ml
AUX Medium 7 ml	Sulfate d'ammonium Agar Base minérale Amino-acides Vitamines et substances nutritives Tampon phosphate 0,04 M pH 7,1 pH final : 7,0-7,2	2 g 1,5 g 82,8 mg 250 mg 35,9 mg qsp 1000 ml
Réactif JAMES 5 ml	Composant J 2183 (confidentiel) HCl 1N	0,6 g qsp 100 ml
	S2425 : Eviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau ou moins pendant 10 minutes. En cas de contact avec la peau, laver avec du savon et beaucoup d'eau.	
Réactif NIT 1 5 ml	Acide sulfanilique Acide acétique H ₂ O	0,4 g 30 g 70 ml
	CORROSIF R34 : Provoque des brûlures. S2 : Conserver hors de portée des enfants. S23 : Ne pas respirer les vapeurs. S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.	
Réactif NIT 2 5 ml	N,N-diméthyl-1-naphthylamine Acide acétique H ₂ O	0,6 g 30 g 70 ml
	CORROSIF R34 : Provoque des brûlures. S2 : Conserver hors de portée des enfants. S23 : Ne pas respirer les vapeurs. S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.	
Réactif Zn 10 g	Zinc en poudre	
	INFLAMMABLE R15 : Au contact de feu dégage des gaz très inflammables. R17 : Spontanément inflammable à l'air. S15 : Conserver le récipient bien fermé et à l'abri de l'humidité. S43 : En cas d'incendie utiliser de la poudre contre incendie provoqué par les métaux "très finement divisés".	

Annexe 24 : Mode opératoire et lecture de la galerie Api 20NE

api 20 NE

07615F - FR - 2001/06

MODE OPERATOIRE

Traitement des prélèvements

API 20 NE ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements cliniques ou autres. Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture approprié (ex. gélose Trypcase Soja) selon les techniques usuelles de bactériologie.

Sélection des colonies

API 20 NE doit être utilisé avec des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux.

NOTE 1 : certaines espèces de bacilles à Gram négatif non entérobactéries qui sont oxydase négative (*S. maltophilia*, *Acinetobacter*...) sont parfaitement identifiées avec API 20 NE. On s'aidera du contexte clinique ou bactériologique pour utiliser cette galerie.

NOTE 2 : Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. *Brucella* et *Francisella*) ne font pas partie de la base de données API 20 NE. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence.

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrivez la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.)
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule de NaCl 0,85 % Medium (2 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions" (ampoule sans bouchon compte-gouttes) ou utiliser un tube contenant 2 ml de la même solution, sans additif.
- A l'aide d'une pipette ou d'une PSipette, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique, par aspirations ou par touches successives.
- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0,5 de McFarland.

NOTE : Pour le bon fonctionnement des tests de la galerie API 20 NE, il est très important d'ajuster la densité de l'inoculum au point 0,5 de McFarland. En particulier, une turbidité plus faible conduit à des résultats faussement négatifs. Ne pas toucher les cupules lors des manipulations et veiller à ne pas laisser la galerie exposée à l'air longtemps après inoculation.

Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPg avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, incliner légèrement la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la PSipette sur le côté de la cupule.
- Ouvrir une ampoule d'AUX Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions" (ampoule sans bouchon compte-gouttes) et y transférer environ 200 µl, soit environ 6-8 gouttes d'une PSipette, de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir tubes et cupules des tests [GLU] à [PAC] en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incubé à 30°C pendant 24 heures.

Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPg).
- La révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO₃ et TRP.

Test NO₃ :

- Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO₃.
- Après 5 mn, une couleur rouge indique une réaction positive, à noter sur la fiche de résultats.
- Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO₃.
- Après 5 mn, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc.

La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO₂ ou de N₂) est positive.

La production de N₂ peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique.

Test TRP :

Ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

Annexe 25: Principe, mode opératoire et lecture de la galerie Api 20E

REF 20 100 / 20 160

07544 J - 9 - 201005

FR

ap[®] 20 E™

07544 J - 9 - 201005

api[®] 20 E™

IVD

Système d'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'identification en fin de notice.

PRINCIPE

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et d'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

PRESENTATION

Coffret de 26 tests (réf. 20 100)

- 25 galeries API 20 E
- 25 boîtes d'incubation
- 25 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice

Coffret de 100 tests (réf. 20 160)

- 100 galeries API 20 E (4x25 galeries)
- 100 boîtes d'incubation
- 100 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice

COMPOSITION DE LA GALERIE

La composition de la galerie API 20 E est reportée dans le Tableau de Lecture de cette notice.

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs

- API NaCl 0,85 % Medium, 5 ml (Réf. 20 230) ou API Suspension Medium, 5 ml (Réf. 20 150)
- API 20 E coffret de réactifs (Réf. 20 120) ou réactifs individuels : TDA (Réf. 70 402) JAMES (Réf. 70 542) VP 1 + VP 2 (Réf. 70 422) NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
- Réactif Zn (Réf. 70 380)
- Oxydase (Réf. 55 635*)
- * référence non commercialisée dans certains pays : utiliser un réactif équivalent.
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- Catalogue Analytique API 20 E (Réf. 20 190) ou logiciel d'identification apiweb™ (Réf. 40 011) (consulter bioMérieux)

Matériel

- Pipettes ou PSpipettes
- Protège-ampoule
- Portoir pour ampoules
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

REACTIFS COMPLEMENTAIRES

- API OF Medium (Réf. 50 110) : Test pour la détermination du métabolisme fermentatif ou oxydatif du glucose.
- API M Medium (Réf. 50 120) : Test pour la détermination de la mobilité des bactéries aéro-anaérobies.

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI® M29-A, Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline - Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage des différents composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'anibiogramme.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries sont présentes dans une poche en aluminium avec sachets déshydratants. Après ouverture de celle-ci (*), conserver les galeries restantes avec les déshydratants en refermant la poche à l'aide de la barrette de fermeture (présente dans le coffret) : placer l'extrémité de la poche entre les deux pièces de la barrette et les taper soigneusement, à fond, sur toute leur longueur. Les galeries peuvent ainsi être conservées 10 mois après ouverture de la poche, à 2-8°C (ou jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage, si celle-ci est antérieure).

(*) *Recommandation pour l'ouverture de celle-ci* : couper juste en dessous de la soudure, en maintenant la poche droite, pour éviter d'endommager les sachets déshydratants.

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 20 E ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autres. Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté à la culture des Enterobacteriaceae et/ou des bacilles à Gram négatif non fastidieux selon les techniques usuelles de bactériologie.

MODE OPERATOIRE

Test oxydase

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21^{ème} test d'identification à noter sur la fiche de résultats.

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂, ...)] dans les ailettes pour créer une atmosphère humide.
- Inscire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- Sortir la galerie de son emballage.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

NOTE : API 20 E doit être utilisé avec des Enterobacteriaceae et/ou des bacilles à Gram négatif non fastidieux. Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. Brucella et Francisella) ne font pas partie de la base de données API 20 E. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exculer ou confirmer leur présence.

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (5 ml) ou une ampoule d'API Suspension Medium (5 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions" de la notice du produit, ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.
- A l'aide d'une pipette ou d'une PSpipette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

NOTE : la plupart des espèces de *Vibrio* sont halophiles. En cas de suspicion d'un *Vibrio*, réaliser la suspension bactérienne dans API NaCl 0,85 % Medium.

Inoculation de la galerie

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSpipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) ;
- pour les tests [GIT], [VP] et [GEL], remplir tube et cupule,
- pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
- pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

LECTURE ET INTERPRETATION

Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
 - Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.
- NOTE : Le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.
- Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à 3 :
 - Réincuber la galerie 24 heures (± 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
 - Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir paragraphe précédent).
 - Pour compléter l'identification, il peut être utile de réaliser des tests complémentaires (se reporter au paragraphe Identification).

Interprétation

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

- Détermination du profil numérique : Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^{ème} test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.
- Identification : Elle est réalisée à partir de la base de données (V4 1)
 - * à l'aide du Catalogue Analytique ;
 - Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.
 - * à l'aide du logiciel d'identification apiweb™ :
 - Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.

Annexe 26 : Recherche de la coagulase.

- **Principe.**

Elle est basée sur la coagulation du plasma de lapin oxalaté par une coagulase provenant d'un bouillon enrichi comme le bouillon staphylocoaguse.

- **Mode opératoire**

Un bouillon enrichi incubé pendant 18h à 37°C est mis en contact avec un volume égal du plasma de lapin oxalaté pendant 30 minutes à 37°C. Il y a coagulation du plasma de lapin si la bactérie possède une coagulase.

Annexe 27 : Photographie séance de prelevement de sang et membrane d'hémodialyse



Photo 1 : Séance de prélèvement de sang après la dialyse sur fistule veineuse (Gueguim, 2015).



Photo 2 : Membrane d'hémodialyse (type polysulfone) (Gueguim, 2015)



Photo 3 : Position d'un patient au cours d'une séance d'hémodialyse (Gueguim, 2015).

Annexe 28 : Photographie d'un site de prelevement de l'eau pour hémodialyse (point C) et test qualitative de CRP



Photo 4: Site de prélevement de l'eau pour hémodialyse (point C) (Gueguim, 2015).

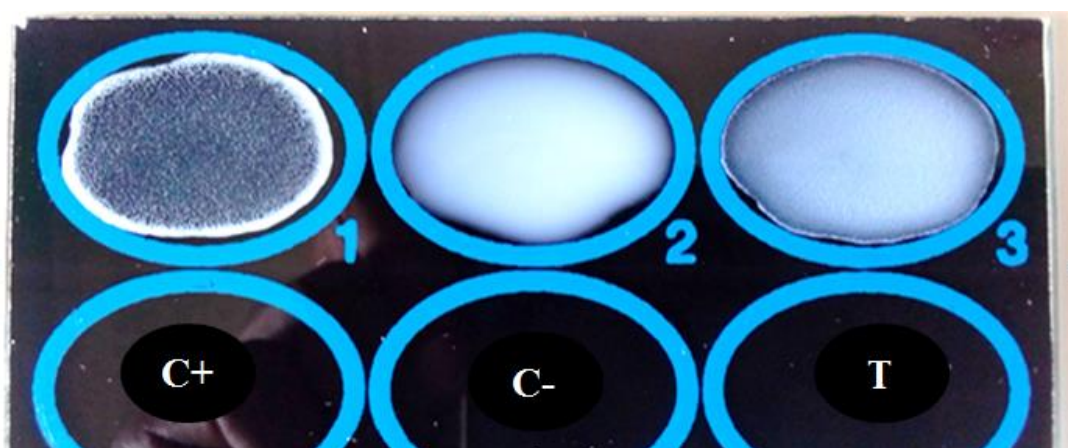


Photo 5: Test qualitative de CRP (Gueguim, 2016).

Annexe 29: Photographie Salle de traitement des eaux pour hémodialyse du CHUY et filtre à 10 μ



Photo 6 : Salle de traitement de l'eau pour hémodialyse CHUY. (GUEGUIM, 2015)



Photo 7 : Filtre à 10 μ de la station de traitement de l'eau pour hémodialyse CHUY (GUEGUIM, 2015).

Annexe 30: Photographie milieu de culture TGEA et colonies formées sur gélose TGEA après 7 jours d'incubation.



Photo 8 : Milieu de culture Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA) (GUEGUIM, 2015)

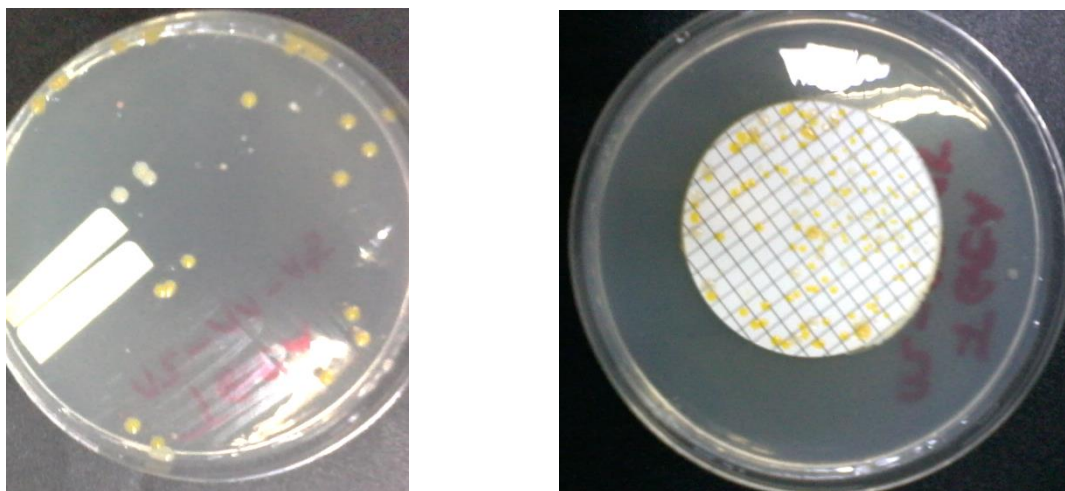


Photo 9 : Colonie formées sur une gélose TGEA après incubation de 7 jours à température ambiante (GUEGUIM, 2015)

Annexe 31: Colonies jaunes et blanches identifiées sur galerie API 20NE

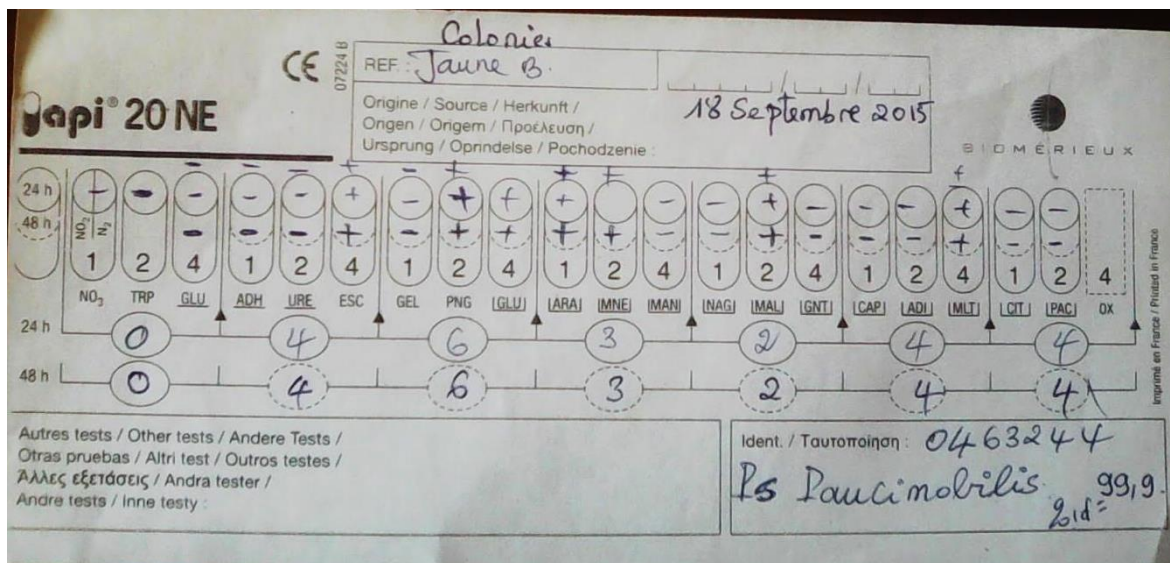


Photo 10 : Colonies jaunes identifiées sur galerie API 20NE (GUEGUIM, 2015).



Photo 11 : Colonies blanches sur galerie API 20NE (GUEGUIM, 2015).

PUBLICATIONS

Assessment of Lipid Dysfunction of Patients Under Haemodialysis in Cameroon

Cédric Gueguim¹, Lucien Etamé Soné^{1,2}, Henriette Thérèse Dimodi^{1,2}, Marie Patrice Halle³, François Kaze Folefack⁴, Constant Anatole Pieme⁴, Nnanga Nga^{2,3,4}, Wilfred Mbacham^{1,4}

¹Département de Biochimie, University of Yaoundé I, Central Region, Cameroon

²Institute of Medical Research and Medicinal Plants (IMPM), Central Region, Cameroon

³Faculty of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Douala, Littoral Region, Cameroon

⁴Faculty of Medicine and Biomédical Sciences, University of Yaoundé I, Central Region, Cameroon

Email address:

guedcedricfr@yahoo.fr (C. Gueguim), ngnnanga@yahoo.fr (N. Nga)

To cite this article:

Cédric Gueguim, Lucien Etamé Sone, Henriette Thérèse Dimodi, Marie Patrice Halle, François Kaze Folefack, Constant Anatole Pieme, Nnanga Nga, Wilfred Mbacham. Assessment of Lipid Dysfunction of Patients Under Haemodialysis in Cameroon. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*. Vol. 5, No. 4, 2017, pp. 63-68. doi: 10.11648/j.ajbls.20170504.11

Received: April 18, 2017; Accepted: May 6, 2017; Published: July 6, 2017

Abstract: Dyslipidaemia is a major risk factor of cardiovascular disease of patients under haemodialysis. Both increase and decrease of cholesterol levels are associated with higher cardiovascular mortality rate in haemodialysis patients. The objective of this study was to assess the lipid dysfunction among patients maintained under haemodialysis in two reference centres of haemodialysis in Cameroon. A descriptive comparative study was carried out in Nephrology Unit of the University Teaching Hospital of Yaoundé and the same Unit of the Douala General Hospital, Cameroon. A total of 160 subjects were studied: Of these, there were 80 patients under haemodialysis and 80 healthy controls. Body mass index (BMI) was measured according to WHO's guidelines. Serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were assayed before and after haemodialysis session. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated using Friedwald's equation. Their cardiovascular risk indices (TC / HDL-C) were also determined. Patients under haemodialysis had significantly lower BMI as compared with the healthy controls ($p < 0.05$). Total Cholesterol, LDL-C and HDL-C were considerably lower before and after haemodialysis compared with the healthy controls ($p < 0.05$). A non-significant difference was found between Triglycerides before and after haemodialysis in contrast with the healthy controls ($p > 0.05$). The cardiovascular risk indices (TC / HDL-C) of the patients under haemodialysis were higher than those of the healthy control group. Patients under haemodialysis had quite low BMI, total Cholesterol, LDL-C and HDL-C depicting malnutrition leading to inflammation, accelerated atherosclerosis process and cardiovascular complications.

Keywords: Total Cholesterol, Lipoproteins, BMI, Haemodialysis, Cardiovascular Disease

1. Introduction

Dyslipidaemia is highly prevalent in patients on maintenance haemodialysis (MHD), with predominance of the atherogenic triad, i.e. hypertriglyceridemia, elevated very low density lipoprotein (VLDL) and reduced high-density lipoprotein (HDL) [1]. This mimics the lipid abnormalities of metabolic syndrome, which accelerate the progression of atherosclerosis and increase the risk for cardiovascular mortality [2]. Patients with chronic kidney disease (CKD) are in the highest risk category, i.e. a coronary heart disease

(CHD) risk equivalent, for risk factor management of cardiovascular disease [3]. The incidence of cardiovascular disease is high in patients under haemodialysis [4], coronary heart disease risk factors in the general population remain predictive of cardiovascular disease (CVD) among patients with CKD [5]. Cardiovascular disease is the major cause of death in haemodialysis patients, accounting for almost 50 percent of deaths [6]. Many atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) risk factors are prevalent more in the end

stage renal disease (ESRD) than in the general population. Of the traditional risk factors for atherosclerotic cardiovascular disease ASCVD in patients with end stage renal disease ESRD, dyslipidaemia may play a major role. Control of these risk factors may have a substantial impact in reducing the excess burden of coronary heart disease [7]. Cholesterol levels may be lower in patients under haemodialysis. In this setting, there is an inverse relationship between mortality and the cholesterol concentration [8]. This pattern of reverse epidemiology, i.e. hypercholesterolemia associated with decreased mortality and low cholesterol concentration in patients under haemodialysis associated with increased CVD mortality has been associated with malnutrition inflammation atherosclerosis complex [9-10]. Keeping in view, the mortality associated with CVD in haemodialysis patients and the association of cholesterol levels with CVD in patients under haemodialysis, we planned to study the lipid profile of patients under haemodialysis in two reference centres of haemodialysis in Cameroon by comparison to healthy controls. This study was done to understand the burden and the type of lipid dysfunction in patients undergoing haemodialysis, in order to adopt appropriate measures to decrease CVD mortality rate within this population.

2. Methodology

2.1. Study Population, Sample Size and Sample

This study was carried out in the Nephrology Unit of the University Hospital Center of Yaoundé (CHUY) and the Nephrology Unit of the Douala General Hospital, Cameroon. Eighty patients (45 men and 35 women), aged between 20 and 75 years with end-stage renal disease (ESRD) who were placed on dialysis two times per week for 4 hours with the use of Polysulfone membranes, were included. Also, a control group of healthy volunteers made up of 80 healthy people (45 men and 35 women), aged between 28 and 65 years, were also recruited. None among the patients was a smoker, an alcoholic or was suffering from HIV/AIDS. A research authorization N° 191 AR/MINSANTE/HGD/DM/07/15 issued by the Medical Service of the Douala General Hospital was obtained for the study as well as an authorization from the General Directorate of the Yaoundé Hospital and University Centre was obtained. Ethical clearance N° 2015/12/709/CE/CNERSH/SP was also obtained from the National Ethics Committee on Research on Human Health and a duly signed consent form from each patient who participated in the study was also obtained before inclusion in the study.

2.2. Anthropometric Measurements

Clinical history and physical examination of each subject was carried out. The height and weight of all individuals were measured using a measuring scale and weighing machine. Body Mass Index (BMI) was calculated in kg/m^2 .

2.3. Blood Sampling, Processing and Biochemical Analysis

Four ml of blood samples were collected in dry tubes at the end of the fistula needle before and after dialysis for the analysis of the lipid parameters in the biochemical laboratory of the Faculty of Medicine and Biomedical Sciences of the University of Yaoundé 1. Serum total cholesterol (TC) was estimated by enzymatic cholesterol-colorimetric test CHOD-POD. Liquid [11] and Serum triglycerides by enzymatic-colorimetric test GPO-POD [12]. Serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) by enzymatic colorimetric method. Low-density lipoproteins cholesterol (LDL-C) was calculated using Friedwald's equation:

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - (\text{HDL-C} + \text{TG}/5) \quad [13].$$

2.4. Data Analysis

Data was statistically analysed using the software Statistical10 of Statsoft. Means, standard error and percentages were calculated. An ANOVA one-way analysis (PostHoc Fisher LSD) was performed to assess the significance of the differences observed between the values obtained. A p value < 0.05 was taken as significant.

3. Results

3.1. Personal Characteristics of Study Groups

One hundred and sixty subjects, 80 control and 80 MHD patients, completed the study. Forty five individuals were male and 35 were females in each group (Figure 1). The age range of control and test subjects were 20–75 years with a mean \pm standard error of 48.69 ± 12.5 and 47.70 ± 13.08 for patients under haemodialysis and control groups respectively.

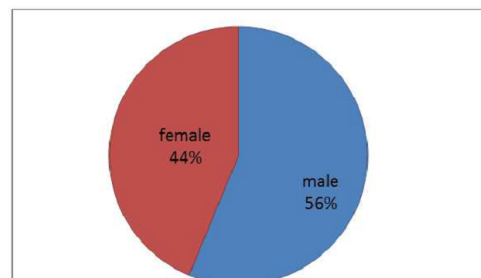


Figure 1. Sex distribution of study subjects.

3.2. Distribution of BMI Among Patients Under Haemodialysis and Controls

The patients under haemodialysis had lower BMI compared to controls. The standard errors were calculated and shown to be 23.50 ± 3.45 vs 25.68 ± 4.18 (Figure 2).

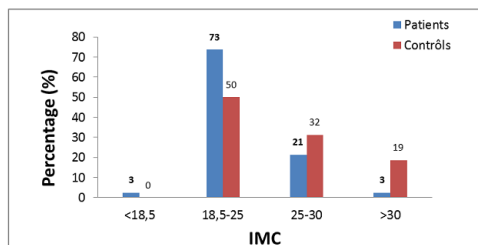


Figure 2. Distribution of BMI among patients under haemodialysis.

3.3. Lipid Profile of 160 Study Individuals Before and After Haemodialysis

The Total Cholesterol (TC), the LDL-C and the HDL-C of MHD patients were considerably lower before and after haemodialysis in contrast with the healthy controls as shown in Table-1. Non-significant difference was found between Triglycerides before and after haemodialysis as compared with the controls ($p > 0.05$). The cardiovascular risk indices TC / HDL-C of the chronic renal failure patients were higher before and after haemodialysis than that of the controls.

Table 1. Lipid Profile of 160 Study Individuals.

Serum Cholesterol/ Triglycerides (g/L)	patients on haemodialysis Mean \pm standard error (n=80)		Controls Mean \pm standard error (n=80)
	Before haemodialysis	After haemodialysis	
Total Cholesterol	0.75 \pm 0.49 ^a	0.88 \pm 0.45 ^a	1.26 \pm 0.85 ^b
LDL cholesterol	0.48 \pm 0.46 ^a	0.56 \pm 0.45 ^a	0.79 \pm 0.65 ^b
HDL cholesterol	0.24 \pm 0.19 ^a	0.25 \pm 0.22 ^a	0.36 \pm 0.35 ^b
Triglycerides	0.69 \pm 0.38 ^a	0.62 \pm 0.35 ^a	0.63 \pm 0.42 ^a
TC/HDL-C	6.16 \pm 8.23 ^{ab}	8.7 \pm 13.20 ^b	5.64 \pm 4.27 ^a

NB: In the same column, the values subscripted with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

3.4. Comparison of Lipid Profile of Male Patients Under Haemodialysis and Controls

TC, LDL-C, HDL-C and TG of male patients under haemodialysis were remarkably lower before and after haemodialysis in comparison with the controls (Table 2). The cardiovascular risk indices TC/HDL-C of the male patients did not change before and after haemodialysis as compared to the controls

Table 2. Comparison of lipid profile of male patients under haemodialysis and controls.

Serum Cholesterol/ Triglycerides (g/L)	Male patients under haemodialysis Mean \pm standard error (n=45)		Controls Mean \pm standard error (n=45)
	Before haemodialysis	After haemodialysis	
Total Cholesterol	0.61 \pm 0.37 ^a	0.72 \pm 0.29 ^a	1.05 \pm 0.69 ^b
LDL cholesterol	0.35 \pm 0.33 ^a	0.4 \pm 0.27 ^a	0.61 \pm 0.49 ^b
HDL cholesterol	0.25 \pm 0.22 ^a	0.25 \pm 0.21 ^a	0.33 \pm 0.35 ^a
Triglycerides	0.64 \pm 0.41 ^{ab}	0.52 \pm 0.27 ^a	0.71 \pm 0.45 ^b
TC/HDL-C	4.32 \pm 4.70 ^a	4.93 \pm 4.72 ^a	5.81 \pm 4.10 ^a

NB: In the same column, the values subscripted with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

3.5. Comparison of Lipid Profile of Female Patients Under Haemodialysis and Controls

TC, LDL-C, and HDL-C of female patients were notably lower before and after haemodialysis as compared with the control group (Table 3). The triglycerides of female patients were higher before and after haemodialysis in contrast with the control group (Table 3). The cardiovascular risk indices TC/HDL-C of the female patients were higher before and after haemodialysis than that of the control group.

Table 3. Comparison of lipid profile of female patients under haemodialysis and controls.

Serum Cholesterol/ Triglycerides (g/L)	Female patients under haemodialysis Mean \pm standard error (n = 35)		Controls Mean \pm standard error (n = 35)
	Before haemodialysis	After haemodialysis	
Total Cholesterol	0.93 \pm 0.57 ^a	1.1 \pm 0.52 ^a	1.52 \pm 0.97 ^b
LDL cholesterol	0.65 \pm 0.54 ^a	0.76 \pm 0.55 ^{ab}	1.02 \pm 0.77 ^b
HDL cholesterol	0.23 \pm 0.14 ^a	0.25 \pm 0.24 ^a	0.39 \pm 0.35 ^b
Triglycerides	0.75 \pm 0.33 ^a	0.73 \pm 0.40 ^a	0.53 \pm 0.35 ^b
TC/HDL-C	8.53 \pm 10.89 ^{ab}	13.54 \pm 18.26 ^b	5.43 \pm 4.53 ^a

NB: In the same column, the values subscripted with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

4. Discussion

This study determined the lipid profile along with BMI of patients undergoing maintenance haemodialysis (MHD) in

two reference centres of haemodialysis in Cameroon in order to adopt appropriate measures to reduce the mortality rate in patients under haemodialysis. The haemodialysis patients had significantly lower BMI by comparison to controls ($p <$

0.05). Several other studies have shown similarly lower BMI in MHD patients as compared with controls [14-15]. The results showed 73% normal weight, 21% overweight and 3% obese patients undergoing haemodialysis in comparison to 59% normal weight, 24% overweight and 17% obese individuals undergoing haemodialysis as reported by Torun and associates [16]. On the other hand, 3% of MHD patients had BMI less than 18.5kg/m² in contrast with none in the control group. This indicates increased prevalence of malnutrition in our MHD patients according to WHO's guidelines for adults [17]. Survival among haemodialysis patients is enhanced in over weight individuals [18]. Every one-unit increase in the BMI is associated with a reduction of 30% in the relative risk of dying [19].

TC, LDL-C and HDL-C was significantly lower before and after haemodialysis in patients under haemodialysis as compared to healthy controls ($p < 0.05$). Kalantar-Zadeh *et al* also observed lower total cholesterol, LDL-C and HDL-C in patients under haemodialysis compared to healthy controls, which is similar to our study [20]. However serum HDL-C was non-significantly lower before and after haemodialysis in male patients under haemodialysis in comparison with the controls ($p > 0.05$). HDL-C < 27 mg/dl was found before and after haemodialysis in 65% of patients under haemodialysis in contrast to 81% and 51% incidence found by Ashfaq *et al* [21] and by Pennell *et al* [1] respectively.

In this study only 2% of patients had serum TG levels more than 16 mg/dl. In CHOICE study, 36% of patients under haemodialysis had hypertriglyceridemia whereas Pennell and co-workers found the incidence to be 52% [1-22]. Non-fasting sample collection by Pennell may be the cause of this difference as triglyceride levels increase after meals. Of the same, the 24-hour dietary recall during sample collection shows that only 30% of our patients had a high-fat diet. This may also explain this low rate of hypertriglyceridemia. Female patients in this study had lower TC, LDL-C, HDL-C and TG compared to healthy controls but the difference was not statistically significant before and after dialysis ($p > 0.05$). Also in the female, their cardiovascular risk indices increase notably before and after haemodialysis as compared to healthy controls. Small sample size may be one reason for this observation. The other reason may be that, the mean age of the female patients under haemodialysis was 45 years and almost 66% of them were postmenopausal. After menopause serum total cholesterol and LDL cholesterol increase and HDL cholesterol decreases [23-24]. This is as a result of a decrease in the levels of oestrogen. Females are likely to have early menopause and have unfavourable lipid profile for CVD in ESRD [25].

In this study, 3% of the patients would have required treatment as per Kidney Dialysis Outcome Quality Initiative (K/DOQI) guidelines versus 37% in Ashfaq *et al* study [21]. This high percentage of MHD patients having low cholesterol and lower percentage qualifying treatment for hyperlipidaemia again indicates malnutrition. The general population also has lower incidence of hyperlipidaemia [26]. Total and LDL hypercholesterolemia as well as hypertriglyceridemia have a

paradoxical association with better survival [27]. Low serum cholesterol in MHD patients is associated with increased CVD mortality. This pattern of reverse epidemiology for CVD risk factors has been associated with malnutrition-inflammation-complex syndrome/malnutrition inflammation-atherosclerosis complex (MICS/MIA) [28]. Both malnutrition and inflammation are common in CKD patients, are associated with high short-term mortality in haemodialysis patients and appear to be the main cause of worsening ASCVD in CKD patients [29-30].

Malnutrition may lead to inflammation and vice versa [31]. Malnourished dialysis patients are hypocholesterolemic, deficient in antioxidants and are predisposed to infection that may decrease the ability to clear circulating endotoxins [31]. Based upon the lipoprotein-endotoxin hypothesis, there is an optimum serum lipoprotein concentration below which lipid reduction is detrimental as it leads to decreased ability of lipoproteins to bind lipopolysaccharide; this, in turn, may prevent lipoproteins from neutralizing the detrimental effects of endotoxin [32]. Uraemia and renal replacement therapies result in markedly enhanced oxidative stress, the production of complement fragments and cytokines, increased adhesion molecules in endothelial cells, and other pro-inflammatory factors [33]. These factors may provide the proper milieu for the development of accelerated atherosclerosis [34].

Successful management of MICS may ameliorate the cardiovascular mortality and poor outcome in dialysis patients. Because MICS is multifactorial, its correction will require an integral approach rather than a single intervention [28]. The early stage of chronic renal failure may be the ideal time to start therapeutic interventions [35].

Routine counselling and encouragement for physical activity in MHD patients has the potential to improve physical functioning, and optimise quality of life [36]. For MHD patients, incorporation of exercise into the dialysis session may increase patient participation and tolerance of exercise. A study in normal adults concludes that a regular exercise program can improve plasma lipid and lipoprotein patterns, results, which should be applicable to haemodialysis patients as well [37]. MHD patient can adhere to long-term physical training programs on the non-dialysis days, as well as during haemodialysis with considerable improvements in physical fitness and health [38]. Further studies are needed in different haemodialysis centres in large number of patients especially in female patients in this country to know the impact of different strategies adopted to ameliorate malnutrition, inflammation and cardiovascular disease in haemodialysis patients in the set-up.

5. Conclusion

Hypocholesterolemia and decrease HDL-C along with low BMI are prevalent in patients undergoing haemodialysis. This may increase the mortality rate in these patients through malnutrition inflammation-atherosclerosis complex, process leading to cardiovascular disease complications. This risk is also evident in the higher ratio of cardiovascular risk indices,

TC/HDL-C in females. Dietary education of MHD patients, improvement in dialysis practices and inclusion of exercise programmes in dialysis centres is likely to improve CVD mortality in patients under haemodialysis.

References

- [1] Pennell P, Leclercq B, Delahunty M, Walters B. (2006). The utility of non-HDL in managing dyslipidemia of stage 5 chronic kidney diseases. *Clinic Nephrol.*, 66 (5), 336-47.
- [2] Abrass C. (2006). Lipid metabolism and renal disease. *Contrib Nephrology*. 151: 106-21.
- [3] National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease (2002). Evaluation, classification, and stratification. *American Journal of Kidney Disease*. 39: S1-266.
- [4] Gowdak L, Arantes R, Krieger E. (2007). Under use of American College of Cardiology/American Heart Association Guidelines in haemodialysis patients. *Ren Fail*. 29 (5), 559-65.
- [5] Soubassi L, Papadakis E, Theodoropoulos I, Poulos G, Chaniotis D, Tsapakidis I, et al. (2007). Incidence and risk factors of coronary artery disease in patients on chronic hemodialysis., *International Artif Organs*. 30 (3), 253-7.
- [6] Wakeel S, Mitwalli A, Mohaya S, Abu-Aisha H, Tarif N, Malik G., et al (2002). Morbidity and mortality in ESRD patients on dialysis. *Saudi Journal of Kidney Disease Transplantation*. October-December; 13 (4): 473-7.
- [7] Muntner P, He J, Astor B, Folsom A, Coresh J. (2005). Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *American Journal of Nephrology*. 16 (2): 529-38.
- [8] Iseki K, Yamazato M, Tozawa M, Takishita S. (2002). Hypocholesterolemia is a significant predictor of death in a cohort of chronic hemodialysis patients. *Kidney International Journal*. 61: 1887-93.
- [9] Liu Y, Coresh J, Eustace J, Longenecker J, Jaar B, Fink N., et al.(2004). Association between cholesterol level and mortality in dialysis patients: role of inflammation and malnutrition. *JAMA*, 291: 451-9.
- [10] Kalantar-Zadeh K, Block G, Humphreys M, Kopple J. (2003). Reverse epidemiology of cardiovascular risk factors in maintenance dialysis patients. *Kidney International Journal*, 63 (3): 793-808.
- [11] Allain C, Poon L, Richmond, W and Fu. (1974). Enzymatic determination of serum cholesterol. *P. D. Clin. Chem*, 20: 470.
- [12] Fossati R, Prencipe L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*, 28: 2077.
- [13] Friedwald W, Levy R, Fredrickson D. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, 18: 499-502.
- [14] Bednarek-Skublewska A, Baranowicz-Gaszczyk I, Józwiak L, Dzik M, Majdan M, Ksiązek A. (2005). Comparison of some nutritional parameters in hemodialysis patients over and below 65 years of age. *Pol Arch Med Wewn*. 113 (5): 417-23.
- [15] Basaleem H, Alwan S, Ahmed A, Al-Sakkaf K.(2004). Assessment of the nutritional status of end-stage renal disease patients on maintenance hemodialysis. *Saudi Journal Kidney Disease Transplantation*. October-ecember; 15 (4): 455-6.
- [16] Torun D, Micozkadioglu H, Torun N, Ozelsancak R, Sezer S, Adam F., et al.(2007). Increased body mass index is not a reliable marker of good nutrition in hemodialysis patients. *Ren Fail*. 29 (4): 487-93.
- [17] Physical status: the use and interpretation of anthropometry. (1995). Report of a WHO Expert Committee. Geneva, World health Organization, WHO Technical Report Series, No. 854.
- [18] Johansen K, Young B, Kaysen G, Chertow G. (2004). Association of body size with outcomes among patients beginning dialysis. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80: 324-32.
- [19] Leavey S, McCullough K, Hecking E, Goodkin D, Port F, Young E. (2001). Body mass index and mortality in 'healthier' as compared with 'sicker' haemodialysis patients: Results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant*. 16: 2386-94.
- [20] Kalantar-Zadeh K, Kilpatrick R, Kopple J, Stringer W. (2005). A matched comparison of serum lipids between hemodialysis patients and nondialysis morbid controls. *Hemodialysis International Journal*. Jul; 9 (3): 314-24.
- [21] Ashfaq A, Abdul H, Dilshad A, Muhammad K, Fatima T, Imran S. (2007): Assessment of lipid dysfunction in patients on maintenance haemodialysis; *J Ayub Med Coll Abbottabad* 19 (4): 32-36.
- [22] Longenecker J, Coresh J; Powe N; Levey A; Fink N; Martin A., et al. (2002). Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE Study. *American Journal of Nephrology*. 13 (7): 1918-27.
- [23] Caparevic Z, Kostic N.(2007). The influence of age and the beginning of menopause on the lipid status, LDL oxidation, and CRP in healthy women. *Srp Arh Celok Lek*. 2007 May-Jun; 135 (5-6): 280-5.
- [24] Trémollières F, Pouilles J, Cauneille C, Ribot C. (1999). Coronary heart disease risk factors and menopause: a study in 1684 French women. *Atherosclerosis*. 142 (2): 415-23.
- [25] Jang C, Bell R, White V, Lee P, Dwyer K, Kerr P., et al. (2001). Women's health issues in haemodialysis patients. *Med J Aust*. 175 (6): 298-301.
- [26] Shamim A, Ihteshamul H. (2004). Association of ABO, Rh blood groups systems with lipids and other anthropometric co variables as predictors of cardiovascular risk in NWFP, Pakistan. *Ann King Edward Med Coll*. 10 (2): 166-9.
- [27] Kilpatrick R, McAllister C, Kovesdy C, Derose S, Kopple J, Kalantar-Zadeh K. (2007) Association between serum lipids and survival in hemodialysis patients and impact of race. *American Journal of Nephrology*. 18 (1): 293-303.
- [28] Kalantar-Zadeh K. (2005). Recent advances in understanding the malnutrition-inflammation-cachexia syndrome in chronic kidney disease patients: What is next? *Semin Dialysis*. Sep-Oct; 18 (5): 365-9.

- [29] Kalantar-Zadeh K, Ikizler T, Block G, Avram M, Kopple J (2003). Malnutrition-inflammation complex syndrome in dialysis patients: causes and consequences. *American Journal of Nephrology*. 42 (5): 864-81.
- [30] Kharrat I, Jmal A, Jmal L, Amira Z, Cheikh W, Bourouba B et al (2012). Altération du métabolisme lipidique chez les hémodialysés. *La Tunisie Medicale*. 90 (07): 537-541.
- [31] Deicher R, Ziai F, Bieglmayer C, Schillinger M, Horl W. (2005). Low total vitamin C plasma level is a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients. *American Journal of Nephrology*. 16 (6): 1811-8.
- [32] Rauchhaus M, Coats A, Anker S. (2000) The endotoxin-lipoprotein hypothesis. *Lancet*. 356 (9233): 930-3.
- [33] Horl W, Cohen J, Harrington J, Madias N, Zusman C. (2004). Atherosclerosis and uremic retention solutes. *Kidney International Journal* 66 (4): 1719-31.
- [34] Bro S, Bentzon J, Falk E, Andersen C, Olgaard K, Nielsen L (2003). Chronic renal failure accelerates atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Nephrology*. 14 (10): 2466-74.
- [35] Pawlaczyk K, Oko A, Lindholm B. (2003). Czekalski S. Malnutrition-inflammation-atherosclerosis (MIA syndrome) in patients with renal failure. *Pol Merkur Lekarski*. 15 (88): 334-43.
- [36] Painter P. (2005). Physical functioning in end-stage renal disease patients. *Hemodialysis International Journal*. 9 (3): 218-35.
- [37] Iffat A, Rifiat K, Imran A, Munir A. (2000). The Effect of Physical fitness on Plasma Lipids in Young Pakistani Male Medical Students. *J Rawal Med Coll Dec 2000*; 4 (1-2): 34-8.
- [38] Kouidi E, Grekas D, Deligiannis A, Tourkantonis A. (2004). Outcomes of long-term exercise training in dialysis patients: comparison of two training programs. *Clinical Nephrology*. 61: S31-8.

Microbiological Analysis of Hemodialysis Water at the University Teaching Hospital of Yaounde, Cameroon

Cédric Gueguim¹, Nnanga Nga^{2,3}, François Kaze Folefack², Alain Ragon⁴, Hortense Gonsu Kamba^{2,5}

¹Departement of Biochemistry, University of Yaounde I, Central Region, Cameroon

²Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaounde I, Central Region, Cameroon

³Institute for Medical Research and Medicinal Plants (IMPM), Yaoundé, Cameroon

⁴Division of Uro-Nephrology Laboratory, Hospital of Conception, Marseille, France

⁵Microbiology Laboratory of the Hospital Center and the University Hospital of Yaoundé, Central Region, Cameroon

Email address:

guecedricfr@yahoo.fr (C. Gueguim)

To cite this article:

Cédric Gueguim, Nnanga Nga, François Kaze Folefack, Alain Ragon, Hortense Gonsu Kamba. Microbiological Analysis of Hemodialysis Water at the University Teaching Hospital of Yaounde, Cameroon. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*.

Vol. 4, No. 6, 2016, pp. 81-86. doi: 10.11648/j.ajbls.20160406.11

Received: September 23, 2016; Accepted: November 5, 2016; Published: December 8, 2016

Abstract: Rigorous control of the microbiological quality of water in hemodialysis services is important because the immune system of patients with chronic renal failure is weakened. The objective of this study was to determine the microbiological quality of water for hemodialysis in the hemodialysis department of the University Teaching Hospital of Yaoundé in order to improve the disinfection strategy. Twelve water samples were collected each month at different sites of the hemodialysis circuits A (inlet of filters), B (Outlet of filters / inlet of Reverse Osmosis (RO) device) and C (outlet of the RO device / close to the generator) between July and October 2015 to be analyzed. The bacteria were isolated after filtration of 100 ml of water at each site through nitrocellulose membrane with 0.45 µm microporosity deposited on the surface of the Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA) and then incubated at room temperature (20 to 22°C) for 7 days. After transplanting to different environments, pure bacterial isolates were identified by their cultural characters and marketed biochemical galleries. The colony count was well above the required international standards (>100 CFU / ml), for the hemodialysis water with a percentage of 83.3% (10/12) of non-compliance. Among the bacteria identified, nine (09) were Gram-negative bacilli including *Pasteurella haemolytica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Aeromonas salmonicida* and *Klebsiella pneumoniae subsp ozaenae*, three (03) Gram-positive bacilli all *Bacillus sp* and six (06) Gram-positive cocci all of coagulase-negative staphylococci. The most frequently isolated bacterial genera were *Pseudomonas* (30.4%), *Staphylococcus* (26.1%), *Aeromonas* (13%), *Bacillus* (13%), *Klebsiella* (13%) and *Pasteurella* (4.3%). In this study, the high bacteriological contamination of the hemodialysis water with the detection of a variety of bacteria shows that the disinfection procedure of the distribution loop is not efficient and cannot prevent the development of a biofilm. A higher frequency of disinfection (almost every week), an increase of the concentration and time of contact of the chlorine disinfection product or the use of peracetic acid and a regular monitoring can contribute to improve the quality of the hemodialysis water at the CHUY to ensure a better quality of life for patients undergoing this treatment.

Keywords: Water, Hemodialysis, Microbiology, Contamination, Disinfection

1. Introduction

Water is the main component of the human body and, no doubt, of all living organisms. However, various microorganisms present in water can cause diseases in

humans, which lead to infectious, toxigenic and parasitic processes [1]. Given the environmental degradation caused by the high rate of pollution linked to the ecological

imbalance of the planet and the vital nature of water, the active management of the environment and the quality control of water resources are needed [2]. In the case of water contamination, the patients with chronic kidney disease are more vulnerable than the general population because of the dialysis treatment to which they are subject [1], [3]. Hemodialysis is one of the chronic renal failure treatment modalities that require pure water for the preparation of the dialysate. The blood of patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis is exposed in contact with the dialysis membrane to about 1500 liters of water per month, thus a volume of water ranging from 18 000 to 36 000 liters per year [4], [5]. Patients treated for End Stage Renal Disease (ESRD) by three weekly sessions of 4 hours, are exposed in just three years of treatment to a larger volume of water than a person with normal renal function would during his entire life [6].

Urban water contains contaminants that induce proinflammatory cytokinic responses and consequently harm the health and the quality of life of the patient. It must for this purpose be treated to be suitable for the preparation of the dialysate. An impure water is unsafe to prepare dialysate; it could contain bacteria and endotoxins that are associated with acute and chronic complications of dialysis such as fever, discomfort, dialyzer clotting, nausea, migraine, amylose and the increased risk of cardiovascular disease occurrence [7], [8]. Monitoring the microbiological quality of water for hemodialysis is thus one of the main concerns of health professionals, since contamination can have serious consequences for patients.

Although microorganisms are known to grow in certain fluids associated with dialysis equipment, microbiological contamination has not been taken seriously in the developed system's projects for dialysis treatment after the death in 2013 of 11 patients at a Dialysis Center in Cameroon [9]. Gram-negative bacteria and nontuberculous mycobacteria are the most common biological contaminants from the dialysis system, the possibility of other types of contaminants such as Cyanobacteria should be kept in mind as likely to harm the health and quality of life of hemodialysis patients in Cameroon.

Based on the above considerations and taking into account the various factors that interfere with the quality of the water used in dialytic processes and potential risk factors for the health of hemodialysis patients in Cameroon, the objective of this study was to determine the bacteriological characteristics of water used for hemodialysis in the hemodialysis department of the University Teaching Hospital of Yaoundé in order to validate the efficiency of the disinfection procedure and if necessary modify the strategy of disinfection (frequency, product, concentration, time of contact) to obtain permanently a good quality of hemodialysis water.

2. Material and Methods

2.1. Collection and Transport of Samples

2.1.1. Collection

Samples of water collected were carried out under stringent aseptic conditions. After disinfecting the sample sites with a water-alcohol solution, we let the water run 1 to 2 minutes so that the sample is not contaminated by traces of the disinfectant, then collected in disposable sterile bottles [10].

2.1.2. Transport

After sampling, the bottles were clearly labeled and transported immediately to the laboratory, accompanied by a form containing all the necessary information (date, time and collection site) and rapidly analysed.

2.2. Bacteriological Analysis

2.2.1. Bacteriological Isolation and Quantification

In order to count the number of bacteria suspended in the water sample, a volume of 100 ml water sample was filtered through a membrane with micro porosity (0.45 μm). The filter was then placed on TGEA (Tryptone Glucose Extract Agar) and incubated at room temperature (20 to 22°C) for 7 days [10]. The numbers of colonies found were expressed as the mean of the Colony Forming Units (CFU/mL) [10]. Sterile water for Injection (SWFI) was used as control.

2.2.2. Bacteria Identification

After the completion of Gram staining, pure bacterial isolates were transplanted on Chapman, Mueller Hinton, MacConkey, blood and chocolate agar and incubated at 37 °C for 24 to 48 hours.

Bacteria Identification was carried out using commercially available biochemical galleries: API 20NE gallery for identifying bacteria classified nonfermentative, API 20E gallery for identification of enterobacteria, mannitol tests, catalase, coagulase and DNase for the identification of staphylococcal species.

2.3. Processing and Data Analysis

Data was collected, processed and analyzed using the Excel software (2010 version). The results were presented in tables, graphs, or narrative.

3. Results

3.1. Counting the Colonies After Culture

To see if the number of germs that may be present in the CHUY water for hemodialysis meets international standards, the colonies were counted at each sampling point and expressed in CFU / mL.

Table 1. Colony counts after membrane filtration.

	Number of colonies in CFU/ml for every collection/month			
	Collection 1 /July 2015	Collection 2/ August 2015	Collection 3/ September 2015	Collection 4/ October 2015
Point A	PC	PC	PC	PC
Point B	PC	PC*	PC	PC
Point C	PC	PC*	PC	PC

Point A = inlet of filters (systemic water); Point B = outlet of filters /inlet of RO device; Point C = outlet of the RO device / entry to the generator, PC = Presence of colonies (>100 CFU/mL), PC* = Presence of colonies (<100 CFU/mL).

From Table 1, the number of colonies is far above the norm (>100UFC / mL) for collections carried out in July, September and October for hemodialysis water. Our bacteriological results thus show the presence of a biofilm in the distribution loop because there are few differences in the number of isolated colonies between sampling points A, B and C.

3.2. Conformity After Culture

From Figure 1, 83.3% of samples were non-compliant with the number of colonies well above the norm (>100 CFU / mL), whereas only 16.7% of samples were compliant (<100CFU / mL).

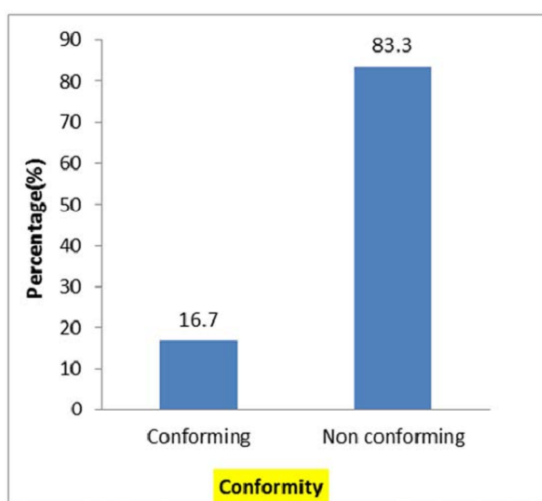


Figure 1. Percentage of conformity after culture.

3.3. Identification of Colonies After Culture

Gram staining was performed to determine the type of bacteria present in each sampling point. Table 2 below shows the results obtained.

It is clear from our results that the Gram-negative bacilli were more isolated, then the Gram positive cocci and finally Gram-positive bacilli.

Table 2. Bacteria type as a function of each sampling point.

Type of Bacteria	Collection 1/ July 2015			Collection 2/ August 2015			Collection 3/ September 2015			Collection 4/ October 2015			Total/ Percentage
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
Gram - Bacilli	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	9 (50%)
Gram + Bacilli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	3 (16,7%)
Gram + Cocci	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	6 (33,3%)

(+) = Presence (-) = Absence

3.4. Isolated Microorganism in Water for Hemodialysis

It is observed that the bacteria isolated vary depending on the sample. Table 3 below shows the results obtained.

Table 3. Microorganisms species isolated in water for hemodialysis between July and October 2015.

Isolated Bacteria	Collectio1 July 2015			Collection 2 August 2015			Collection 3 September 2015			Collection 4 October 2015		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>Aeromonas salmonicida</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp Ozaenae,	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pasteurella haemolytica</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Coagulase négative Staphylococci</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+

(+) = Presence; (-) = Absence; A = Inlet of filters (systemic water); B = Outlet of Filter / inlet to the RO device; C = outlet of the RO device / entry to the hemodialysis generator.

3.5. Distribution of Bacterial Genera

From Figure 2, *Pseudomonas* genus represented 30.4% of isolated bacteria, *Staphylococcus* 26.1%, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Klebsiella* and 13% and *Pasteurella* 4.3%.

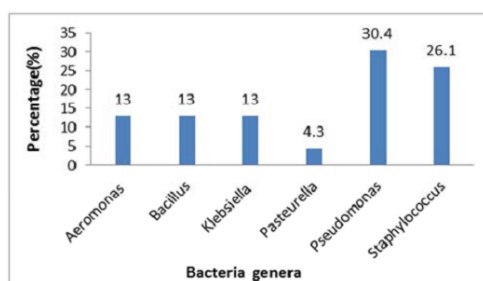


Figure 2. Isolated Bacteria as a function of genera.

4. Discussion

Over the past two decades, there's been considerable progress in the understanding of microbial pathogenesis in hemodialysis patients, and the current focus is on the immunity of patients, bacterial virulence and the hemodialysis treatment process [11]. It is now well established that the quality of water for hemodialysis depends on a complex chain of devices, procedures, and quality control implemented. Proper operation of the water treatment chains for hemodialysis needs preventive maintenance, periodic and regular replacement of worn or exhausted components by competent and trained personnel. Routine disinfection of reverse osmosis membranes and the water distribution system, including hemodialysis generators connected to the system should be subject to disinfection at least once a month or once a week. It is currently possible to use chemical and physical agents according to manufacturer's recommendations for a monthly disinfection of hemodialysis water treatment circuit.

In the hemodialysis center of CHUY selected for our study, disinfection of the water treatment circuit was carried

out monthly with *TIUTOL KF*, an alkaline cleaning and disinfection concentrated solution composed with sodium hydroxide and hypochlorite (3.9 % of free chlorine). It is recommended to prevent biofilm and has bactericidal, fungicidal, tuberculocidal and virus inactivation properties.

Each week, patients on hemodialysis are exposed to 400 and 600 liters of water used for hemodialysis [12]. High levels of bacteria may pose a risk of bacteremia or endotoxemia to these patients because of the possibility of bacterial passage of endotoxins through the hemodialysis membrane [13].

A variety of microorganisms can multiply rapidly in HD water. If the level of bacterial contamination currently exceeds the acceptable limits (<100 CFU/mL), HD patients are exposed to septicemia or endotoxemia by Gram negative bacteria.

The high bacterial load (200 to 350 CFU / mL) detected in our study shows that it was above the international standards (>100UFC / mL). These results are different from Montanari *et al* [14] performed in a hemodialysis center in the city of Sao Paulo in Brazil, with a low load (2.5 to 3.0 CFU / mL) detected bacteria. Our results, however, are similar to those of Pisani *et al* [3] performed in Campinas hospital in Brazil which reported a charge of 300 CFU / mL in water for HD.

According to Ragon [6], the water distribution system for hemodialysis should be disinfected regularly (at least 1 time per month or 1 time per week) to avoid the development of a biofilm. Our results show the presence of a biofilm in the distribution circuit because there are few differences in the number of isolated colonies between sampling points A, B and C. This could reflect a weakness in the disinfection system of the distribution circuit of water for hemodialysis at CHUY.

Following the bad bacteriological results of the hemodialysis water, a new disinfection strategy is needed with the increase of the frequency and the use of a more powerful disinfection product like peracetic acid in alternance with hypochlorite. The frequency of the disinfection process must moved from monthly to at least weekly.

Most microorganisms isolated in water for HD were Gram-negative bacilli (50%), the Gram-positive cocci (33.3%) and the Gram positive bacilli (16.7%). These results are very similar to those of Rebecca [1]; Silva *et al* [4];

Santos *et al* [7] and Reis *et al* [15]. However, in the Santos *et al* [7] study, about 90% of the bacteria isolated were Gram negative, with a clear predominance of the genus *Pseudomonas*, which was able to grow rapidly, even in sterile water, reaching high concentrations (>100000 CFU / mL) in less than 48 hours. The presence of glucose and bicarbonate in dialysis solutions, favours bacterial growth even faster and therefore a significant production of toxin causing frequent infections in hemodialysis, the leading cause of morbidity in these patients [13], [16].

The most frequently isolated bacteria in the water for hemodialysis were of the genus *Pseudomonas* (30.6%), *Staphylococcus* (26.1%), *Aeromonas* (13%), *Bacillus* (13%), *Klebsiella* (13%) and *Pasteurella* (4.3%). These results are similar to those of Arvanitidou *et al* [17] who reported a predominance of *Pseudomonas* (44%) and *Staphylococcus* (23%). Frequencies very different in isolation of 1.6% and 56% respectively, have both been described for the *Pseudomonas* genus by Pisani *et al* [3]. and Zunino *et al* [18].

Arduino [19] and Bambauer [20] studies have showed that the most commonly isolated bacteria in drinking water and water for hemodialysis were of the genus *Pseudomonas*. In our study, the frequency of the species *Pseudomonas fluorescens* 21.7% (5/23) and *Pseudomonas paucimobilis* species 8.7% (2/23) is of concern, given the well-known resistance of *Pseudomonas* to biocides and antibiotics. The genus *Pseudomonas* is often cited as a causal agent in sepsis reports and endotoxemia [11], [19], [21].

5. Conclusion

Given the weakened immune system of patients with chronic renal failure, we can conclude that the detection of a variety of bacteria in the hemodialysis water in this study indicates the urgent need for regular and appropriate monitoring of water for hemodialysis by the hemodialysis center of CHUY to ensure a better quality of life for patients undergoing this treatment. There is an urgent need to modify the disinfection strategy by increasing both the frequency (almost every week), the chlorine concentration of the disinfection product and the time of contact to improve the quality of the hemodialysis water at the CHUY Center.

References

- [1] Rebecca A., Curtis, J., Payne, G. (2013). Water treatment for hemodialysis: An update. *Nephrology Nursing Journal*, 40(5), 383-404, 465.
- [2] Lima, E., Gazineu, M. H., Paiva, S. C., Rêgo, R. C., Salgueiro, A. (2003). A. Implementação do índice de qualidade de água para consumo (IQAC), na área urbana do município de Rio Formoso, PE. *Higiene Alimentar*. 17, 88-94.
- [3] Pisani, B., Simões, M., Prandi, M., Rocha, M., Gonçalves, C., Vaz, T., et al. (2000). Surto de bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. *Revista Internacional Adolfo Lutz*. 59 (1/2), 51-56.
- [4] Silva, A., Martins, C., Ferraboli, R., Jorgetti, V., Junior, R., Egidio, J. (1996). Revisão/Atualização em Diálise: Água para Hemodiálise *Journal of Brasil Nefrology*, 18(2), 180-188.
- [5] Riela, C., (2012). *Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólitos*. 3rd ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 607-608.
- [6] Ragon, A. (2004). «l'eau et la santé dans les établissements de soins». These Edouard Kunegel, l'eau et les liquides de dialyse dans le traitement de l'insuffisance rénale chronique terminale. Soutenue publiquement le 27 juin 2013 pour obtenir le diplôme d'Etat de Docteur en pharmacie. Consulté le 3-02-2015.
- [7] Brunet, P., Berland, Y. (2000). Water quality and complications of haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15, 578-580.
- [8] Santos, F., Santos, A., Biernat, J., Souza, M., Raubach, A., Aguirre, A., et al. (2000). Detecção de endotoxina pelo teste do limulus amoebocyte lysate (LAL) em unidades de hemodiálise. *Revue. Virt. Medicine*. 54: 115-119.
- [9] Manedong F. (2013). Insuffisance rénale: 11 malades meurent au CHU - A cause du dysfonctionnement intervenu au centre d'hémodialyse; Cameroon infos, septembre 2013. Consulté le 13-01-2015.
- [10] Norme Française. (2008). Système de traitement et de distribution d'eau pour dilution des solutions concentrées pour hémodialyse - Exigences de conception, exploitation, performance et sécurité. S93-315: (2008).
- [11] Jaber, B. (2005). Bacterial infections in hemodialysis patients: pathogenesis and prevention. *Kidney International journal*. 67: 2508-2519.
- [12] Pontoriero, G., Pozzoni, P., Andrul, S., Locatelli, F. (2003). The quality of dialysis water. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18 (7): 21-25.
- [13] Hoenich, A. et Ronco, C. (2007). Hemodialysis fluid: composition and clinical importance. *Blood Purification journal*, 25: 62-68.
- [14] Montanari, B., Flávio, G., Miguel, J., Samuel, D., Regina, H., Clarice, et al. (2009). Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. *Revue Internationale de Médecine tropicale*. Sao. Paulo 51(1): 37-43.
- [15] Reis, J., Faria, N., Filter, A. (1998). Qualidade bacteriológica da água para hemodiálise do Distrito Federal. *Revista Saúde Distrito Federal*, 9 (2): 180-189.
- [16] Oth, V., Jarvis, W. (2000). Outbreaks of infection and/or pyrogenic reaction in dialysis patients. *Semin. Dialysis*, 13: 92-96.
- [17] Arvanitidou, M., Vayona, A., Spanakis, N., Tsakris, A. (2003). Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. *Journal of clinical Microbiology*, 95: 180-185.
- [18] Zunino, P., Beltrán, L. (2002). Microbiological quality of hemodialysis water in a three-year multicenter study in Uruguay. *Journal of Nephrology*, 15: 374-379.
- [19] Arduino, M., Bland, L. A., Agüero, S. M. (1991). Comparison of microbiologic assay methods for hemodialysis fluids. *Journal of clinical Microbiology*, 29: 592-594.

- [20] Bambauer, R., Schauer, M., Jung, W., Daum, V., Vienken, J. (1994). Contamination of dialysis water and dialysate. A survey of 30 centers. *ASAIO Journal*, 40: 1012-1016.
- [21] Oie, S., Kamiya, A., Yoneda, I. (2003). Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. *Journal of Hospital Infection*, 54: 115-119.