REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

UNION-DISCIPLINE-TRAVAIL

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Année: 2012 - 2013

THESE

Présentée en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Mlle BRISSY Dina Colombe Désirée



COMPOSITION DU JURY:

Président : Monsieur ATINDEHOU Eugène, Professeur Titulaire

Directeur de thèse : Madame AKE Michèle, Professeur Titulaire

Assesseurs : Monsieur OGA Agbaya Stéphane, Professeur Agrégé

: Monsieur ADOUENI Katche Valery, Médecin-diabétologue

ADMINISTRATION ET
PERSONNEL ENSEIGNANT
DE L'UFR DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES ET
BIOLOGIQUES

I. HONORARIAT

Directeurs/Doyens Honoraires: Professeur RAMBAUD André

> Professeur FOURASTE Isabelle Professeur BAMBA Moriféré Professeur YAPO Abbé †

> > Professeur MALAN Kla Anglade Professeur KONE Moussa †

II. ADMINISTRATION

Directeur Professeur ATINDEHOU Eugène Sous-Directeur Chargé de la Pédagogie Professeur INWOLEY Kokou André

Secrétaire Principal Monsieur BLAY Koffi

Secrétaire Principal Adjoint Madame AKE Kouadio Api Eugénie Documentaliste Monsieur N'GNIMMIEN Koffi Lambert

Intendant Monsieur GAHE Alphonse Madame DJEDJE Yolande Responsable de la Scolarité

III. PERSONNEL ENSEIGNANT PERMANENT

1.PROFESSEURS TITULAIRES

Mme AKE Michèle Chimie Analytique

Chimie Analytique, Bromatologie MM ATINDEHOU Eugène

Mme KONE BAMBA Diéneba Pharmacognosie

MM **KONE Moussa** Parasitologie et Mycologie

KOUADIO Kouakou Luc Hydrologie, Santé Publique MALAN Kla Anglade Chimie Ana., contrôle de qualité MENAN Eby Ignace Parasitologie - Mycologie

MONNET Dagui Biochimie et Biologie Moléculaire

2.MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mme ATTOUNGBRE HAUHOUOT M.L. Biochimie et Biologie Moléculaire

DANO Djédjé Sébastien Toxicologie. MM INWOLEY Kokou André Immunologie KABLAN Brou Jérôme Pharmacologie

KOUASSI Dinard Hématologie Microbiologie LOUKOU Yao Guillaume

OGA Agbaya Stéphane Santé publique et Economie de la santé

Mme SAWADOGO Duni Hématologie

> YAPI Ange Désiré Chimie organique, chimie thérapeutique

YAVO William Parasitologie - Mycologie

3.MAITRES DE CONFERENCES (CAMES)

M YOLOU Séri Fernand Chimie Générale

4.MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

M DIAFOUKA François Biochimie et Biologie de la Reproduction

5.MAITRES ASSISTANTS

MM ABROGOUA Danho Pascal Pharmacologie
AHIBOH Hugues Biochimie et Biologie moléculaire

Mme AFFI-ABOLI Mihessé Roseline Immunologie
AKE EDJEME N'guessan Angèle Biochimie et Biologie moléculaire

MM AMARI Antoine Serge G. Législation
AMIN N'Cho Christophe Chimie analytique

AMIN N'Cho Christophe

Mme BARRO KIKI Pulchérie

MM BONY François Nicaise
CLAON Jean Stéphane

DEMBELE Bamory

CLOUND INTERPREDICTION DE LA COMMUNICATION DEL COMMUNICATION DE LA COMMUNICATION DEL COMMUNICATION DE LA COMMUNICATION DEL COMMUNICATION DE LA COMMUNICATION DE LA COMMUNICATION DE LA COMMUNICATION DEL COMMUNICATION DE LA COMMUNICATION DEL COMMUNICATION DE LA COMMUNICATION DE

DJOHAN Vincent Parasitologie -Mycologie

EZOULIN Miezan Jean Marc
GBASSI K. Gildas
KOFFI Angely Armand
Pharmacie Galénique
Mmes
KOUAKOU SIRANSY N.
Pharmacologie
KOUASSI AGBESSI Thérèse
Microbiologie
MM OUASSA Timothée
Bactériologie
OUATTARA Mohama

OUATTARA Mahama Chimie thérapeutique
Mme SACKOU KOUAKOU Julie Santé Publique

MM YAYO Sagou Eric Biochimie-Biologie moléculaire

ZINZENDORF Nanga Yessé Microbiologie

6.ASSISTANTS

MM	ADJOUNGOUA Attoli Léopold	Pharmacognosie
	ADJAMBRI Adia Eusebé	Hématologie
Mme	AKA-ANY-GRA Armelle Adjoua S.	Pharmacie Galénique
M	AMICHIA Attoumou Magloire	Pharmacologie
Mme	AYE YAYO Mireille	Hématologie
MM	DJADJI Ayoman Thierry Lenoir	Pharmacologie
MM	CABLAN Mian N'Ddey Asher	Bactériologie Virologie
	DALLY Laba	Galénique
Mlle	DIAKITE Aïssata	Toxicologie
Mlle	FOFIE N'Guessan Bra Yvette	Pharmacognosie
Mme	IRIE N'GUESSAN Amenan	Pharmacologie
MM	KABRAN Tano Kouadio Mathieu	Immunologie
	KAMENAN Boua Alexis Thierry	Pharmacologie
	KASSI Kondo Fulgence	Parasitologie-Mycologie
Mlle	KONATE Abibatou	Parasitologie-Mycologie
M	KONAN Konan Jean Louis	Biochimie et Biologie moléculaire
Mme	KONE Fatoumata	Biochimie et Biologie moléculaire
MM	KOUAKOU Sylvain Landry	Pharmacologie
	KOUAME Dénis Rodrigue	Immunologie
	LATHRO Joseph Serge	Microbiologie

LEKADOU KORE Sylvie

Mme

Santé Publique

MM MANDA Pierre Toxicologie
N'GUESSAN Alain Galénique
Mmes N'GUESSAN-BLAO Amoin Rebecca J. Hématologie

MM

POLNEAU VALLEE Sandrine Mathématiques biophysique

SANGARE Mahawa Biologie Générale
SANGARE TIGORI Béatrice Toxicologie
SIMAGA Dédéou Pharmacognosie
TRE Eric Sorge

TRE Eric Serge Chimie Analytique
Mmes VANGA ABO Henriette Parasitologie - Mycologie

YAO ATTIA Akissi Régine Santé publique M. YAPO Assi Vincent De Paul Biologie Générale

7.IN MEMORIUM

Feu COMOE Léopold Maître de Conférences Agrégé
Feu YAPO Abbé Etienne Professeur Titulaire
Feu GUEU Kaman Maître Assistant
Feu TRAORE Moussa Assistant

Feu ALLADOUM Nambelbaye Assistant
Feu COULIBALY Sabali Assistant

Feu YAPO Achou Pascal Assistant de Galénique Feu KONE Moussa Professeur Titulaire

IV. ENSEIGNANTS VACATAIRES DES AUTRES UFR

1. PROFESSEUR

M ASSAMOI Assamoi Paul Biophysique

2. MAITRES DE CONFERENCES

MmeTURQUIN née DIAN LouiseBiologie VégétaleMMOYETOLA SamuelChimie MinéraleYAO N'DriPathologie Médicale

ZOUZOU Michel Cryptogamie

V. <u>ENSEIGNANTS VACATAIRES NON UNIVERSITAIRES</u>

MM. AHOUSSI Daniel Ferdinand Secourisme

DEMPAH Anoh Joseph Parasitologie, Zoologie.

KOUAKOU Tanoh Hilaire Botanique et Cryptogamie

N'GOZAN Marc Secourisme
N'GUETTA Augustin Gestion
KONAN Kouacou Diététique

KONKON N'Dri Gilles Botanique, Cryptogamie

OKPEKON Aboua Timothée Chimie Analytique, Chimie Générale.

Mme PAYNE Marie Santé Publique

COMPOSITION DES
LABORATOIRES ET
DEPARTEMENTS
DE L'UFR DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES ET
BIOLOGIQUES COMPOSITION

I. BACTERIOLOGIE VIROLOGIE

Professeur LOUKOU Yao Guillaume Maître de Conférences Agrégée

> Chef de département KOUASSI AGBESSI Thérèse Maître Assistante Maître Assistant Maître Assistant

ZINZENDORF Nanga Yessé CABLAN Mian N'Dédey Asher Assistant LATHRO Joseph Serge Assistant

II. BIOCHIMIE, BIOLOGIE MOLECULAIRE, BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION ET PATHOLOGIE MEDICALE

Professeur MONNET Dagui Professeur Titulaire

OUASSA Timothée

Docteurs

Chef de Département Maître de Conférences Professeurs DIAFOUKA François

HAUHOUOT ép. ATTOUNGBRE M.L. Maître de Conférences Agrégée

Docteurs AHIBOH Hugues Maître Assistant

> AKE EDJEME N'Guessan Angèle Maître Assistante YAYO Sagou Eric Maître Assistant KONAN Konan Jean Louis Assistant **KONE** Fatoumata Assistante

BIOLOGIE GENERALE, HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE III.

Professeur SAWADOGO Duni Maître de Conférences Agrégé

Chef du Département

KOUASSI Dinard **Professeurs** Maître de Conférences Agrégé

> INWOLEY Kokou André Maître de Conférences Agrégé

Docteurs DEMBELE Bamory Maitre-assistant

> AFFI-ABOLI Mihessé Roseline Assistante ADJAMBRI Adia Eusebé Assistant AYE YAYO Mireille Assistante KABRAN Tano K. Mathieu Assistant KOUAME Dénis Rodrigue Assistant N'GUESSAN-BLAO A. Rebecca S. Assistante SANGARE Mahawa Assistant YAPO Assi Vincent De Paul Assistant

IV. CHIMIE ANALYTIQUE, CHIMIE MINERALE ET GENERALE, TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

Professeur Professeur Titulaire ATINDEHOU Eugène

Chef de Département

Professeur Titulaire **Professeurs** MALAN Kla Anglade

> AKE Michèle Professeur Titulaire YOLOU Séri Fernand Maître de Conférences

Docteurs AMIN N'cho Christophe Maître Assistant

BONY Nicaise François Maître Assistant GBASSI K. Gildas Maître Assistant TRE Eric Serge Assistant

V. **CHIMIE ORGANIQUE ET CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Professeur YAPI Ange Désiré Maître de Conférences Agrégé

Chef de Département Maître Assistant

Docteur OUATTARA Mahama Maître Assistant

VI. <u>PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE, BIOLOGIE ANIMALE ET ZOOLOGIE</u>

Professeur KONE Moussa Professeur Titulaire

Chef de Département

Professeurs MENAN Eby Ignace H. Professeur Titulaire

YAVO William Maître de Conférences Agrégé

Docteurs BARRO KIKI Pulchérie Maître Assistante DJOHAN Vincent Maître Assistant

KASSI Kondo Fulgence Assistant
KONATE Abibatou Assistant
VANGA ABO Henriette Assistant

VII. PHARMACIE GALENIQUE, BIOPHARMACIE,

COSMETOLOGIE, GESTION ET LEGISLATION PHARMACEUTIQUE

Professeur KABLAN Brou Jérôme Maître de Conférences Agrégé

Chef de Département par intérim

Docteurs KOFFI Armand A. Maître Assistant

AMARI Antoine Serge G. Maître Assistant
AKA-ANY Grah Armelle A.S. Assistante
DALLY Laba Ismaël Assistant
N'GUESSAN Alain Assistant

VIII. <u>PHARMACOGNOSIE, BOTANIQUE, BIOLOGIE VEGETALE, CRYPTOGAMIE,</u>

Professeur KONE BAMBA Diénéba Professeur Titulaire

Chef de Département

Docteurs ADJOUGOUA Attoli Léopold Assistant

FOFIE N'Guessan Bra Yvette Assistante SIMAGA Dédéou Assistant

IX. PHARMACOLOGIE, PHARMACIE CLINIQUE ET THERAPEUTIQUE, ANATOMIE, EMBRYOLOGIE ET PHYSIOLOGIE HUMAINES

Professeur KABLAN Brou Jérôme Maître de Conférences Agrégé

Chef de Département

Docteurs ABROGOUA Danho Pascal Maître Assistant

KOUAKOU SIRANSY N'doua G. Maître Assistante

AMICHIA Attoumou M Assistant
DJADJI Ayoman Thierry Lenoir Assistant
IRIE N'GUESSAN Amenan G. Assistante
KAMENAN Boua Alexis Assistant
KOUAKOU Sylvain Landry Assistant

X. PHYSIQUE, BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, STATISTIQUES ET INFORMATIQUE

Professeur ATINDEHOU Eugène Professeur Titulaire

Chef de Département par intérim

Docteur POLNEAU VALLEE Sandrine Assistante

XI. SANTE PUBLIQUE, HYDROLOGIE ET TOXICOLOGIE

Professeur KOUADIO Kouakou Luc Professeur Titulaire Chef de département

Professeur DANO Djédjé Sébastien Maître de Conférences Agrégé

OGA Agbaya Stéphane Maître de Conférences Agrégé

Docteurs CLAON Jean Stéphane Maître Assistant

EZOULIN Miézan Jean Marc
SACKOU KOUAKOU J.

DIAKITE Aissata

LEKADOU KORE Sylvie

Assistante

Assistante

LEKADOU KORE Sylvie Assistante
MANDA Pierre Assistant
SANGARE TIGORI B. Assistante
YAO ATTIA Akissi Régine Assistante



Celui qui demeure sous l'abri du Très Haut repose à l'ombre du Tout Puissant

Je dis à l'Eternel : mon refuge et ma forteresse, mon Dieu en qui je me confie

Puisqu'il m'aime je le délibérai ; Je le protégerai puisqu'il connait mon nom

Il m'invoquera et je lui répondrai ; je serai avec lui dans la détresse, je délivrerai et je le glorifierai

Je le rassasierai de longs jours, je lui ferai voir mon salut.

Psaume 91Verset 1, 2, 14, 15,16

A Dieu, le père 7out Puissant

Au Dieu Tout Puissant Maître de la terre et des cieux, mon âme t'exalte

Que ma vie sur terre soit un témoignage de ta gloire

Je te louerai et t'adorerai tout le long de ma vie

Béni soit l'Eternel Dieu, le Dieu d'Israël qui seul fait des prodiges!

Béni soit à jamais son nom glorieux!

Que toute la terre soit remplie de sa gloire! Amen! Amen! Amen!

A mes parents

Monsieur Brissy Gnohité Boniface et Madame Brissy née Konan Amoin

Vous êtes les représentants de Dieu sur terre pour moi

Je ne cesserai de vous remercier pour votre protection, votre amour, votre soutien sans faille dans tous les moments de ma vie.

Je vous dois ce que je suis et ce que je serais

Je vous aime.

Que le Seigneur Dieu Tout Puissant vous accorde longue vie.

A mes frères et sœurs

Guy, Chantal, Hervé, Sonia, Rachelle, Alain, Francis,

Aimé, Stéphanie, Jean Michel, Marie constante, Anne Esther

Vous attendiez ce travail avec impatience; je vous remercie pour vos soutiens et encouragements pendant toutes ces années;

Puissions-nous continuer à vivre en harmonie en ayant les uns pour les autres une tendresse chaque jour plus grande ;

Merci pour tout, que Dieu vous bénisse!

A ma taute Kouassi Aimée

Dieu vous bénisse au centuple.

Merci pour votre soutien et votre disponibilité.

A mon père spirituel

Beugré Anselme et son épouse

Vous avez toujours su me donner les conseils appropriés;

Que Dieu vous comble de ses grâces et que l'Esprit Saint vous guide tout au long de votre vie.

A mon pasteur

Kouamé Hyacinthe et son épouse

Merci, car vous avez toujours été présents dans mes moments de joie et de peines. Merci d'avoir prié pour moi et d'avoir été si aimable pour moi.

Que Dieu vous bénisse.

Au Professeur Aké Michéle

Merci pour votre soutien, votre rigueur, vos encouragements, votre encadrement.

Que Dieu tout puissant vous comble de grâces, d'abondantes bénédictions.

Qu'il vous donne une vie glorieuse sur cette terre.

Au Professeur Danon Djedje

Votre êtes un exemple pour moi.

Merci pour vos conseils, vos soutiens

Que le Seigneur Dieu tout puissant vous bénisse!

A Docteur Manouan Bilé Adou Phillipe

Ton soutien a été un pilier pour moi

Que le Tout Puissant t'assiste dans toutes tes entreprises

Qu'il te fortifie et te bénisse

Que sa faveur et son amour t'accompagne tout le long de ta vie.

Merci pour tout

Que Dieu m'accorde la grâce de te combler, de t'assister et de t'aimer d'avantage, Amen!

A mes amies de toujours

Chendjou Marléne, M"Djaha Diane, Ogounon Marina

Nous avons toujours considéré la rigueur comme un coup de pouce pour tendre vers un travail soigné.

Que vous soyez la prunelle des yeux de l'Eternel.

A mes amis

Basile, Christian, Letitia, M., danielle, Simon, Audrey, DrMele ké, Monique, Olivier, Ibrahim, Désiré, Elie, Dr. Asket, Ewige, Dominique, Dr. Guedé, Fanny, Dr. Kouamé Jerome, Judith, Flore, Nadia, Yohoua,...

Que le Seigneur songe à vous rendre au centuple cet encadrement par la protection de votre famille et de votre carrière!

A tous les étudiants de l'UTR de pharmacie

Recevez cette thèse, symbole de notre amitié. Que Dieu vous bénisse!

A la 28ème promotion de l'UJR SPB

Recevez cette thèse, elle est aussi la votre puisque votre solidarité est sans faille en toutes circonstances.

Au personnel de l'MSP et particulièrement à Dr Soko. Mr N'Bra...

Pour votre disponibilité et votre aide dans la collecte des informations concernant cette thèse.

A tous Les membres de ma communauté chrétienne Mr et MM ASSANVO, les pasteurs, la jeunesse, les femmes....

Que Dieu vous bénisse dans tous les domaines de votre vie et vous combles de grâce. Merci pour tout

A tous ceux que j'ai involontairement oubliés

Souhait que chacun de vous demeure sous la protection du Tout Puissant!

A NOS EMMINENTS MAÎTRES ETJUGES

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENTE DIE JURISE

MONSIEUR LE PROFESSEUR ATINDEHOU EUGENE

- Professeur Titulaire de Chimie Analytique et Bromatologie à I'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
- Chef du département de Chimie Analytique, Bromatologie, Chimie Générale et Technologie Alimentaire à I'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques.
- Doyen de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
- Ex Pharmacien Chef du CHU de Cocody
- Membre de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM)
- Membre de la Société des Experts Chimistes de France
- Chevalier dans l'Ordre des Palmes Académiques de France
- > Officier de l'Ordre du Mérite de l'Education National de Côte d'ivoire

Cher Maître,

Nous vous remercions pour l'honneur que vous nous faites en présidant le jury de notre thèse et ce malgré vos nombreuses occupations.

Veuillez trouver ici, cher maître, l'expression de notre infinie gratitude et surtout de notre profonde admiration

Que Dieu vous bénisse!

A NOTRE MAITRE ET JUGE

MADAME LE PROFESSEUR AKE MICHELE

- Docteur en pharmacie
- ➤ DESS en Nutrition, Diététique et Contrôle des Aliments Université Paris XI
- ➤ DEA option Sciences des aliments de l'université de Montpellier I, option sciences des aliments
- ➤ Doctorat de l'Université de Montpellier I, option Sciences des Aliments
- ➤ Professeur Titulaire en chimie analytique et bromatologie à I'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques d'Abidjan
- ➤ Pharmacien chef, de la Pharmacie et du Laboratoire de Nutrition de 1'INSP d'Abidjan
- Membre de la Société Ouest Africaine de Chimie
- ➤ Membre de l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC)
- Membre de la Société des Experts Chimistes de France

Cher Maître,

Nous vous remercions pour votre disponibilité et votre patience à notre égard. Nous sommes très honorée d'avoir bénéficié de vos conseils. Merci pour votre rigueur et votre amour pour le travail bien fait.

Veuillez recevoir chère maître, notre profonde gratitude et notre infinie reconnaissance.

Que le tout Puissant soit toujours avec vous !

Monsieur le Professeur OGA AGBAYA STEPHANE

- Docteur en pharmacie diplômé de l'Université de Cocody
- ➤ Maitre de conférences en Santé Publique, Epidémiologie, et Economie de la Santé et du Médicament;
- Chargé de la recherche épidémiologique et Statistique à l'Institut National de Santé Publique;
- Ancien interne des hôpitaux ;
- ➤ Membre du Secrétariat des rédactions de la revue CAHIER SANTE PUBLIQUE ;
- ➤ Membre de l'Association des Epidémiologistes de Langue Française (ADELF).

Cher maître,

Vos qualités scientifiques et humaines forcent notre admiration. Nous avons voulu que ce travail soit empreint de votre esprit critique. Merci d'avoir accepté de siège dans ce jury de thèse

Nous tenons à vous exprimer notre profond respect et notre gratitude.

Que DIEU vous comble de toutes ses bénédictions!

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Monsieur le Docteur ADOUENI KATCHE VALERY

- Médecin-diabétologue, Ex chef du service de Diabétologie et de Diététique préventive à l'INSP
- ➤ Diplômé de nutrition appliquée (Centre International de l'Enfance PARIS)
- ➤ Diplômé en éducation de diabétique (IDF/ PADSG) (International Diabete Study Group)
- Consultant en diabétologie
- ➤ Membre de la C.R.E.S.A.R.CI (Cellule de Recherche en Santé de la Reproduction en Cote d'Ivoire)
- Membre du G.E.E.D.CI (Groupe des Experts sur l'Education des Diabétiques en Cote d'Ivoire)
- Membre de la société Francophone Africaine de Diabétologie (SFAD)
- ➤ Membre du P.A.D.S.G (Pan African Study Group)
- Directeur Coordonnateur du Programme National de prise en charge des maladies métaboliques

Cher Maître,

Vous n'avez pas hésité à accepter de juger cette thèse malgré vos occupations.

Vous avez toujours été présent en dépit de vos multiples responsabilités.

Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements pour votre contribution à la réussite de ce travail.

Que DIEU vous bénisse.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX	5
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES PHOTOGRAPHIES	6
LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION	8
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	12
CHAPITRE I : LE DIABETE SUCRE	13
I- NOSOLOGIE	14
I-1- Définition	14
I-2- Classification du diabète	14
II- PHYSIOPATHOLOGIE	15
II-1- Diabète de type 1	15
II-2- Diabète de type 2	15
II-3- Caractéristiques distinctives des diabètes de type 1 et de type 2	16
III- EPIDEMIOLOGIE	16
IV- CRITERES DIAGNOSTIQUES SELON L'ADA	17
V- COMPLICATIONS	18
V-1- Complications métaboliques	18
V-2- Complications évolutives dégénératives vasculaires	20
V-3- Complications infectieuses	22
V-4- Pied diabétique	23
VI- PRISE EN CHARGE DU DIABETE	24
VI-1- Aspects diététiques	24
VI-2- Insulinothérapie	25
VI-3- Traitement par les antidiabétiques oraux	26
VI-4- Surveillance d'un diabétique traité	31

CHAPITRE II : INSULINE HUMAINE	33
I- Historique	34
II-Définition de l'insuline	35
III-Structure de l'insuline humaine	35
IV-Propriétés physicochimiques	35
V- Caractères organoleptiques	36
VI- Sécrétion de l'insuline	36
VII-Présentation des insulines	36
VIII- Mode d'action	43
IX - Pharmacodynamie	43
X- Propriétés pharmacocinétiques	44
XI- Aspects thérapeutiques	44
XII- Conservation	46
XIII- Production de préparation injectable d'insuline	46
XIV- Différentes méthodes de recherche et de dosage de l'insuline humaine	47
XV- Insulinothérapie	50
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	54
CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES	55
CADRE D'ETUDE	56
I- MATERIEL	57
I -1- Echantillonnage	57
I-2- Verrerie	57
I-3- Appareillage	58
I-4- Produit de référence et réactifs	59
II- METHODES	60
II-1- Contrôle des caractères généraux	60

II-2- Mode de préparation des solutions de travail
II-3- Mise au point de la méthode
II-4- Procédure de validation
II-5- Détermination de la quantité d'insuline humaine dans les types de
médicaments prélevés
CHAPITRE II : RESULTATS
I- CONTROLE DES CARACTERES GENERAUX
I-1 Contrôle des caractères organoleptiques
I-2 Contrôle de l'étiquetage
II- MISE AU POINT DE LA METHODE D'ANALYSE
II-1 Traitement de l'échantillon
II-2 Conditions de l'analyse chromatographique
III- PROCEDURE DE VALIDATION
IV- APPLICATION DE LA METHODE
CHAPITRE III : DISCUSSION
I-CONTROLE DES CARACTERES GENERAUX
I-1 Contrôle des caractères organoleptiques
I-2 Contrôle de l'étiquetage
II-METHODE ANALYTIQUE
II-1 Traitement de l'échantillon
II-2 Conditions de l'analyse chromatographique
III- VALIDATION DE LA METHODE
IV- APPLICATION DE LA METHODE
IV-1 Analyse qualitative
IV-2 Analyse quantitative
CONCLUSION
RECOMMANDATIONS

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ----- 96

Liste des tableaux

Tableau I	:	Caractéristiques distinctives des diabètes de type 1 et de type 2	16
Tableau II	:	Liste des principaux sulfamides Hypoglycémiants	27
Tableau III	:	Formes et dosages de la metformine	28
Tableau IV	:	Les inhibiteurs de l'alphaglucosidase	29
Tableau V	:	Différences dans les séquences des acides animés desinsulines humaine, porcine et bovine	37
Tableau VI	:	Insulines disponibles	51
Tableau VII	:	Présentation des échantillons	57
Tableau VIII	:	Caractères organoleptiques des échantillons	68
Tableau IX	:	Résultats du contrôle de l'étiquetage des échantillons	69
Tableau X	:	Gamme étalon de l'insuline humaine	73
Tableau XI	:	Répétabilité de l'analyse chromatographique	74
Tableau XII	:	Répétabilité de la procédure d'analyse	75
Tableau XIII	:	Test de fidélité intermédiaire manipulateur	76
Tableau XIV	:	Test de fidélité intermédiaire jour	77
Tableau XV	:	Résultats de l'essai de l'exactitude de la méthode	77
Tableau XVI	:	Limites de détection et de quantification	78
Tableau XVII	:	Résultats de l'analyse des médicaments d'insuline	
		humaine rapide	79
Tableau XVIII	:	Résultats de l'analyse des médicaments d'insuline	
		humaine mixte	80
Tableau XIX	:	Résultats de l'analyse dosage des médicaments d'insuline	
		humaine lente	81
Tableau XX	:	Tableau récapitulatif des résultats	82

Liste des figures

Figure 1	: Structure de l'insuline humaine selon DOLISI	35
Figure 2	: Hémisynthèse de l'insuline humaine à partir de l'insuline porcine	38
Figure 3	: Biosynthèse de l'insuline humaine par la technique de l'ADN recombiné	40
Figure 4	: Algorithme thérapeutique du diabète de type 2	53
Figure 5	: Chromatogramme d'une solution de référence de l'insuline humaine à 3,5 µg/ml. Conditions essai 1	70
Figure 6	: Chromatogramme d'une solution de référence d'insuline humaine à 3,5 µg/ml. Conditions essai 2	71
Figure 7	: Chromatogramme d'une solution de référence de l'insuline humaine à 3,5µg/ml. Conditions essai 3	71
Figure 8	: Chromatogramme d'un échantillon d'insuline humaine de type rapide	72
Figure 9	: Droite d'étalonnage de l'insuline humaine	73
	Liste des photographies	
Photographie 1	: Pied diabétique ulcéré	23
Photographie 2	2 : Exemples d'appareils de contrôle de la glycémie et accessoires, de bandelettes réactives urinaires, et de stylo à insuline	32
Photographie 3		58

ABREVIATIONS

AA : Acide aminé

ADN : Acide Désoxy-ribonucléiqueADA : American Diabetes Association

ATP : Acide triphosphasique

AVC : Accident vasculaire cérébral

CADA : Centre Anti-diabétique d'Abidjan

CLHP: Chromatographe liquide haute performance

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

Cp, Cs: Conditionnement primaire, conditionnement secondaire

DCI : Dénomination commune internationale

g : Gramme

IDF : International Diabetes Federation

 $\mathbf{HbA_1C}$: Hémoglobine $\mathbf{A_1C}$

Hg : Mercure

IGF : Insuline Growth Factor

INSP : Institut National de Santé Publique

Jr : Jour

kg : KilogrammeKcal : Kilocalorie

l : Litre

M : Moralité
ml : Millilitre
mm : Millimètre
mmol : Millimole
mn : Minute
N : Normalité

nmol : Nanomole

NPH: Neutral Protamine Hagedorn

OMS : Organisation Mondiale de la SantéUFR : Unité de Formation et de Recherche

UI : Unité internationale

UV : Ultra Violetμg : Microgrammeμmol : Micromole

v : Volume

INTRODUCTION

La maladie diabétique est une affection métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique mais aussi par des troubles du métabolisme des lipides et des protéines associés à des déficits absolus ou relatifs de l'action et/ou de la sécrétion de l'insuline [6].

La dernière édition de l'«Atlas du diabète de la IFD» affirmait qu'il y avait 285 millions de diabétiques dans le monde en 2010, avec une prévalence de 6,6 % et 12, 1 millions de personnes diabétiques en Afrique. [29]

La prévalence du diabète en Afrique varie entre 1,9 % et 7,1 % selon LOKROU et Coll. [25].

Le diabète est en constante expansion dans le monde entier. Si l'on en croit les prévisions, on comptera plus de 438,4 millions de malades diabétiques dans le monde d'ici 2030 avec une prévalence de 7,8 % soit 54 % d'augmentation et 23,9 millions de malades diabétiques en Afrique soit 98 % d'augmentation [27].

Cette pathologie représente un véritable problème de santé publique dans le monde en général et dans les pays en développement en particulier

En Côte d'Ivoire, selon les données du Centre Anti-Diabétique d'Abidjan (CADA) et celle de Zmirou [39], cette prévalence a été estimée à 5,7 % en 1979, tous types de diabètes confondus [31,39].

Selon la 5émé édition de l'atlas de la FID, la prévalence du diabète chez les sujets de 20 à 79 ans en Cote d'Ivoire a été évaluée à 4,2 % en 2011 **[29].**

C'est une affection qui touche toutes les couches socioéconomiques de la population en Côte d'Ivoire [1].

D'énormes progrès ont été réalisés dans la prise en charge de la maladie avec la création en 1970 du Centre Anti-Diabétique d'Abidjan (CADA), l'ouverture du Service d'Endocrinologie Diabétologie d'Abidjan du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Yopougon en 2001 et la formation de nombreux spécialistes dans le domaine clinique et biologique [24]. Les autorités politiques

et sanitaires en Côte d'Ivoire ont entrepris des actions afin d'améliorer les prestations et maitriser l'évolution de cette maladie. Ce sont :

- ➤ La décentralisation de la prise en charge: PREDIABCI / Sanofi Aventis (2004)
- ➤ La création du Programme National de Lutte contre le Diabète (1998-2007), remplacé en 2007 par le Programme National de Lutte contre les Maladies Métaboliques (PNLMM) [27].

La prise en charge du diabète sucré se compose d'un volet éducationnel, diététique et médicamenteux. Le volet médicamenteux regroupe l'insuline et les antidiabétiques oraux [24].

Le but principal du traitement du diabète de type 1 ou de type 2 est de maintenir la glycémie ou l'hémoglobine glyquée dans les valeurs normales et de prévenir d'éventuelles complications [1].

L'insulinothérapie occupe une place importante dans cette démarche thérapeutique médicamenteuse, soit seule, soit en association avec les antidiabétiques oraux. Elle est utilisée uniquement dans le diabète de type 1 et après plusieurs échecs thérapeutiques dans le diabète de type 2[1].

Son traitement est très couteux et à long terme. Dans un souci de santé publique, et d'accessibilité des médicaments à la population, diverses actions ont été menées notamment l'utilisation des biosimilaires qui sont des génériques à moindre coût et à même efficacité, accessibles à tous et également la mise en place de forfait social annuel par personne pour le suivi des patients, comme c'est le cas à l'Institut National de Santé Publique.

Au vu de toutes ces observations, le laboratoire de Chimie Analytique de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques en collaboration avec le laboratoire de Nutrition de l'Institut National de Santé Publique, s'est proposé

de développer une méthodologie d'analyse de l'insuline humaine dans les formes pharmaceutiques.

L'objectif général consiste à développer une méthode de dosage de l'insuline humaine.

Les objectifs spécifiques étaient de:

- Développer une méthode d'analyse de l'insuline humaine par chromatographie liquide ;
- Valider la méthode d'analyse mise au point;
- Appliquer cette méthode à l'analyse des préparations injectables d'insuline humaine disponibles à l'Institut National de Santé Publique au moment de l'étude ;
- Evaluer la conformité des médicaments analysés.

Cette étude comporte deux parties :

- des rappels bibliographiques qui porteront sur le diabète et sa prise en charge ainsi que sur l'insuline humaine ;
- la partie expérimentale comprenant la méthodologie suivie des résultats obtenus et de la discussion qui en découle et se terminera par des recommandations et une conclusion.

CHAPITRE I : LE DIABETE SUCRE

I- NOSOLOGIE

I-1- Définition

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le diabète sucré comme étant un état d'hyperglycémie chronique relevant de facteurs endogènes et/ou exogènes agissant souvent conjointement. Est diabétique toute personne qui, à deux reprises, à plusieurs jours d'intervalle, présente :

- une glycémie à n'importe quel moment de la journée supérieure à 2 g/l (11,1 mmol/l)
- ou une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,26 g/l (7 mmol/l)

La glycémie normale est comprise entre 0,70 g/l et 1,10 g/l [27].

I-2- Classification du diabète

Selon l'American Diabetes Association (ADA), on distingue [27]:

1. Diabète de type 1

- a. auto-immune
- b. idiopathique

2. Diabète de type 2

3. Autres types de diabète spécifique

- a. Défauts génétiques de la fonction des cellules β
- b. Défauts génétiques de l'action de l'insuline
- c. Diabètes pancréatiques
- d. Endocrinopathies
- e. Diabètes induits par les médicaments
- f. Infections (rubéole congénitale, cytomégalovirus)
- g. Formes rares de diabète lié à une pathologie du système immunitaire
- h. Autres syndromes génétiques

4. Diabète gestationnel [27]

II-PHYSIOPATHOLOGIE

II-1 Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune dans 90% des cas (10% idiopathiques), dans lequel le pancréas est incapable de produire l'insuline, suite à une destruction des cellules bêta des îlots *DE LANGERHANS*, entrainant ainsi une insuffisance absolue en insuline [4].

La destruction des cellules bêta est essentiellement due à une infiltration des îlots par les lymphocytes T cytotoxiques CD8. [4]

Le processus auto-immun débute plusieurs années avant le début du diabète. L'élévation de la glycémie suppose une destruction de 80 à 90 % des cellules bêta. Les infections ou les chocs psychologiques précédant de quelques semaines ou de quelques mois l'apparition du diabète, souvent incriminés par les malades ou leur entourage, ne peuvent donc jouer qu'un rôle déclenchant [4].

II-2 <u>Le diabète de type 2</u>

Il correspond à l'ancienne terminologie du diabète non insulinodépendant et associe :

- Une insulinorésistance dominante avec insulinopénie relative ;
- Une diminution prédominante de l'insulinosécrétion associée ou non à une insulinorésistance [5].
 - Il est par ailleurs important de rappeler :
- Le rôle majeur de l'obésité et de la graisse abdominale dans la genèse de l'insulinorésistance (obésité androïde);
- La prédisposition familiale probablement d'origine génétique ;

- Le risque élevé de complications macro et microvasculaires ;
- L'augmentation du risque de développer un diabète de type 2 avec l'âge, avec l'obésité, la sédentarité et sa survenue plus fréquente chez les femmes ayant présenté un diabète gestationnel et les sujets hypertendus ou dyslipidémiques [5].

Ce type de diabète survient le plus souvent dans un contexte pathologique plus large appelé le syndrome métabolique [1].

II-3 <u>Caractéristiques distinctives des diabètes de type 1 et de type 2</u>

Les caractéristiques distinctifs des diabètes de type 1 et de type 2 sont respectivement rapportés dans le tableau ci-dessous (**Tableau I**) [27]

<u>Tableau I</u>: Caractéristiques distinctives des diabètes de type 1 et de type 2

Facteurs distinctifs	Diabète de type 1	Diabète de type 2	
Antécédents familiaux	Absents ou rares	Présents	
Age de survenu	Avant 35 ans	Après 40 ans	
Début	Explosif	Lent ou insidieux	
Facteur déclenchant	Absent	Présent	
Symptomatologie	Bruyante	Pauvre ou absente	
Poids	Normal ou maigre	Surpoids	
Hyperglycémie au	Majeure supérieure à 3g/l	Souvent inférieure à 2g/l	
diagnostic			
Cétose	Présente	Absente	
Diagnostic biologique	Peptide c est effronté	Peptide C présent en quantité	
	Présence d'anticorps anti	suffisante	
	insuline et anti-ilots de	Absence d'anticorps	
	langerhans et anti GAD		

III- EPIDEMIOLOGIE

Il y aurait environ 320 millions de malades qui souffrent du diabète dans le monde en 2010, et qu'il y en aura 500 millions en 2030. De plus, 4 millions de personnes meurent du diabète chaque année [29].

Près de 80 % des décès dus au diabète se produisent dans les pays à revenu faible ou moyen [1].

Près de la moitié des décès imputables au diabète surviennent chez des personnes de moins de 70 ans. Près de 55 % des personnes qui meurent de cette maladie sont des femmes [32].

Il est intéressant de noter que la fréquence des diabètes dans la population augmente rapidement à partir de 45 ans pour culminer entre 55 et 75 ans [1].

IV- CRITERES DIAGNOSTIQUES SELON L'ADA

- Dosage de la glycémie plasmatique à jeun en laboratoire après 8 à 12 heures de jeune :
 - si la glycémie à jeun est inférieure à 1,10 g/l (6,11 mmol/l), le sujet est "normal" ou normoglycémique;
 - si la glycémie à jeun est supérieure ou égale à 1,26 g/l (7 mmol/l), le sujet est diabétique. Ce chiffre doit être vérifié par une analyse de contrôle effectuée un autre jour.
 - si la glycémie à jeun est comprise entre 1,10 et 1,26 g/l, le sujet est classé comme atteint d'hyperglycémie modéré à jeun. Ces sujets ne sont pas diabétiques mais sont à haut risque de le devenir en l'absence de mesures hygiéno-diététiques [27].
 - Présence de symptômes du diabète (polyurie, polydipsie, polyphagie, amaigrissement inexpliqué, somnolence voire coma) et une glycémie supérieure ou égale à 2,00 g/l (11,1mmol/l) quelle que soit l'heure de l'examen.

La pratique de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (**HPGO**) qui consiste à mesurer la glycémie 2h après la prise de 75 g de glucose per os n'est pas recommandée en pratique clinique [27].

V- COMPLICATIONS

L'excès permanent de sucre dans le sang est une véritable intoxication chronique (glucotoxicité) des cellules de l'organisme dont résultent les principales complications aigues et chroniques. Il en existe trois :

- Les complications métaboliques (aiguës) que sont les comas par acidocétose, acidose lactique, les comas hyperosmolaires et hypoglycémiques.
- Les complications dégénératives (chroniques) qui sont constituées essentiellement de microangiopathie (rétinopathie, neuropathie et néphropathie) et de macroangiopathie.
- Les complications infectieuses (aigues) [19, 25].

"Le pied diabétique" est une sommation des complications infectieuses, neurologiques et macroangiopathiques localisées au niveau du pied [19, 25].

V-1 Les complications métaboliques

V-1-1 La cétoacidose

La cétoacidose diabétique représente le stade extrême d'une déficience en insuline. Elle est la manifestation initiale d'une complication du diabète de type1. En effet, en absence d'insuline, la glycémie augmente de façon extrême, et dépasse les capacités de réabsorption tubulaire du glucose au niveau du rein. Le glucose passe alors dans les urines, entraînant avec lui de l'eau (polyurie osmotique) causant une soif intense. La cétogenèse privilégiée, favorise l'accumulation des corps cétoniques qui s'accumulent dans le sang [28].

En cas d'acidocétose confirmée, le tableau clinique est évident : il existe une altération de l'état général avec soif intense, polyurie importante, des troubles digestifs et des troubles neurologiques avec des degrés variés d'obnubilation. Elle est définie arbitrairement par un pH inférieur à 7,20 associé à une

hyperglycémie à 2,5 g/l au moins. Le traitement est basé sur une rééquilibration hydro- électrolytique associée à une insulinothérapie [19,25].

V-1-2 L'acidose lactique

C'est une complication rare due à l'accumulation excessive d'acide lactique dans l'organisme allant de 5 à 8 mmol/l lors de l'usage des *Biguanides* (par exemple la *Metformine*) [19].

En effet, ils provoquent une hyperproduction de lactates par l'intestin, mais la constitution d'une acidose lactique induite par les biguanides nécessite l'accumulation du produit dans l'organisme, à l'occasion d'une insuffisance rénale [28].

La symptomatologie clinique est souvent dominée par des signes digestifs, des signes neurologiques, une polypnée ou une dyspnée, enfin des signes cardiovasculaires à type de chute tensionnelle. Le traitement est basé sur une alcalinisation avec une épuration extra-rénale et une insulinothérapie par voie intraveineuse [19,25].

V-1-3 Le coma hyperosmolaire

Le coma hyperosmolaire se définit par une hyperosmolarité supérieure à 350 mmol, liée à une hyperglycémie majeure (supérieure à 6 g/l ou 33 mmol/l) et à une hypernatrémie. La cétose est absente ou discrète. Le traitement vise à corriger la déshydratation et à réduire l'hyperglycémie sans oublier le traitement des facteurs favorisants [19, 25].

V-1-4 Le coma hypoglycémique

C'est le coma le plus fréquent parmi ceux qui menacent le diabétique connu et traité. L'hypoglycémie se définit par une chute de la glycémie en dessous de 0,5 g/l. Les symptômes vont de la simple sensation de faim avec

sueurs et tremblements jusqu'au coma. Il s'observe essentiellement lors du surdosage médicamenteux par l'insuline et les sulfamides hypoglycémiants, également lors d'un repas ou une collation omis ou trop pauvre en hydrates de carbone et aussi après un exercice physique imprévu intense ou prolongé. En pratique, si le sujet est conscient, 15g de sucre (trois carreaux de sucre) sous la langue suffisent, sinon il faut avoir recours à l'administration d'une solution glucosée hypertonique et/ou du glucagon [19, 25].

V-2 Complications évolutives dégénératives vasculaires

V-2-1 La microangiopathie

La microangiopathie est l'atteinte des petits vaisseaux de l'organisme, notamment l'œil, le nerf et le rein.

V-2-1-1 <u>Rétinopathies</u>

En Côte d'Ivoire, la rétinopathie est présente chez environ 15 à 37 % des diabétiques et est détectée par l'examen du fond d'œil et par l'angiographie [19]. Elle constitue la principale complication du diabète sucré par sa fréquence et sa potentielle gravité. C'est la première cause de cécité dans les pays développés [19,25]. Le traitement médical consiste en l'administration d'antiagrégants plaquettaires pour la prévention des occlusions capillaires. On utilise également la photo-coagulation panrétinienne qui consiste à détruire les zones rétiniennes, ischémiques à l'angiographie fluorescéinique [26].

V-2-1-2 Neuropathies

Les troubles du système nerveux se développent dans les dix premières années du diabète chez 40 à 50 % des personnes diabétiques de type 1 ou 2. Cela en raison d'une mauvaise circulation sanguine et du taux élevé de glucose, qui altère la structure des nerfs. Le plus souvent, le sujet ressent des picotements,

des pertes de sensibilité et des douleurs qui se manifestent d'abord au bout des orteils ou des doigts, puis remontent progressivement le long des membres atteints. La neuropathie peut aussi toucher les nerfs qui contrôlent la digestion, la pression sanguine, le rythme cardiaque et les organes sexuels [19,25]. Le traitement consiste à un apport de complexe polyvitaminé (surtout en vitamines B1,B6,B12) puis à administrer des médicaments contre la douleur (antidépresseurs tricycliques, amitryptylline associé au fluphénazine...) pour la neuropathie douloureuse et à administrer des prokinétiques (métoclopramide...) en ce qui concerne la neuropathie autonome [26].

V-2-1-3 Néphropathies

Le tissu des reins est constitué d'une multitude de minuscules vaisseaux sanguins qui forment un filtre dont le rôle est d'éliminer les toxines et déchets du sang. Comme le diabète cause des troubles vasculaires, ces petits vaisseaux peuvent en être affectés au point d'entraîner une détérioration progressive des reins qui se manifestera par divers troubles [11,25].

On peut diviser la néphropathie en cinq (5) stades [19]:

- **néphropathie fonctionnelle** : au moment où le diagnostic initial est porté, le flux sanguin rénal et le taux de filtration glomérulaire sont élevés ;
- **néphropathie latente** : protéinurie faible ;
- néphropathie débutante : apparition d'une microprotéinurie ;
- **néphropathie avérée** : environ quinze (15) ans après le diagnostic de diabète, l'albuminurie dépasse 300 mg/24 heures. Le flux sanguin rénal et le taux de filtration glomérulaire se sont normalisés.

- insuffisance rénale terminale

Le traitement vise à contrôler l'équilibre glycémique (HbA₁C), le rapport albumine/créatinine urinaire, et à contrôler également la pression artérielle.

Il faut réduire l'apport de sodium à 5g par jour, réduire les protéines (0,8 g de protéines par kg de poids corporel par jour) chez le patient proteinurique [26].

V-2-2 La macroangiopathie

La macroangiopathie est l'atteinte des vaisseaux de grand calibre et se caractérise par l'insuffisance coronarienne, l'artérite des membres inferieurs et les accidents vasculaires cérébraux [19,25]. Le traitement vise à administrer des dérivés nitrés ou des β-bloquants cardiosélectifs ou inhibiteurs calciques en cas d'insuffisance coronarienne et également des antiagrégants plaquettaires (Aspirine 100 à 300 mg par jour) [26].

V-3 Complications infectieuses

Les infections cutanées bactériennes, mycosiques ou virales sont très fréquentes au cours du diabète sucré. Elles surviennent au cours des diabètes mal équilibrés. L'on distingue trois types d'infections [25] :

V-3-1 Les infections cutanéo-muqueuses

Elles sont fréquentes, souvent révélatrices et se présentent sous deux formes :

- Les infections bactériennes, le plus souvent causées par le staphylocoque doré ; ce sont la folliculite banale, les furoncles et furonculoses, l'anthrax, la pyodermite, l'impétigo. Le traitement est basé sur l'hygiène corporelle associée à une antibiothérapie à visée antistaphylococcique.
- Les mycoses dominées par les candidoses cutanées, génitales (les vulvovaginites), buccales et unguéales (onyxis et perionyxis). Le traitement de ces mycoses fait recours aux imidazolés antifongiques [25].

V-3-2 <u>Les infections buccodentaires</u>

L'examen stomatologique chez le diabétique doit être systématique à la recherche de foyers infectieux tels que les caries dentaires, les parodontopathies (gingivites, parodontites) [25].

Le traitement consiste à faire une antibiothérapie s'il y a infection. L'examen buccodentaire doit être annuel.

V-3-3 Les infections urinaires

Plusieurs facteurs locaux et généraux concourent à la survenue des infections urinaires. Ce sont :

- La glycosurie entraînant une pullulation microbienne.
- Le second facteur est lié à l'altération de l'excrétion et l'émission des urines, due à l'atteinte du système nerveux autonome.
- Les lésions vasculaires et interstitielles intra-rénales qui sont des éléments défavorables à la stérilisation du parenchyme rénal.

On distingue les infections du bas appareil urinaire (la cystite aiguë, la prostatite aiguë, la pneumaturie, etc.) et les infections du haut appareil urinaire (la pyélonéphrite aiguë, l'abcès du rein, etc.) [26].

V-4 Pied diabétique

Le pied diabétique résume les complications du diabète à savoir les atteintes neurogènes et artérielles. Les infections passent inaperçues à cause des troubles de la sensibilité et d'une hypoxie relative liée aux troubles vasculaires. Ceci est responsable le plus souvent d'infections graves pouvant entraîner une amputation du membre inférieur dans les 48 heures parfois, suivant la découverte [25].

Le traitement consiste à déterger les ulcérations avec les solutions antiseptiques. En cas de surinfection, il faut réaliser un prélèvement bactériologique puis une antibiothérapie spécifique au germe incriminé [26].



Photographie 1 : Pied diabétique ulcéré [27]

VI- PRISE EN CHARGE DU DIABETE

VI-1- Aspects diététiques

Les objectifs du traitement diététique du diabétique sont :

- Le maintien de la glycémie la plus proche possible de la normale en évitant des pics hyperglycémiques et hypoglycémiques ;
- La limitation des risques d'athérome surtout pour les diabétiques jeunes ;
- La prise en compte de la dimension sociale, culturelle, hédonique de l'alimentation;
- L'atteinte ou le maintien du poids idéal [9].

VI-1-1-Maintien de la normoglycémie

Les besoins caloriques ou énergétiques sont couverts par les trois groupes alimentaires dans une proportion idéale de 50-55% de glucides (4kcal), 20-35% de lipides (9kcal) et 15-20% de protides (4kcal) en sachant toutefois que 25g de glucides épargnent 1g de protides et que le besoin minimale en hydrates de

carbone est de 100 g pour éviter l'acidocétose par épuisement des réserves de glycogènes [9,20].

Le maintien de la normoglycemie au plan diététique est assuré par une utilisation plus judicieuse des hydrates de carbones et adjonction des fibres alimentaires [22].

VI-1-2-<u>La limitation des risques d'athér</u>ome

Les matières grasses qui entrent dans la composition des viandes, des œufs, des fromages, sont pour la majorité des lipides saturés donc athérogènes. Elles sont également incriminées dans la pathogénie de l'obésité [9,22]. Par contre, les lipides de poisson et les graisses végétales sont polyinsaturés. Il importe de leur conseiller un apport protidique conséquent et d'éviter les graisses saturées [22].

VI-1-3-<u>Préservation de la dimension socioculturelle</u> <u>et hédonique</u>

Il est important de connaître le poids affectif lié au mode nutritionnel du patient car tout changement de régime à un retentissement psychologique d'après TREMOLIERES [22].

Il faut penser à une prescription alimentaire personnalisée en évitant les frustrations. On maintiendra une fragmentation alimentaire nycthémale de trois repas par jour avec des apports caloriques de 1/5 ration totale le matin et 2/5 respectivement à midi et le soir [9].

Le régime doit tenir compte dans la mesure du possible de l'alimentation familiale afin qu'il puisse être suivi à long terme sans bouleverser les habitudes alimentaires [22].

VI-1-4-L'activité physique

Elle est utile tant chez le diabétique de type de type 1que chez les diabétiques de type 2 obèse pour différentes raisons:

- Elle améliore la régulation de la glycémie chez le diabétique de type 1 en augmentant son taux d'insuline.
- Elle augmente la sensibilité des récepteurs à l'insuline endogène.
- Elle contribue au bien être et à l'hygiène génétique.
- Elle entretient la bonne qualité de fonctionnement de l'appareil ostéoarticulaire (souvent menacé chez l'obèse).

Mais en cas de déséquilibre important du physique, il est conseillé de réduire l'activité physique. L'exercice musculaire dans ces circonstances peut accentuer le désordre métabolique [22].

VI-2-L'insulinothérapie

L'insuline est indiquée dans le traitement du diabète de type 1 et de le diabète de type 2 insulinorequerant.

Le choix du type d'insuline et du schéma d'insulinothérapie pour un patient donné résulte de l'équilibre glycémique souhaitable à court, moyen, et/ou long terme [2].

VI-3- Traitement par les antidiabétiques oraux

Les antidiabétiques oraux sont réservés aux diabétiques de type 2 qui ont une sécrétion endogène d'insuline partiellement conservée et uniquement après l'échec du régime seul [22].

L'arsenal thérapeutique du diabétique de type 2 comprend plusieurs classes thérapeutiques.

VI-3-1- Sulfamides hypoglycémiants

a. Mode d'action

Ces médicaments inhibent la glycogénolyse hépatique et potentialisent l'effet insulinosécréteur du glucose ainsi que celui des acides aminés. [1].

b. Effets indésirables

Leurs principaux effets secondaires sont l'hypoglycémie et la prise de poids consécutives à l'hyperinsulinémie [1].

c. Contre - indications

Les principales sont : l'insuffisance rénale et hépatique, la grossesse, l'allaitement et le sujet âgé mal nourrit [1].

<u>Tableau II</u>: Liste des principaux sulfamides hypoglycémiants [27]

Classes	Dénomination commune internationale	Nom Commercial
Sulfamides de première génération	-Carbutamide -Tolbutamide	-Glucidoral® 500 mg -Glidiabet® 5 mg
Sulfamides de	-Gliclazide -Glibenclamide	-Diamicron®80 mg -DiamicronLM® 30 mg -Daonil®
deuxième	-Gliquidone	-Glurenor® 30 mg
génération	-Glipizide	-Glibénèse® 5 mg -Minidiab® 5mg -Ozidia® 5,10 mg -Dibizide® 5 mg
Nouveaux	-Glimépiride	-Amarel ® 1, 2, 3, 4 mg

sulfamides hypoglycémiants	-Diabirel ® -Glimulin ®

VI-3-2 Biguanides hypoglycémiants

a. Mode d'action

Les biguanides hypoglycémiants représentés par est la Metformine inhibent la néoglucogenèse hépatique à partir des lactates et des pyruvates. Ils sensibilisent les tissus hépatiques et musculaires à l'action de l'insuline endogène et ralentissent l'absorption intestinale du glucose [23].

b. Effets indésirables

Les effets secondaires les plus fréquents sont digestifs à type de nausée, anorexie, diarrhée, douleurs abdominales, constipation [23].

L'effet secondaire le plus grave est l'acidose lactique [23].

c. Contre - indications

Ce sont:

- l'insuffisance rénale, cardiaque, hépatocellulaire, respiratoire ;
- l'artérite en poussée, l'accident vasculaire cérébral récent [23]

d. Produits utilisés

<u>Tableau III</u>: Formes et dosages de la metformine [23]

DCI	SPECIALITES	DOSAGE UNITAIRE	POSOLOGIE
Parachlorophénoxyacétate de metformine	Glunican®	500 mg	1 à 3 cp/j

Embonate de	metformine	Stagid®	700 mg	1 à 3 cp/j
Chlorhydrate metformine	de	Glucophage®	500 mg	1 à 3 cp/j
		Gucophage® Metforal®	850 mg	1 à 3 cp/j

On retrouve également la metformine dans diverses associations qui forment la classe des bithérapies fixes comme :

- Metformine 500 mg + Glibenclamide 2,5 mg : Glucovance® 2,5 et 5mg Glibomet® 2,5 mg
- Metformine 1000/500 mg + Rosiglitazone 2mg : Avandamet® 1000 mg (ou 500 mg)
- Amaryl M®: 2 dosages
 - o Glimépiride 1 mg + Metformine 250 mg
 - o Glimépiride 2 mg + Metformine 500 mg
- Glipizide +Metformine :Dibizide® M [27]

VI-3-3 Les inhibiteurs de l'alphaglucosidase

a. Mode d'action

Ils inhibent le dernier stade de la digestion des sucres. Ces médicaments ont pour objectif de décapiter les hyperglycémies postprandiales [23].

b. Précautions d'emploi

Il faut commencer le traitement par une dose initiale de base puis aller progressivement vers la dose maximale (Acarbose : 50 à 300 mg/j ; Miglitol : 50 à 100 mg/j) [23].

c. Effets indésirables

- Flatulence/météorisme, douleurs abdominales, diarrhée
- L'administration à forte dose de l'acarbose (100 mg x 3/j) entraine une élévation des transaminases ainsi que des cas isolés d'hépatotoxicité sévère [23].

d. Contre - indications

- troubles digestifs graves;
- enfant de moins de 15 ans ;
- grossesse et allaitement [23]

e. Produits utilisés

Tableau IV: Les inhibiteurs de l'alphaglucosidase [23]

DCI	SPECIALITES	POSOLOGIE	
Acarbose	Glucor® 50 mg		
Acarbose	Glucor® 100 mg	50 à 300 mg/j	
Miglitol	Diastabol® 50 mg	50 à 200 ma/i	
	Diastabol® 100 mg	50 à 300 mg/j	

VI-3-4 <u>Les Métaglinides ou Glinides</u>

a) Mode d'action

Les métaglinides stimulent la libération d'insuline en inhibant les canaux potassiques ATP-dépendants de la membrane des cellules bêta par une liaison à un récepteur distinct de celui des sulfonylurées en présence de glucose [23].

b) Effets indésirables

- l'hépatotoxicité;
- la prise de poids
- l'hypoglycémie; [23]

c) Produits utilisés

Le seul représentant actuellement commercialisé est la Répaglinide [23]. La Répaglinide (Novonorm®90 cp)se présente sous trois dosages: 0,5 ; 1 ; 2 mg

VI-3-5 Les Thiazolidinediones ou Glitazones

a) Mode d'action

Les Thiazolidinediones abaissent la glycémie en diminuant la disponibilité et la production du glucose au niveau du tissu hépatique ;

Ils exercent une action insulino-sensibilisateur en présence d'insuline [23].

b) Produits utilisés

- Glitazones non associés :
 - Pioglitazone dans Actos® (retiré car favorise le cancer de la vessie)
- -Rosiglitazone dans Avandia® (retiré car entraine des problèmes cardiovasculaires)
- Avandamet®: Association Rosiglitazone + Metformine [23].

c) Effets indésirables

Les plus fréquents sont l'hépatotoxicité, la prise de poids et l'hypoglycémie.

<u>NB</u>: Les glitazones sont toujours commercialisées et utilisées dans le traitement du diabète dans les pays Anglo-Saxons.

VI-3-6 Autres antidiabétiques oraux

Il existe d'autres familles d'antidiabétiques oraux :

- Les incrétino-mimétiques ou les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase IV
 - Stagliptine dans Januvia® 100 mg
 - Exénatide dans Byetta® 5-10 µg en sous cutanée [27].

VI-4 Surveillance d'un diabétique traité

La chronicité de la maladie nécessite un contrôle quotidien de l'équilibre métabolique [22].

VI-4-1 Cycles glycémiques avec glycosuries

- ✓ Déterminés toutes les 4 à 6 heures.
- ✓ Chez un sujet diabétique équilibré : la glycémie est inférieure à 1,20 g/l.
- ✓ La glycosurie est normalement absente. Sa mise en évidence signifie en générale que le seuil sanguin rénal du glucose dépasse 1,80 g/l.
- ✓ Ces cycles sont étudiés lors d'hypoglycémie et lors de la surveillance thérapeutique d'un diabète traité par l'insuline.
- ✓ Cette détermination peut être complétée par le dosage de l'hémoglobine glycosylée [22].

VI-4-2 <u>Dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA₁C)</u>

Anciennement appelée hémoglobine glycosylée. Elle correspond à l'ensemble des molécules d'hémoglobines modifiées par fixation non enzymatique d'oses et principalement du glucose sur des fonctions aminées de la globine [27]. Elle permet d'évaluer avec précision, l'équilibre glycémique au cours des deux ou trois derniers mois précédant le prélèvement, puisque la demivie du globule rouge couvre à peu près cette période [22]. Les valeurs normales de l'hémoglobine glyquées sont :

> entre 4 et 6 % : sujet non diabétique;

> entre 6 et 7 % : diabète bien équilibré;

> supérieur à 7% : diabète mal équilibré [27].

VI-4-3 L'auto surveillance glycémique

Avec le développement de nouvelles techniques de mesure hautement précises et instantanées, il est maintenant possible au diabétique de déterminer sa glycémie. Le patient dispose pour cela de :

Un autopiqueur commode

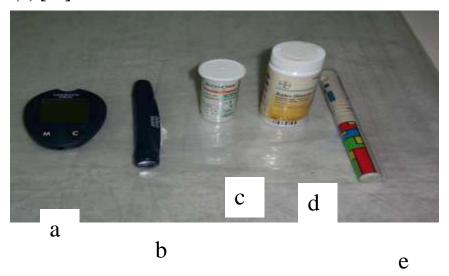
Outil non traumatique et accepté par les patients, il permet d'obtenir la goutte de sang nécessaire à l'évaluation de la glycémie (b).

Bandelettes à lecture visible

Ces bandelettes réactives imprégnées de glucose oxydase reposant sur le principe de la modification de couleur d'une page réactive au contact du sang (c).

> Lecteur de bandelettes ou lecteurs de glycémie

Ces appareils vont permettre une lecture instantanée et automatique de la glycémie (a) [22].



<u>Photographie 2</u>: Exemples d'appareils de contrôle de la glycémie (a,b) et acessoires (c), et de bandelettes réactives urinaires (d) et de stylo à insuline (e).

CHAPITRE II : L'INSULINE HUMAINE

I- Historique

L'insuline est l'une des plus grandes découvertes médicales du 20^e siècle. En effet, elle fut découverte en 1921 par les physiologistes canadiens Frederick Grant Banting et Charles Herbert Best, aidés par le Professeur James John Richard MacLeod. Ils réussirent ensemble à extraire cette hormone du tissu pancréatique de plusieurs chiens. Le biochimiste canadien James Bertram Collip la purifia pour ensuite être en mesure de l'injecter à l'être humain. La première injection d'extraits pancréatiques fut administrée à Léonard Thomson, un adolescent de quatorze ans gravement atteint de diabète. L'insuline lui sauva la vie [1].

En 1923, les quatre hommes qui ont découvert l'insuline reçurent le prix Nobel de médecine. Par la suite, le biochimiste britannique Frederick Sanger détermina la structure moléculaire de cette sécrétion endocrine en 1955. L'insuline fut en réalité la première protéine à être décodée et synthétisée. En 1965, d'autres chercheurs découvrirent ensuite la composition exacte de l'insuline et commencèrent alors à la produire en plus grande quantité [1].

En 1981, le génie génétique amena une nouvelle technique de production de cette sécrétion à l'aide de bactéries et de levures. Elle fut notamment la première hormone humaine créée par ce procédé en vue d'une utilisation future dans le traitement de quelques autres maladies. Ensuite, d'autres scientifiques mirent au point une insuline à action lente appelée NPH (Neutral Protamine Hagedorn) et firent de nombreux efforts pour améliorer les procédés de purification. Plusieurs progrès de la génétique ont aussi amélioré les propriétés des préparations injectables d'insuline humaine [1].

II- Définition de l'insuline

Hormone hypoglycémiante (abaisse la glycémie, favorise les processus anaboliques et diminue les processus cataboliques, intensifie le transport du glucose à l'intérieur des cellules et favorise la pénétration intracellulaire du potassium) [16].

III- Structure de l'insuline humaine

Elle est constituée de **2 sous unités** reliées par **2 ponts disulfures** interchaînes : une chaîne **A** (21 AA) et une chaîne **B** (30 AA).

Il y a également un **pont disulfure intrachaîne** dans la chaîne A [15].

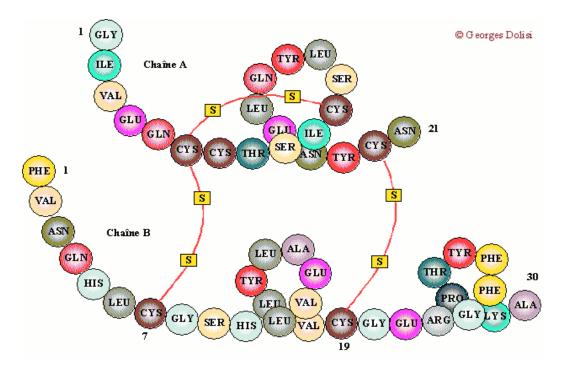


Figure 1 : Structure de l'insuline humaine selon DOLISI [15]

IV- Propriétés physicochimiques

Poudre blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, dans l'éthanol et dans l'éther. L'insuline humaine se dissout dans les

acides minéraux dilués et, avec décomposition, dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins. Sa masse moléculaire est de 5808 et son point de fusion est 81° C et sa formule chimique est $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_{56}$ [33].

V- Caractères organoleptiques

Insuline rapide ou insuline soluble:

Liquide incolore, non opalescent, exempt de substances étrangères ; des traces de sédiments très fins peuvent se déposer durant la conservation [33].

<u>Insuline mixte ou insuline-isophane biphasique et insuline lente ou insuline isophane :</u>

Suspension blanche qui, au repos présente un sédiment blanc et un surnageant incolore, le sédiment est remis en suspension par agitation modérée [33].

VI- Sécrétion de l'insuline

L'insuline est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas sous la forme d'une pré-pro-insuline constituée d'une seule chaîne peptidique, dont deux fragments, le peptide signal (23AA N-ter) est éliminé (on a la création des trois ponts disulfure), on obtient la pro-insuline qui subira l'élimination du peptide C pour devenir l'insuline (forme active). La proinsuline a une structure très voisine de celle des deux principaux facteurs de croissance, IGF-1 et IGF-2, et des concentrations élevées de ces hormones lors des tumeurs provoquent des hypoglycémies. L'insuline circule dans le sang à des concentrations de l'ordre du nanomole par litre [37].

VII- Présentation des insulines

Les insulines peuvent être classées selon leur origine ou leur action pharmacocinétique [6].

VII-1- Classification selon leur origine

VII-1-1- Insulines animales

Ce sont des insulines cristallisées obtenues par extraction à partir de pancréas de bœuf ou de porc par la méthode de Scott et la méthode de Collip.[6].

Le tableau V ci-dessous regroupe les différences dans les séquences des acides aminés des insulines humaines, porcine, bovine.

<u>Tableau V</u>: Différences dans les séquences des acides animés des insulines humaine, porcine et bovine [6]

Origine de l'insuline	Position chaine A A8	Position chaine A A10	Position chaine B
Humaine	Thréonine	Isoleucine	Thréonine
Porcine	thréonine	Isoleucine	Alanine
Bovine	Alanine	Valine	Alanine

VII-1-1 Immunogénicité des insulines animales

Les insulines cristallisées de bœuf ou de porc, sont efficaces chez l'homme, mais peuvent entrainer des phénomènes d'immunisation, responsables d'allergie et d'insulinoresistance [6].

L'amélioration des techniques de purification a grandement contribué à diminuer l'immunogénicité des insulines animales (insulines hautement purifiées). On a alors obtenu des insulines monopic ou monocomposées (MC ou "single peak").

Deux méthodes de purification sont utilisées : la chromatographie sur résines échangeuses d'ions et la chromatographie par gel de filtration.

Mais les taux d'anticorps anti-insuline animales restent à un taux supérieur comparé aux insulines humaines purifiées [6].

VII-1-2- <u>Insulines humaines</u>

Elles représentent exactement la séquence peptidique de l'insuline de l'homme.

Quatre techniques théoriques de production des insulines humaines ont été développées :

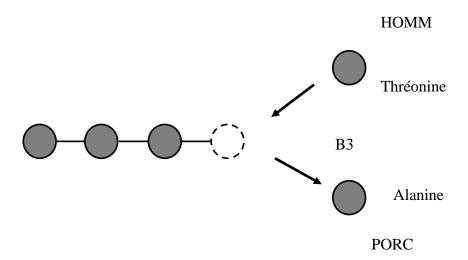
- extraction d'insuline à partir du pancréas humain ;
- synthèse chimique totale d'insuline in vitro ;
- hémisynthèse par substitution enzymatique ;
- biosynthèse par génie génétique [6].

Seules les deux dernières méthodes sont actuellement utilisées.

VII-1-2-1- <u>Hémisynthèse de l'insuline humaine par substitution</u> enzymatique

L'insuline de porc diffère de l'insuline humaine par un seul acide aminé terminal de la chaine B (alanine B30) [6].

L'hémisynthèse à partir de l'insuline porcine, consiste en une substitution enzymatique de l'alanine par la thréonine (figure 2) [6].



<u>Figure 2</u>: Hémisynthèse de l'insuline humaine à partir de l'insuline porcine [6]

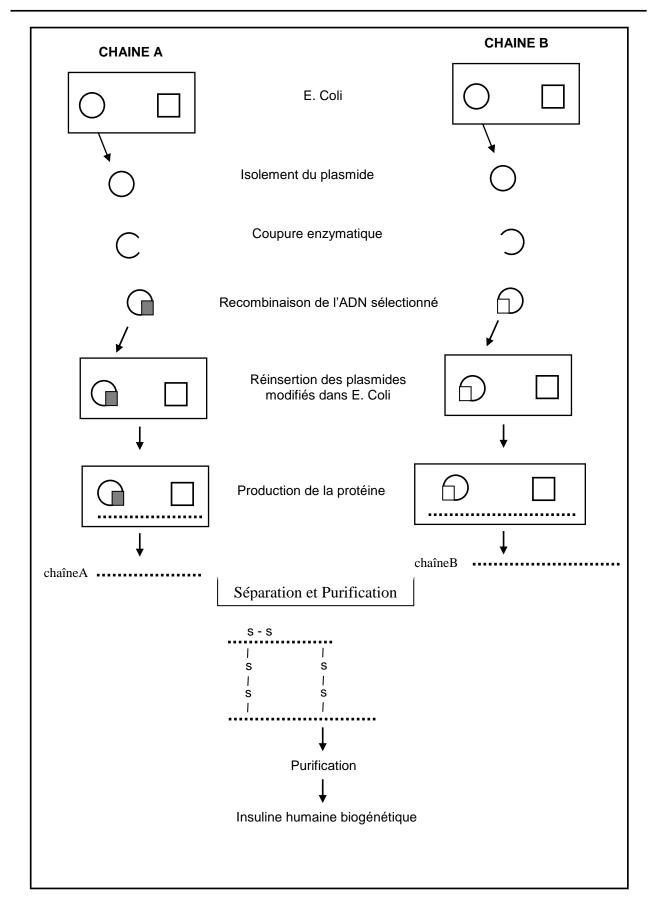
VI-1-2-2 Biosynthése de l'insuline humaine par génie génétique

Le principe de la biosynthèse repose sur la multiplication de bactéries non pathogènes (*Escherichia coli* Souche k 12). L'acide désoxy-ribonucléique (ADN) qui commande la production chaine A et B d'insuline est inséré à l'intérieur du matériel génétique de la bactérie. Ces chaines produites sont ensuite réunies par une méthode chimique [6].

Schématiquement, les différentes étapes de cette synthèse peuvent être résumées de la façon suivante (figure 3) :

- ❖ des souches *d'Escherichia coli* susceptibles d'héberger des anneaux d'ADN ou plasmides sont sélectionnées et leurs plasmides isolés ;
- ❖ ces plasmides font l'objet d'une coupure enzymatique, et l'on y insère un fragment d'ADN préalablement synthétisé et codant pour la production des chaînes insuliniques A et B;
- ❖ les plasmides ainsi reconstitués, sont réintroduits dans les cellules hôtes qui vont désormais avoir pour seule activité la synthèse de chaîne B;
- ❖ les chaînes A et B produites séparément sont ensuite liées par des ponts disulfures, pour obtenir une molécule d'insuline rigoureusement identique à l'insuline humaine pancréatique, et dont le conditionnement est précédé d'une étape de purification [6].

Les mêmes étapes sont retrouvées lors de la biosynthèse dans la levure (*Saccharomyces cerevisae*) qui permet d'obtenir une pureté insulinique de plus de 99,5% contre 97,5% pour la biosynthèse dans *Escherichia coli* [6].



<u>Figure</u> 3: Biosynthèse de l'insuline humaine par la technique de l'ADN recombiné [6]

VII-1-2-3- Avantages et inconvénients des insulines humaines

> Avantages

Les insulines humaines, chez l'homme normal et chez le diabétique possèdent, une activité pharmacocinétique et biologique identique à celle de l'insuline porcine purifiée bien qu'il ait été rapporté par exemple une diffusion plus rapide mais sans incidence pratique [6].

Leur emploi au long cours ne semble pas montrer de modification des besoins ou des profils insuliniques. Par contre, les taux d'anticorps anti-insulinique sont plus faibles qu'avec une insuline porcine, sans toutefois disparaitre complètement. Les cas d'allergie rapportés sont également rares [6]. Une production à l'échelle industrielle des préparations injectables d'insulines humaines disponibles pour tous les diabétiques.

> Inconvénients

- La stabilité

L'insuline humaine n'est pas une entité chimique stable et les modifications de sa structure affectent la molécule pendant la manipulation, le stockage prolongé et l'utilisation. Certains produits de décomposition de l'insuline réduiraient l'activité biologique et produiraient des effets secondaires immunologiques [2].

- L'absorption trop lente des insulines humaines

Les préparations d'insuline humaine à action brève doivent être injectées 30 minutes avant les repas pour respecter le délai d'absorption afin d'éviter une hyperglycémie postprandiale. Ce délai d'injection avant la prise du repas est une contrainte rarement respectée [2].

-La présence d'un pic plasmatique d'insulinémie des insulines intermédiaires et prolongées.

Ce qui expose les patients à un risque d'hypoglycémie, en particulier nocturne lorsqu'il est administré le soir suivi le matin d'hyperglycémies à jeun.

-Une variabilité trop importante inter- mais surtout intra-individuelle Elle dépend de la préparation injectable d'insuline et des conditions d'injection qui sont la profondeur, le site anatomique, le flux sanguin cutané et le délai avant le retrait de la seringue.

Les conséquences sont d'une part une diminution de la qualité de vie du patient et d'autre part une moins bonne observance du traitement [2].

L'avènement des analogues de l'insuline humaine a contribué également à la diminution de l'immunogénicité des insulines [6].Ce sont :

- ➤ Analogues d'action rapide monophasiques:
- -Humalog® (Lispro)
- -Novo-Rapid® (Aspart)
 - Analogues d'action rapide biphasiques (associées à la protamine et au zinc):
- -Humalog® Mix 25
- -Humalog® Mix 50
- -Novo Mix 30
 - Analogues d'action prolongée
- -Lantus® (Glargine)
- -Levenir® (Detemir)

VII-2- Classification pharmacocinétique

La classification pharmacologique des insulines les distingue en insulines lentes, intermédiaires et rapides. Cette distinction est basée sur leur profil d'action lors d'une injection sous-cutanée.

Cependant, il faut rappeler que l'action des insulines en fonction du temps peut varier d'un sujet à l'autre ou d'une fois sur l'autre chez un même individu. Elle dépend du site d'injection, de la vascularisation, de la température et de l'activité physique [6].

VIII- Mode d'action

L'insuline:

- abaisse la glycémie, favorise le processus anabolique et diminue les processus cataboliques ;
- intensifie le transport du glucose à l'intérieur des cellules ;
- inhibe la glycogénolyse et la néoglucogenèse ;
- augmente la lipogenèse au niveau du foie et du tissu adipeux et inhibe la lipolyse;
- favorise le transport des acides aminés à l'intérieur des cellules et favorise la synthèse des protéines ;
- favorise la pénétration intracellulaire du potassium [14].

IX- Pharmacodynamie

L'effet hypoglycémiant de l'insuline est du à la liaison de l'insuline aux récepteurs des cellules musculaires et adipeuses facilitant ainsi l'assimilation du glucose et à l'inhibition simultanée de la production hépatique de glucose.

- Insuline d'action rapide commence à agir dans les 30 minutes qui suivent l'injection, son effet est maximum et apparait de 1,5 à 3,5 heures après injection et sa durée d'action est environ 7 heures;
- Insuline d'action mixte, il agit dans les 30 minutes après l'injection, son effet maximal apparaît après 2 à 8 heures. Sa durée d'action peut atteindre 24 heures;
- Insuline d'action lente, commence à agir 1 heure et demi après injection, son effet maximum apparaît en 4 à 12 heures et sa durée d'action est d'environ 24 heures [14].

X- Propriétés pharmacocinétiques

X-1- Répartition

Aucune forte liaison aux protéines à l'exception d'éventuels anticorps anti-insuline présents dans la circulation, n'a été observée [14].

X-2- Métabolisation

L'insuline humaine est dégradée par une insuline protéase ou par des enzymes de dégradation de l'insuline. Elle se fait par clivage de l'insuline humaine en dimères d'insuline et en A21 desamido insuline.

Aucun métabolite formé après clivage n'est actif [14].

X-3- Elimination

L'insuline rapide a un temps de demi-vie terminale de 2 à 5 heures. L'insuline retard et lente ont un temps de demi-vie terminale est 5 à 12 heures. L'élimination est rénale [14].

XI- Aspects thérapeutiques

XI-1- Indications de l'insuline

L'insulinothérapie représente le seul traitement médicamenteux des diabétiques de type 1.

Il est également utilisé dans le coma hyperglycémique et acidocétosique.

Il est utilisé en substitution aux hypoglycémiants oraux chez la femme enceinte [14].

XI-2- Contre - indications

- Hypersensible à la substance active et/ou à l'un des excipients (glycérol, acide chlorhydrique, hydroxyde de sodium).
- Sujet obèse ; hypoglycémie [14].

XI-3- Effets secondaires

- Hypokaliémie;
- Hypoglycémie, hyperglycémie et acidocétose;
- Allergie à l'insuline, Lipodystrophie aux points d'injection [14].

XI-4- Posologie

L'insuline est dosée en unités. Le nombre d'unités et le moment d'administration sont ajustés pour chaque patient, selon la stabilité de sa maladie, ses habitudes de vie, son activité physique habituelle et son alimentation. La plupart du temps, l'on arrive à stabiliser la glycémie avec une injection quotidienne d'insuline. Parfois, il apparait nécessaire que l'administration se fasse en deux voire plusieurs fois, ou alors d'avoir recours à l'utilisation d'une association d'insuline, de durée d'action différente. La posologie initiale est de 0,5 à 1 UI/kg/jour [14].

XI-5-Voie d'administration

• Insuline rapide : Voie sous-cutanée

Voie intra veineuse

• Insuline mixte : Voie sous-cutanée ;

• Insuline lente : Voie sous-cutanée [14].

XI-6- <u>Interactions médicamenteuses</u>

- hyperglycémie (glucocorticoïdes, contraceptifs oraux, diurétiques etc.);
- hypoglycémie (bêta bloquants, éthanol, salicylates etc. ...) [14]

XI-7- Précautions d'emploi

- En cas de problèmes rénaux ou hépatiques : Il faut réduire la dose d'insuline ;
- En cas de maladie (infection, fièvre, vomissements) : les besoins en insuline peuvent augmenter;
- La prise d'alcool peut causer des hypoglycémies ;
- En cas d'augmentation de l'exercice physique ; les besoins en insuline diminuent d'où la nécessité d'adapter la dose [14].

XII- Conservation

L'insuline humaine doit être conservée entre +2° et +8°C dans les conditionnements primaires et secondaires d'origine.

Il ne faut ni congeler, ni exposer à la chaleur excessive ou au soleil.

Après une première utilisation, les flacons peuvent être conservés à une

température ne dépassant pas + 10°C pour une durée inférieure à 30 jours [14].

XIII-Production de préparations injectables d'insuline

XIII-1- <u>Définition des préparations injectables d'insuline</u>

Ce sont des préparations stériles d'insuline humaine ou d'insuline animale. Elles se présentent sous la forme de solutions ou de suspensions, ou sont préparées en combinant solutions ou suspensions [33].

XIII-2- Méthode de préparation

Selon la méthode de préparation utilisée, les opérations suivantes sont effectuées dans un ordre approprié :

- ajout de conservateurs antimicrobiens appropriés ;

- ajout d'une ou plusieurs substances appropriées pour rendre la préparation isotonique au sang ;
- ajout d'une ou plusieurs substances appropriées pour l'ajustement du pH à la valeur voulue;
- stérilisation par filtration des (du) composants contenant l'insuline; une fois cette opération effectuée, toutes les opérations ultérieures sont réalisées dans des conditions d'asepsie en utilisant du matériel stérilisé par une méthode appropriée [33].

XIII-3- Stabilité

Dans les préparations pharmaceutiques, l'insuline est sujette à des modifications chimiques et physiques. Un certain nombre de facteurs tels que le pH, l'état physique, les agents bactériostatiques, la présence de substances isotoniques, les agents stabilisateurs, la protamine et les ions zinc dans les formulations pharmaceutiques affectent la stabilité.

Les dégradations chimiques et physiques se produisent même dans les conditions optimales, résultant en la formation d'agrégats insolubles pendant le stockage et l'utilisation [3].

XIV- <u>Différentes méthodes de recherche et de dosage de l'insuline</u> humaine

XIV-1-Identification et essai

XIV-1-1- <u>Détermination du pH</u>

Le pH de la solution ou de la suspension est de 6,9 à 7,8 [33].

XIV-1-2- <u>Rechercher les impuretés de masse molaire</u> supérieure à celle de l'insuline

- le système pour la recherche est constitué d'un chromatographe liquide et d'un détecteur : le spectrophotomètre UV réglé à 276 nm ;

- la phase stationnaire est de type C18 (30 x 7, 5mm), remplie de gel de silice hydrophile (5 10 μ m);
- la phase mobile, est un mélange d'acide acétique glacial, d'acétonitrile et d'une solution d'arginine à 1g/l dans les proportions (15, 20,65, v/v/v) à un débit de 0,5 ml/min [33].

XIV-1-3- Dosage du zinc total

Déterminer la teneur en zinc total par spectrométrie d'absorption atomique avec une absorbance de 213,9 nm en utilisant une lampe à cathode en creuse au zinc comme source de rayonnement et une flamme air-acétylène de composition appropriée.

Pour l'insuline rapide, lente et intermédiaire, la teneur en zinc total ne doit pas être supérieure à 40 μg/ml pour 100 UI d'insuline [33].

XIV-1-4-Détermination de la teneur en endotoxines bactériennes

La teneur en endotoxines doit être inferieure à 80 UI/ml pour 100 UI d'insuline [33].

XIV-2- Méthode de dosage de l'insuline humaine

Il existe 3 types principaux méthodes de dosage de l'insuline : les bioessais, les immunodosages et les méthodes chromatographiques [3].

XIV-2-1- <u>Les bio-essais</u>.

Les bio-essais ne sont plus utilisés, ils étaient employés pour la standardisation des préparations pharmaceutiques et pour la production de standards [3].

XIV-2-2- Les immunodosages

Les dosages immunométriques ont abaissé la limite de détection et amélioré la reproductibilité, ce qui facilite la détermination de l'insulinémie à jeun et l'étude de la pulsatilité de la sécrétion basale. Les phases solides et les marquages des anticorps (radioactifs, enzymatiques, fluorescents ou chimiluminescents) sont très variables : IRMA (*immuno-radiometric assay*), IEMA (*immuno-enzymometric assay*), IFMA (*immuno-fluorimetric assay*) et ICMA (*immuno-hemiluminometric assay*, un dosage IECMA (*immuno-electrochemiluminometric assay*; Elecsys) [3].

XIV-2-2-1 <u>Bi-insulin IRMA</u>

- Principe

Bi-insulin IRMA est une trousse destinée au dosage de l'insuline sérique. Il s'agit d'une technique radio-immunométrique (technique sandwich). Elle utilise un couple d'anticorps monoclonaux anti-insuline : le premier anticorps monoclonal est adsorbé sur les parois du tube ; le second anticorps monoclonal est marqué à l'iode 125 [3].

XIV-2-2-2 Insuline Elecsys

- Principe

Le test insuline Elecsys est une trousse destinée au dosage de l'insuline sérique. Il s'agit d'une technique immunométrique (technique sandwich). La détection s'effectue par électrochimiluminescence (ECLIA, Electrochemiluminescence Immunoassay). Le dosage a été effectué sur analyseur Elecsys 2010. Il utilise un couple d'anticorps monoclonaux anti insuline : le premier anticorps monoclonal est marqué à la biotine ; le second anticorps monoclonal est marqué au ruthénium. Lors du dosage, l'anticorps marqué à la biotine se fixe à la phase solide (microparticules tapissées de streptavidine) par l'intermédiaire d'une liaison streptavidine-biotine [3].

XIV-2-2-3 Anti-insulin RIA

-Principe

Le principe de détection des anticorps anti-insuline repose sur la mise en évidence d'une liaison spécifique avec de l'insuline marquée à l'iode 125. Les anticorps anti-insuline libres correspondent aux anticorps non complexés à l'insuline circulante. Ils sont dosés selon une technique de radio-immunoprécipitation en phase liquide [3].

XIV-3 Méthodes chromatographiques

La chromatographie liquide est couramment utilisée pour le dosage de l'insuline humaine dans différentes matrices (pharmaceutiques ou liquides biologiques).

Les méthodes décrites font état de l'utilisation de détecteur UV.

- 1. **MOSLEMI et coll.** pour le dosage de l'insuline humaine ont utilisée une phase stationnaire en C18 (300 x 3,9) mm, 10μm et une phase mobile constituée d'un mélange d'une solution hydroxyde de tetrametylammonium dans de l'eau et d'acetonitrile (70:30 ; v/v) [30].
- 2. **HOYER et coll.**, ont utilisé une phase stationnaire en C18 (25 x 0,46 cm), 5μm et une phase mobile qui est un mélange de 0,05 M d'acide orthophosphorique de potassium KH₂PO₄ (pH 2,4) et de cyanure de méthane CH₃CN (75:25, v/v) [21].
- 3. **YILMAZ B. et coll.,** ont utilisé une phase stationnaire en C18 (250 x 4,6 mm), 5μm et une phase mobile constituée d'un mélange d'acétonitrile et de 0,2 M d'une solution de sulfate de sodium (25:75, v/v) [38].

4. D'autres auteurs ont utilisé ce système pour la détermination de la concentration de l'insuline humaine dans les milieux biologiques.

C'est le cas de **KHAKSA et coll** qui ont utilisé dans leurs travaux, une phase stationnaire en C18 et une phase mobile qui est constituée d'un mélange de 74 volumes de 0,2M de sulfate de sodium anhydre ajusté à pH 2,3 avec de l'acide chlorhydrique et de 26 volumes d'acétonitrile [3].

XV- L'insulinothérapie

L'insulinothérapie est le traitement de choix du diabète de type 1. Mais la mise sous insuline n'est pas recommandée lors de la découverte d'un diabète de type 2 tant chez le sujet avec surpoids que chez le sujet de poids normal. Chez les diabétiques de type 2, l'insulinothérapie doit être entreprise en urgence devant les complications graves du diabète [24].

XV-1 Principales insulines disponibles en Côte d'Ivoire

<u>Tableau VI</u>: Insulines disponibles en Cote d'Ivoire durant la période d'étude

TYPE D'INSULINE	NOMS COMMERCIAUX
RAPIDES	ACTRAPID [®] UMULINE RAPIDE [®]
	INSULET RAPIDE®
INTERMEDIAIRE	UMULINE® INSULATARD® MIXTARD® INSULET MIX 30® HUMALOG®
LENTES	INSULET NPH®

LANTUS [®]

XV-2 Adaptation des doses d'insuline

L'adaptation des doses d'insuline repose sur des objectifs glycémiques et glycosuriques. L'adaptation régulière exécutée par le patient lui-même de ses doses d'insuline en fonction de ses résultats de la glycémie, de son alimentation et de ses dépenses physiques, représente la condition première d'un bon équilibre.

La qualité de cette adaptation thérapeutique repose sur l'éducation du patient et sur le suivie du cahier de surveillance [22].

XV-3- <u>Insulinothérapie du diabète de type 1</u>

Plusieurs schémas d'insulinothérapie peuvent être proposés en tenant compte de l'âge, de la coopération du patient et de son activité professionnelle [7]. Les plus habituels sont les suivants :

➤ Insulinothérapie conventionnelle discontinue, par voie sous-cutanée au moment des repas

Elle concerne l'administration d'insuline à l'aide de seringue avec une aiguille ou du stylo. L'insuline injectée dans le tissu sous-cutanée forme un dépôt ou réservoir à partir du quelle elle est absorbée [3].

- Une injection par jour le matin d'une insuline lente [7].
- Deux injections par jour le matin et le soir d'une insuline semi lente ou d'un mélange, fixe ou extemporané, d'insuline rapide et d'insuline semi lente.

- Trois injections par jour : le matin et le midi d'une insuline rapide, et le soir d'une insuline semi lente ou d'un mélange, fixe ou extemporané, d'insuline rapide et d'insuline semi lente.
- Quatre injections par jour le matin, le midi et le soir d'une insuline rapide, et à 22 heures d'une insuline lente [7].

L'insuline rapide utilisée dans les précédents schémas peut être remplacée par un analogue de l'insuline de pharmacocinétique plus physiologique (délai d'action plus court, pic plus précoce, plus intense, durée d'action plus brève) [7].

Insulinothérapie continue par voie sous-cutanée: « pompe à insuline »

Son objectif est de simuler la sécrétion pancréatique par perfusion continue de l'insuline dans le tissu sous-cutanée [3].

- Utilisation exclusive d'insuline d'action rapide.
- Débit basal continu et bolus au moment des repas principaux [7]

Remarque : en pratique clinique, on débute le traitement par l'insuline rapide (ordinaire), soit en sous-cutané, soit par la pompe. Le relais par les autres types se fait dans un second temps [7].

L'insulinothérapie idéale pour un diabétique sera celle qui apporte un contrôle glycémique idéal, ne cause jamais d'hypoglycémie et d'hyperglycémie [7].

XV-4- Insulinothérapie du diabète de type 2

Pour le diabétique de type 2, l'insulinothérapie est le dernier recours thérapeutique en cas d'échec des moyens diététiques associées au traitement oral maximum [9].

Elle est également indiquée en cas de contre-indication au traitement oral, de complication viscérale et d'intervention chirurgicale [9].

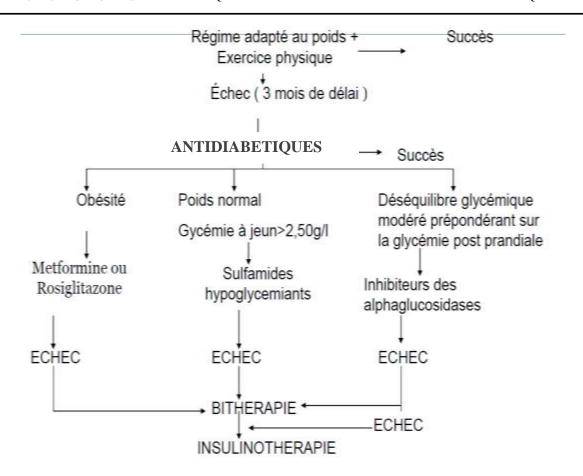


Figure 4: Algorithme thérapeutique du diabète de type 2 [27]

DEUXIEME PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I: CADRE DE L' ETUDE MATERIEL ET

METHODES

CADRE DE L'ETUDE

L'étude s'est déroulée de juillet 2009 à septembre 2010. Elle a été initiée par le département de Chimie Analytique, Bromatologie, Chimie Minérale et Générale de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Cocody en collaboration avec le Laboratoire de Nutrition de l'Institut National de Santé Publique (INSP) où les analyses ont été réalisées.

L'INSP demeure le centre national de référence de la prise en charge du diabète en Côte D'Ivoire par le biais du Centre Anti Diabétique d'Abidjan.

I- MATERIEL

I-1-Echantillons

L'étude a porté sur les trois types de médicaments à base d'insuline humaine disponibles à l'INSP. Elle a concerné les médicaments dosés à 100 UI/ml d'insuline humaine sous forme de suspension injectable (type rapide, mixte ou intermédiaire et lente).

Pour chaque type d'insuline, nous avons retenu le même lot de fabrication.

Au total, 10 échantillons d'insuline rapide, 10 échantillons d'insuline mixte et 10 échantillons d'insuline lente ont été analysés, soit un total de 30 échantillons d'insuline humaine.

<u>Tableau VII</u>: Présentation des échantillons.

Désignation du Type d'insuline	Numéro de lot	Date de péremption	Nombre d'échantillons
Rapide	09 1997	11 2011	10
Mixte	09 2221	12 2011	10
Lente	09 1997	11 2011	10

I-2- <u>Verrerie</u>

La verrerie de laboratoire suivante a été utilisée :

Béchers (50ml, 100ml, 11)

Erlenmeyers (250ml)

Fioles jaugées (10ml, 100ml, 250ml, 11)

Eprouvettes graduées et jaugées (1ml, 5ml)

Tubes à essai (5ml)

Microseringue pour chromatographie en verre de type HAMILTON (100μl)

I-3-Appareillage

❖ Balance de précision 1/10000 (METTLER TOLEDO PB 303-S)

- ❖ Chromatographe liquide de marque Schimadzu comprenant :
 - Une pompe (Shimadzu corporation, Model DGU-20A5)
 - Un injecteur automatique (Shimadzu corporation Model LC-20AT)
 - Un détecteur UV visible (Shimadzu corporation Model SPD 20 AT)
 - Un intégrateur (Shimadzu corporation Model CTO-20A)
- Un agitateur Vortex
- ❖ Un pH-mètre THERMO-ORION



Photographie 3: Chromatographe liquide à haute performance

I-4- Produit de référence et réactifs

I-4-1 Produit de référence

L'insuline humaine de référence a été fournie gracieusement par la Direction de la Pharmacie et du Médicament.

I-4-2 Réactifs

Les réactifs utilisés sont tous de qualité analytique :

- Acétonitrile pour chromatographie liquide
- Ethanolamine
- Acide phosphorique
- Sulfate de sodium anhydre
- Eau distillée
- Acide chlorhydrique 0,1N

> Préparation de la solution d'acide chlorhydrique 0,01N

Elle représente la solution de dilution.

- Dans une fiole jaugée de 100 ml, y introduire 10 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1N, puis ajouter de l'eau bi distillée jusqu'au trait de jauge ;
- Homogénéiser.

II- METHODES

II-1- Contrôle des caractères généraux

✓ Contrôle des caractères organoleptiques

Il consiste à observer la saveur, l'odeur, la forme ou l'aspect, la couleur, de la suspension d'insuline [33].

✓ Contrôle de l'étiquetage

Le contrôle de l'étiquetage consiste à analyser le conditionnement primaire et secondaire et la notice des échantillons de médicaments prélevés.

Les éléments recherchés sur les conditionnements sont :

La DCI en caractère apparent;

La composition qualitative et quantitative du principe actif;

Le mode d'administration;

La date limite d'utilisation;

Le nom et l'adresse du fabricant;

Le numéro de lot du fabricant;

La notice donne les renseignements suivants:

La voie d'administration;

La durée du traitement ;

Les indications:

La posologie;

Les contre indications;

Les effets secondaires.

L'insuline humaine appartenant à la liste II, les formes pharmaceutiques en contenant, doivent présenter sur leur étiquette un filet vert avec une contre-étiquette rouge sur laquelle il est inscrit : "RESPECTER LA DOSE PRESCRITE".

II-2-Mode de préparation des solutions de travail

II-2-1-Préparation de la phase mobile

Elle est constituée d'un mélange de 42 volumes du solvant A et de 58 volumes du solvant B à un pH 2,3.

- Solvant A (1000 ml)
- -Dans une fiole de 1000 ml, dissoudre 28,4 g de sulfate de sodium anhydre dans une certaine quantité d'eau distillée et puis compléter jusqu'au trait de jauge avec le même solvant ;
- Homogénéiser;
- -Ajouter 2,7 ml d'acide phosphorique et ajuster si nécessaire à pH 2,3 à l'aide d'éthanolamine ;
- Filtrer et dégazer.
 - Solvant B (1000 ml)
- -Mélanger 550 ml de solvant A et 450 ml d'acétonitrile ;
- Filtrer et dégazer.

II-2-2-Préparation de la solution mère de référence

Peser 35 mg d'insuline humaine à dissoudre dans l'acide chlorhydrique 0,01N contenu dans une fiole jaugée de 10 ml, puis compléter jusqu'au trait de jauge. La solution mère obtenue a une concentration en insuline humaine à 3,5 mg/ml.

II-2-3-Préparation des solutions de référence diluées

Les solutions de référence diluées sont obtenues par dilution extemporanée de la solution de référence mère à 3,5 mg/ml (3500 μ g/ml) avec la solution d'acide chlorhydrique à 0,01N. Les concentrations de ces solutions sont comprises entre 0,35 μ g/ml et 175 μ g/ml.

II-3- Mise au point de la méthode

La méthode développée a été guidée par celle rapportée par la Pharmacopée européenne, 6^{éme} édition. Le but étant d'obtenir les conditions adaptées à l'analyse de l'insuline humaine dans les formes pharmaceutiques, la mise au point a porté essentiellement sur le choix de la composition de la phase mobile.

II-3-1- Traitement des échantillons

Prélever 1 ml de chaque type d'échantillon (rapide, mixte et lent), l'introduire dans une fiole jaugée de 10 ml puis ajouter 9 ml d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,01N. Une dilution au 1/1000ème de cette solution, obtenue par la solution d'acide chlorhydrique 0,01N est ensuite préparée.

II-3-2- Conditions de l'analyse chromatographique

La mise au point des conditions de l'analyse chromatographique a été guidée par la méthode rapportée par la pharmacopée européenne [33].

a) La longueur d'onde

La longueur d'onde de détection se situe dans le domaine de l'ultra-violet à 214 nm [33]. Des essais ont été réalisés aux longueurs d'onde de 214 nm et 254 nm.

b) La phase stationnaire

La phase stationnaire retenue dans la méthode décrite dans la pharmacopée européenne est de type octadécylsylanisée (C 18), contenue dans une colonne dont les dimensions sont les suivantes : (25 ×4,6 mm), 5 μ m [33].

c) Le débit

Le débit retenu tiré de la méthode rapportée dans la pharmacopée européenne était de 1ml/mn [33].

d) La phase mobile

A partir de la composition de la phase mobile retenue dans la méthode de la pharmacopée européenne (Essai 1), d'autres essais ont été réalisées en utilisant des mélanges de différentes proportions des solvants A et B [33].

- <u>Essai 1</u>: La phase mobile est constituée d'un mélange de 42 volumes du solvant A et de 58 volumes du solvant B, avec un pH 2,3 [33];
- Essai 2 : La phase mobile est constituée d'un mélange de 30 volumes du solvant A et de 70 volumes du solvant B, avec un pH 2,3.
- Essai 3 : La phase mobile est constituée d'un mélange de 20 volumes du solvant A et de 80 volumes du solvant B, avec un pH 2,3.

II-4- Procédure de validation

La validation d'une procédure se définit comme étant le processus par le quel l'on établit que les caractéristiques de la méthode correspondent à l'usage pour lequel elle est prévue [13].

Les critères de validation étudiés sont les suivants :

- la linéarité
- la précision
- l'exactitude
- Les limites de détection et de quantification

II-4-1-La linéarité

Définition

La linéarité est la capacité d'une méthode à fournir à l'intérieur d'un intervalle des résultats directement proportionnels à la concentration en substance à analyser dans l'échantillon [36]. L'étude de la linéarité de la méthode a été faite sur une gamme étalon obtenue par dilution extemporanée de la solution mère de référence. Six solutions de concentrations comprises entre 0,35 et 175 μg/ml ont été analysées.

Analyse des différentes solutions de la gamme étalon.

A partir des résultats obtenus, les paramètres suivants sont déterminés :

- > Coefficient de corrélation r
- ➤ Coefficient de détermination r²
- \triangleright L'équation de la droite de régression Y = aX + b

Y est la surface des pics chromatographiques (U.A.)

X est la concentration en insuline humaine (µg/ml).

II-4-2- La précision

II-4-2-1- <u>Définition</u>

La précision ou fidélité comprend la répétabilité et la reproductibilité. Elle traduit l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions précises.

La répétabilité exprime la fidélité sous des conditions identiques : même analyse, même équipement, même réactif, et dans des conditions aussi stables que possible sur un intervalle de temps court [36].

II-4-2-2- Répétabilité de l'analyse chromatographique d'une solution de référence d'insuline humaine

Une solution de référence diluée d'insuline humaine à deux niveaux de concentration 35 μ g/ml et 3,50 μ g/ml est analysée à 6 reprises puis les coefficients de variation (CV en pourcentage) sont ensuite calculés.

$$\sigma = \text{\'ecart type} \qquad \quad x = \text{moyenne}$$

II-4-2-3- Répétabilité de la procédure d'analyse

Six traitements différents d'un échantillon d'insuline humaine ont été réalisés. Chacune des solutions traitées a été analysée à trois reprises selon les conditions chromatographiques retenues. Le coefficient de variation est calculé sur l'ensemble des résultats obtenus.

II-4-2-4- Fidélité intermédiaire manipulateur

Un échantillon d'insuline humaine a été traité par trois manipulateurs différents le même jour. Les coefficients de variation ont été calculés.

II-4-2-5- Fidélité intermédiaire jour

Un échantillon d'insuline humaine a été traité sur trois jours successifs par le même manipulateur. Les coefficients de variation ont été calculés.

II-4-3- L'exactitude

Définition

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre une valeur exacte ou acceptée et la valeur (ou la moyenne des valeurs) obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois [36].

- Méthode des ajouts dosés

A un échantillon d'insuline humaine, des ajouts différents à deux niveaux de concentration (2,63; 3,50 mg/ml) ont été réalisées.

Ces échantillons avec et sans ajout ont été analysés à trois reprises.

Les pourcentages de récupération évaluant l'exactitude sont calculés.

II-4-4- Les limites de détection et de quantification

> La limite de détection

La limite de détection équivaut à la plus faible concentration d'insuline humaine objectivée, par une surface détectable mais non intégrable.

La limite de quantification

La limite de quantification correspond à la plus faible concentration objectivée par une surface de pic détectable et intégrable.

Les limites de détection et quantification ont été évaluées en effectuant différentes dilutions décroissantes de la solution mère de référence (3,50 mg/ml). Chacune des solutions de concentrations définies est analysée.

II-5- <u>Détermination de la quantité d'insuline humaine dans les différents</u> <u>types de médicaments prélevés</u>

Chaque échantillon d'insuline humaine est analysé à deux reprises dans les conditions fixées ci-dessus. Les moyennes et écart-types ont ensuite été déterminés. Les teneurs obtenues sont comparées à l'intervalle de conformité de 5% de valeurs normales.

CHAPITRE II: RESULTATS

I- Contrôle des caractères généraux

I-1- Contrôle des caractères organoleptiques

Tableau VIII : Caractères organoleptiques des échantillons

INSULINE	SAVEUR	ODEUR	ASPECT	COULEUR
RAPIDE	Insipide	Mentholé	Liquide limpide, claire	Incolore
MIXTE	Insipide	Mentholé	Liquide trouble, présence de cristaux en suspension, dépôt blanchâtre,	Blanche
LENTE	Insipide	Mentholé	Liquide plus trouble, présence de cristaux en suspension, dépôt blanchâtre	Blanche

Tous les échantillons ne présentent aucun signe de dégradation apparente.

I-2- Contrôle de l'étiquetage

Les résultats de l'analyse de l'étiquetage sont rapportés dans le tableau suivant :

<u>Tableau IX</u> : <u>Résultats du contrôle de l'étiquetage des</u>

échantillons

MEDICAMENT		Insuline humaine 100 UI/ml (3,50mg/ml)						
		Raj	oide	Mixt	Mixte		Lent	
			Cs	Ср	Cs	Ср	Cs	
DCI en c	aractère apparent	+	+	+	+	+	+	
Forme	pharmaceutique	+	+	+	+	+	+	
Composi	tion qualitative et							
quantita	ative du principe	+	+	+	+	+	+	
	actif							
Mode d	d'administration	+	+	+	+	+	+	
Date lim	ite d'utilisation	+	+	+	+	+	+	
Nom et ac	dresse du fabricant	+ +		+	+	+	+	
Numéro de lot de		+	+	+	+	+	+	
fa	fabrication		·	·	'	'	•	
	Voie	_	+	+		+		
	d'administration		Г	Т		'		
	Durée du		ı	+		+		
	traitement	+		+		+		
Notice	Posologie	+		+		+		
Notice	Indications	+		+		+		
	Contre							
	indications	-	+	+		+		
	Effets		1					
	indésirables	-	+	+		+		

Les échantillons d'insuline humaine qui ont fait l'objet de nos travaux, présentent effectivement sur les conditionnements primaires et secondaires, un filet vert avec une contre-étiquette rouge sur laquelle il est inscrit : "RESPECTER LA DOSE PRESCRITE". En dessous de la contre-étiquette, il est mentionné "Liste II", "uniquement sur ordonnance médicale".

Tous les trois types échantillons soumis à notre analyse sont conformes.

II- Mise au point de la méthode d'analyse par chromatographie liquide

II-1 Traitement de l'échantillon

Le traitement de l'insuline humaine ne comporte pas de phase d'extraction proprement dite. Il s'agit d'une opération de dilution des échantillons d'insuline humaine, dilution au 1/1000 eme par l'acide chlorhydrique 0,01N.

II-2- Conditions de l'analyse chromatographique

La longueur d'onde

Nous avons retenu la longueur d'onde de 254 nm.

Choix de la phase mobile

Les trois essais portant sur trois phases mobiles différentes ont donné les résultats suivants :

Le mélange du solvant A et du solvant B dans les proportions (42:58,V/V) a donné un temps de rétention de 18,085 mn.

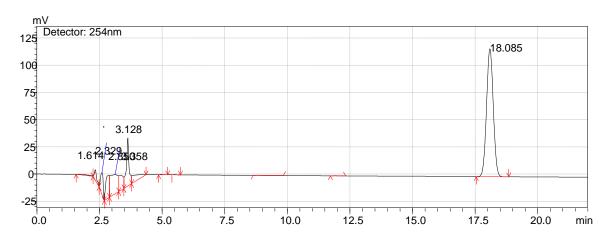


Figure 5 : Chromatogramme d'une solution de référence de l'insuline humaine à 3,5 μg/ml (conditions Essai 1).

La modification de la proportion du solvant B 70 volumes pour 30 volumes du solvant A de la phase mobile a réduit le temps de rétention ; qui passe à 14,512 mn.

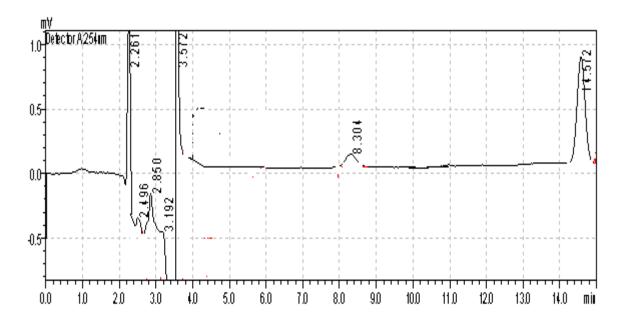


Figure 6: Chromatogramme d'une solution de référence d'insuline humaine à 3,5 μg/ml (conditions Essai 2).

Le mélange du solvant A et du solvant B dans les proportions (20 :80 ; v/v) a donné un temps de rétention plus amélioré qui est passé à 10,021 mn.

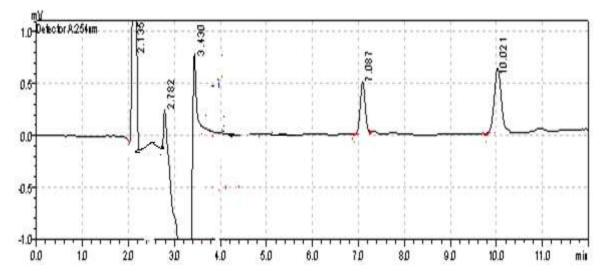


Figure 7: Chromatogramme d'une solution de référence de l'insuline humaine à 3,5μg/ml (conditions Essai 3).

Les paramètres analytiques fixés après les essais précédents sont les suivants:

- Phase stationnaire: octadécylsylanisée C 18, contenue dans une colonne dont les dimensions sont les suivantes: (25 ×4,60 mm), 5μm [33].
- Phase mobile composée de 20 volumes de solvant A et 80 volumes de solvant B
- ➤ Débit : 1ml/mn [33].
- Longueur d'onde de détection dans l'UV : 254 nm.

Le temps de rétention de l'insuline humaine est de 9,882 minutes.

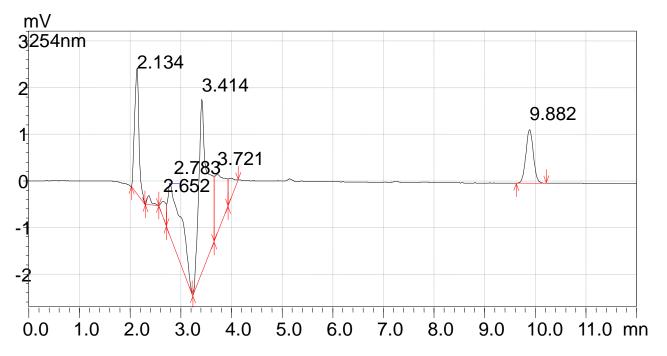


Figure 8 : Chromatogramme d'un échantillon d'insuline humaine de type rapide

III- Procédure de validation

III-1- Linéarité de la méthode

<u>Tableau X</u>: Gamme étalon de l'insuline humaine

Concentration (µg/ml)	Surfaces obtenues (U.A.)	Moyennes des surfaces (U.A.)
0,35	1087,1	1089,66
0,33	1099,6	
	1082,3	
1 75	5240,8	5198,87
1,75	5123,5	
	5232,3	
3,5	10507,6	10519,63
	10534,4	
	10516,9	
17,5	59380,1	59439,93
	59667,6	
	59272,2	
	114168,5	114195,13
35	114223,4	
	114193,5	
175	563340,2	563418,47
175	563446,9	
	563468,3	

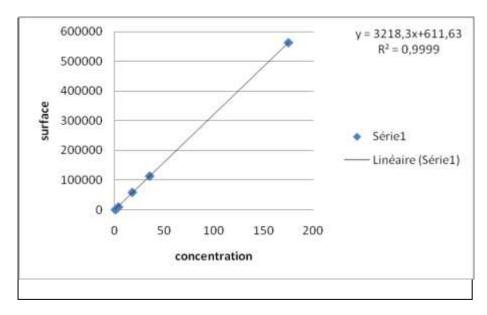


Figure 9: Droite d'étalonnage de l'insuline humaine

Les caractéristiques de la courbe de régression sont les suivantes :

- ❖ L'équation de la droite de régression est Surface(U.A) = 3218,3(concentration) + 611,63
- ❖ Le coefficient de détermination r² à une valeur de 0,9999 proche de 1.
- ❖ Le coefficient de corrélation r à une valeur de 0,9999

Il existe une relation de proportionnalité entre la surface et la concentration en insuline humaine définissant le domaine de linéarité de $0,35 \mu g/ml$ à $175 \mu g/ml$.

III-2- Précision de la méthode

III-2-1- Répétabilité de l'analyse chromatographique

Elle a porté sur la solution de référence de l'insuline humaine à deux niveaux de concentration $35~\mu g/ml$ et $3,50~\mu g/ml$. Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant :

<u>Tableau XI</u>: Répétabilité de l'analyse chromatographique des solutions de référence.

Concentration (µg/ml)	Surfaces (U.A.)	Concentration (µg/ml)	Moyennes (μg/ml)	Ecart- type	Coefficient de variation (%)
	113367	35,03	35,21	0,0088	0,025
	114028,2	35,24			
	114086,4	35,25			
35	114028,2	35,24			
	114091,4	35,26			
	114030,6	35,24			
	11554,6	3,40	3,40	0,0081	0,23
	11581,4	3,41			
	11589,9	3,41			
3,50	11534,9	3,39			
	11594,1	3,41			
	11562	3,40			

Les coefficients de variation obtenus sont satisfaisants puisqu'ils sont inférieurs à 2%, norme admise pour l'analyse quantitative des solutions de référence [13].

III-2-2- Répétabilité de la procédure d'analyse

Tableau XII: Répétabilité de la procédure d'analyse

Concentration	Concentration obtenue (µg/ml)							
(µg/ml)	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6		
	3,44	3,56	3,60	3,31	3,30	3,40		
3,50µg/ml	3,45	3,53	3,58	3,36	3,32	3,37		
	3,41	3,55	3,59	3,36	3,26	3,35		
Moyenne	3,43							
Moyenne générale (µg/ml)	3,45							
Ecart-type	0,14							
CV (en %)		4,06						

Le coefficient de variation de la procédure est de 4,06 % inférieure à la norme de 5 % donc il est conforme.

III-2-3- Fidélité intermédiaire manipulateur

Les résultats de l'essai de fidélité intermédiaire manipulateur sont satisfaisants car avec une valeur moyenne de 3,29 mg/ml et un écart-type de 0,13, le coefficient de variation calculé est de 3,95 %, inférieur à la norme de 5%.

<u>Tableau XIII</u>: Test de fidélité intermédiaire manipulateur

	Surface (UA)	Concentration (mg/ml)
	11661,23	3,43
	12025,06	3,55
Manipulateur 1	12160,9	3,57
	11322	3,33
	11040,6	3,24
	11467,97	3,37
Moyenne manipulateur 1	11612,96	3,37
	11086,87	3,25
Manipulateur 2	10753,7	3,15
	10964,3	3,22
	10590,7	3,10
	10402,3	3,04
	10431,7	3,05
Moyenne manipulateur 2	10704,93	3,14
	11953,5	3,52
	11252,2	3,31
Manipulateur 3	12534,7	3,70
-	10784,3	3,16
	10688,4	3,13
	11082,4	3,25
Moyenne manipulateur 3	11382,58	3,35
Concentration moyenne man	3,29	
Ecart-type	0,13	
Coefficient de variation (3,95	

III-2-4- Fidélité intermédiaire jour

Les résultats de l'essai de fidélité intermédiaire jour sont satisfaisants car avec une valeur moyenne de 3,37 mg/ml et un écart-type de 0,15, le coefficient de variation calculé est de 4,45 inférieur à la norme de 5 %.

Tableau XIV: Test de fidélité intermédiaire jour

	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Concentration moyenne jour (mg/ml)
Tour 1	3,44	3,56	3,60	3,52
Jour 1	3,45	3,52	3,58	
	3,41	3,55	3,58	
Moyenne jour 1	3,42	3,54	3,58	
	3,30	3,31	3,09	
Jour 2	3,17	3,31	3,06	3,23
	3,26	3,36	3,23	
Moyenne jour 2	3,24	3,33	3,13	
	3,40	3,38	3,31	
Jour 3	3,44	3,40	3,30	3,36
	3,40	3,40	3,23	
Moyenne jour 3	3,41	3,40	3,28	
Mo	3,37			
	0,15			
Coeff	4,45%			

III-3- Exactitude de la méthode

Les résultats de l'essai de l'exactitude sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau XV: Résultats de l'essai de l'exactitude de la méthode

Quantité ajouté (mg/ml)	Quantité retrouvée (mg/ml)	Pourcentage de récupération (%)	Erreur relative (%)	Pourcentage moyen de récupération (%)	Erreur relative moyen (%)
	2,04	77,57	-22,43		
2,63	2,16	82,13	-17,87	81,88	-18,12
	2,26	85,93	-14,07		
	3,86	110,29	10,29	04.06	~ 1.4
3,5	3,06	87,43	12,57	94,86	-5,14
	3,04	86,86	13,14		

Le pourcentage moyen obtenu est 88,37 % avec une erreur relative moyenne de 11,63 %. Ce pourcentage moyen est légèrement inférieur à la limite inférieure de la valeur admise en analyse, dont l'intervalle est compris entre 90 et 110 %.

III-4- Limites de détection et de quantification

Les résultats de l'analyse des différentes décroissantes dilutions de la solution mère de références sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

<u>Tableau XVI</u>: Limites de détection et de quantification de l'insuline humaine

Concentrations (µg /ml)	Surfaces
35	114195,13
17,5	59439,93
3,5	10519,63
1,75	5198,87
0,35	1089,67
0,175	566,9
0,0875	294,6
0,07	260,3
0,05833	
Limite de détection	0,05833 μg/ml
Limite de quantification	0,07μg/ml

NB: ----: pic non intégré, c'est-à-dire absence de surface.

Les résultats indiquent une limite de détection évaluée à $0,05833~\mu g/ml$ et une limite de quantification évaluée à $0,07~\mu g/ml$.

IV- <u>Application de la méthode</u>: <u>Détermination de la teneur en</u> insuline humaine des échantillons

Les résultats de l'application sont rapportés dans les tableaux XVII, XVIII, XIX suivants.

IV-1 Analyse des médicaments à base d'insuline humaine rapide

<u>Tableau XVII</u>: Résultats de l'analyse des médicaments à base d'insuline humaine rapide

N° Echantillon	Concentration obtenue (mg/ml)	Moyenne (mg/ml)	Concentration en insuline humaine (UI/ml)
1	2,63 2,64	2,64	71,35
2	2,63 2,61	2,62	70,81
3	2,71 2,71	2,71	73,24
4	2,86 2,87	2,87	77,57
5	3,21 3,22	3,22	87,03
6	2,87 2,87	2,87	77,57
7	2,71 2,69	2,70	72,97
8	3,22 3,22	3,22	87,02
9	2,67 2,70	2,69	72,70
10	2,81 2,83	2,82	76,21
Moyenne générale		2,84	81,84
Ecart type		0,22	5,96
Intervalle de conformité		[3,30-3,64]	[95-105]

IV-2 Analyse des médicaments à base d'insuline humaine mixte

<u>Tableau XVIII</u>: Résultat de l'analyse des médicaments à base d'insuline humaine mixte

N° Echantillon	Concentration obtenue (mg/ml)	Moyenne (mg/ml)	Concentration en insuline humaine (UI/ml)
1	2,05	2,06	55,67
-	2,07	1.05	7 0.00
2	1,86	1,85	50,00
	1,85	1 =0	1.5 = 5
3	1,71	1,73	46,76
	1,75		
4	1,85	1,87	50,54
	1,90		
5	1,80	1,78	48,10
	1,75		
6	1,64	1,65	44,59
U	1,67		
7	1,88	1,89	51,08
, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	1,90		
8	2,07	2,07	55,95
	2,06		
9	1,80	1,78	48,10
	1,75		
10	1,74	1,73	46,77
	1,72		
Moyenne		1,86	53,60
générale			
Ecart type		0,14	3,75
Intervalle de conformité		[3,30-3,64]	[95-105]

IV-3 Analyse des médicaments à base d'insuline humaine lente

<u>Tableau XIX</u>: Résultat de l'analyse des médicaments à base d'insuline humaine lente

N° Echantillon	Concentration obtenue (mg/ml)	Moyenne (mg/ml)	Concentration en insuline humaine (UI/ml)
1	1,83	1,82	49,19
2	1,81 1,74	1,73	46,76
	1,72	1,73	10,70
2	1,84	1,84	49,73
3	1,84		
4	1,74	1,76	47,56
-	1,78		
5	1,87	1,87	50,54
	1,86	2.11	57.02
6	2,15	2,11	57,03
	2,07 1,76	1,75	47,30
7	1,74	1,73	47,50
8	1,80	1,80	48,65
	1,80	,	-,
9	1,68	1,68	45,41
	1,68		
10	1,86	1,86	50,27
	1,86		
Moyenne		1,82	52,44
générale		0.10	2.10
Ecart type		0,12	3,19
Intervalle de		[3,30-3,64]	[95-105]
conformité			

Le tableau XX ci-dessous, récapitule les principaux résultats de l'application de la méthode d'analyse développée, aux médicaments prélevés.

<u>Tableau XX :</u> Tableau récapitulatif des résultats de la détermination de la teneur en insuline humaine des médicaments prélevés

	Moyenne (mg/ml)	Ecart-type	Moyenne (UI/ml)	Ecart-type	
INSULINE	2,84	0,22	81,84	5,96	
RAPIDE					
INSULINE	1,86	0,14	53,60	3,75	
MIXTE					
INSULINE	1,82	0,12	52,44	3,19	
LENTE					
Quantité					
d'insuline	3,47 mg/ml		100 UI/ml		
humaine					
déclarée					
Intervalle de	[3,30 - 3,64] mg/ml		[95 -105] UI/ml		
conformité					

Selon la pharmacopée européenne, la concentration d'insuline humaine dans un flacon de 10 ml de préparation injectable d'insuline humaine est de 3,47 mg/ml soit 100 UI/ml avec un intervalle de conformité de 5%.

Une UI correspond à 0,0347 mg d'insuline humaine car 1ml contient 100 UI et

 $100 \text{ UI / ml} \leftrightarrow 3,47 \text{ mg / ml}$

3,47 mg d'insuline humaine [**10,33**].

TROISIEME PARTIE: DISCUSSION

I- Contrôle des caractères généraux

I-1- Contrôle des caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques ont révélé que l'aspect et la couleur de tous les échantillons ne présentent aucun signe de dégradation apparente. Ils n'avaient ni aspect particulier, ni odeur particulière ni couleur particulière. Les trois types de médicaments analysés sont donc conformes.

I-2- Contrôle de l'étiquetage

Le contrôle de l'étiquetage a montré que tous les médicaments analysés comportaient toutes les informations requises, mentionnées sur les conditionnements primaire, secondaire et la notice. Cette observation facilite l'utilisation du médicament par le praticien et le patient.

Au total, le contrôle des caractères généraux a montré que tous les échantillons analysés étaient conformes à la norme.

II- Méthode analytique

II-1-Traitement de l'échantillon

Les solutions d'échantillons soumis à l'analyse chromatographique, sont obtenues par dilution au 1/1000 des échantillons à 100 UI/ml avec de l'acide chlorhydrique à 0,01N.

YILMAZ B. et coll. au cours de leur étude, ont dilué les échantillons d'insuline à 100 UI/ml avec une solution d'acide chlorhydrique 0,01N. La solution d'échantillon obtenue a une concentration de 50 μg/ml [38].

II-2- Conditions de l'analyse chromatographique

II-2-1- choix de la longueur d'onde

Pour notre étude, la longueur d'onde utilisée est de 254 nm. Elle diffère de celle de la pharmacopée européenne qui est de 214 nm. **HOYER et coll.** ont utilisé une longueur d'onde de 230 nm pour leurs travaux [33,21].

II-2-2- Choix de la phase mobile

Au cours de l'étude, la composition de la phase mobile a été modifiée pour l'obtention d'un temps de rétention satisfaisant. Cette modification portait sur les différentes proportions du solvant A et du solvant B.

Le principe était d'augmenter la quantité d'acétonitrile en augmentant la proportion du solvant B où il est en quantité importante.

La phase mobile retenue était le mélange solvant A et solvant B selon les proportions (20:80, v/v) à un pH 2,3, car le temps de rétention est satisfaisant autour de 10,021mn avec une élution satisfaisante de l'insuline humaine.

Cette augmentation était bénéfique pour l'analyse chromatographique. Les autres constituants des préparations injectables de l'insuline humaine, notamment le méta-crésol étaient élués avant l'insuline humaine. Ils n'ont donc pas interféré dans le cours de l'analyse. Cela a été observé également par **MOSLEMI et coll.** qui ont utilisé une phase mobile différente de celle qui a été retenue au cours de notre étude. Elle était constituée de 3,9 % d'une solution d'hydroxyde de tetramethylammonium et d'acétonitrile selon les proportions (70:30, v/v) [30].

III- Validation de la méthode de dosage

Les critères de validation testés concernent la linéarité, la précision, l'exactitude, la limite de détection et de quantification.

III-1-Linéarité

Les coefficients de détermination ($r^2 = 0,999$) et de corrélation (r = 0,999) sont proche de 1. Les valeurs de ces paramètres attestent d'une linéarité satisfaisante avec un domaine de linéarité qui s'étend de $0,35 \mu g/ml$ à 175 $\mu g/ml$.

Ce résultat diffère de **YILMAZ et coll.** qui ont obtenu un coefficient de détermination (r²=0,9892) et de corrélation (r=0,9946) avec un domaine de linéarité qui s'étant de 0,75 μg/ml à 50 μg/ml [38].

III-2-Précision

La méthode proposée a une répétabilité satisfaisante car les coefficients de variation sont conformes aux normes en vigueur.

Ainsi, pour la répétabilité de la solution de référence à deux niveaux de concentration (3,50 et 35 μ g/ml), les coefficients de variation (0,25 % et 0,20 %) respectivement obtenus sont inferieurs à la norme 2 % donc sont satisfaisants [13].

Le coefficient de variation de la répétabilité de la procédure d'analyse est de 4,06 % inférieur à la norme 5 % donc est également satisfaisant.

Les coefficients de variation de la fidélité intermédiaire manipulateur et jour sont respectivement 3,95 % et 4,45 % donc inferieurs à la norme 5 %. Ils sont satisfaisants [13].

Ces valeurs diffèrent de **MOSLEMI P. et coll.** qui ont obtenu respectivement 1,29% et 5,24% comme coefficients de variation de la fidélité intermédiaire manipulateur et jour [30].

III-3- <u>L'exactitude</u>

La réalisation du test d'exactitude indique un pourcentage moyen de récupération de l'insuline humaine de 88,37 % avec une erreur relative de 11,63 %. Cette valeur est acceptable. En effet, la norme recommande que les valeurs des pourcentages de récupération soient comprises entre 90 % et 110 %.

Cependant, la littérature rapporte des valeurs encore plus faibles que ceux de nos travaux. En effet, celles rapportées par **KHAKSA et coll** varient de 79 à 80 %. **RAVI et coll** ont obtenu un pourcentage de récupération de 87,86 % [3,35]. Il est probable que dans toutes ces études y compris la notre, l'absence de l'étape de purification puisse expliquer les valeurs de pourcentage de récupération obtenues légèrement en dessous de la norme.

III-4 Les limites de détection et de quantification

La méthode d'analyse proposée a une limite de détection de 0,05833 µg/ml et une limite de quantification de 0,07 µg/ml.

Les limites de détection et de quantification obtenues sont largement inferieures à celle obtenue par YILMAZ et coll ont obtenu $0,10 \mu g/ml$ et $0,25 \mu g/ml$ [38] et de MOLSLEMI et coll qui ont obtenu $0,25 \text{ et } 0,75 \mu g/ml$ [30].

Les résultats des critères de validation, acceptables voire satisfaisants dans l'ensemble, justifient l'application de cette méthode à la détermination de la teneur en insuline humaine de médicaments à base d'insuline humaine. En effet, la méthode est sensible, fiable et relativement facile à mettre en œuvre.

IV- <u>Application de la méthode à l'analyse des médicaments à base</u> d'insuline humaine

Toutes les formulations de l'insuline humaine disponibles à l'INSP ont été analysées par chromatographie liquide selon la méthode validée précédemment décrite.

IV-1 Analyse qualitative

La méthode de dosage proposée a permis de détecter la présence de l'insuline humaine dans les 30 échantillons de médicaments soumis à notre étude :

- ❖ 10 échantillons de médicaments à base d'insuline de type rapide
- ❖ 10 échantillons de médicaments à base d'insuline de type mixte
- ❖ 10 échantillons de médicaments à base d'insuline de type lent Les trois types de médicaments analysés contiennent tous de l'insuline humaine.

Ils sont tous conformes à la norme. Au niveau des caractères organoleptiques et de l'étiquetage, ils sont conformes. Par ailleurs les médicaments prélevés à l'INSP proviennent du même laboratoire fabricant.

IV-2 Analyse quantitative

Au terme de notre analyse, nous avons obtenu les teneurs moyennes en insuline humaine:

✓ 10 médicaments d'insuline de type rapide : 2,84 mg/ml

: 76,65 UI/ml

✓ 10 médicaments d'insuline de type mixte : 1,86 mg/ml

: 49,80 UI/ml

✓ 10 médicaments d'insuline de type lent : 1,82mg/ml

: 49,25UI/ml

Tous les lots de médicaments analysés ont une teneur moyenne en dessous de la valeur limite inférieure de l'intervalle de conformité [3,30-3,60] mg/ml ou [95-105] UI/ml.

L'étude nous révèle que tous les échantillons analysés sont donc conformes sur le plan qualitatif et non conformes sur le plan quantitatif.

Les faibles teneurs obtenues en insuline humaine peuvent s'expliquer par d'éventuels problèmes de conservation et de respect de la chaine de froid des préparations injectables d'insuline humaine durant le transport jusqu'en Côte d'Ivoire et du stockage soit chez les grossistes, soit à l'institut National de Santé Publique. En effet, les conditions optimales de conservation conditionnent la qualité finale du produit en raison de l'impact direct sur la stabilité du produit.

Dans les formes pharmaceutiques, l'insuline peut être sujette à des modifications chimiques et physiques. Un certain nombre de facteurs tels que le pH, l'état physique, les agents bactériostatiques, la présence de substances isotoniques, les agents stabilisateurs, la protamine et les ions zinc dans la formulation pharmaceutique affectent sa stabilité. Les dégradations chimiques et physiques se produisent même dans des conditions optimales, résultant en la formation d'agrégats insolubles pendant le stockage et l'utilisation [3].

La question de la stabilité de l'insuline en solution a été étudiée en détail, puisqu'elle détermine les conditions de stockage et de manipulation des préparations pharmaceutiques. L'agrégation covalente de l'insuline lyophilisée se produit via la formation d'échanges de liaisons disulfures intermoléculaires et est directement proportionnelle à la température, le contenu en eau et l'alcalinité [3].

Concernant la stabilité des préparations injectables d'insuline humaine, il est à relever que l'insuline humaine n'est pas une entité chimique stable et les modifications de sa structure primaire (conduisant à des dérivés de l'insuline) affectent la molécule pendant la manipulation, le stockage prolongé et l'utilisation. La décomposition de l'insuline est principalement due à deux

catégories de réactions chimiques : l'hydrolyse et la formation de dimères d'insuline par liaison covalente. La réaction principale d'hydrolyse est une désamination du résidu Asn^{B3}. Elle est non négligeable à température ambiante mais ne modifie très peu l'activité biologique et les propriétés immunologiques de la molécule.

A l'inverse, la formation de dimères par liaison covalente est quantitativement moins importante mais elle réduirait l'activité biologique. Ces agrégats covalents produiraient des effets secondaires immunologiques [3].

La faible teneur en insuline humaine dans les préparations pharmaceutiques peut être cause d'échecs thérapeutiques car le patient s'injecte par ignorance une teneur plus faible en insuline humaine. L'utilisation des insulines de moins bonne qualité entrainerait l'apparition de complications graves du diabète, à savoir les complications métaboliques, dégénératives, infectieuses, voire mortelles [3,27].

CONCLUSION

L'insuline est la principale hormone responsable de la régulation du métabolisme glucidique et participe à la régulation du stockage et de l'utilisation de nombreux nutriments [3].

Notre étude avait pour objectif de développer, valider et appliquer une méthode d'analyse des préparations injectables d'insuline humaine.

L'étude a porté sur :

- L'analyse des caractères généraux ;
- Le développement de la méthodologie d'analyse (mise au point et validation);
- L'application de la méthode à la détermination de la teneur en insuline humaine de 30 échantillons d'insuline prélevés à l'Institut National de Santé Publique.

L'étude des caractères généraux a montré que tous les produits testés sont conformes aux normes.

La méthode d'analyse développée, reposant sur la pharmacopée européenne, $6^{\text{\'e}me}$ édition a été modifiée essentiellement au niveau de la composition de la phase mobile donnant un temps de rétention plus amélioré, de 10 minutes.

Le traitement de l'échantillon a porté uniquement sur une phase de dilution au $1/1000^{\rm \acute{e}me}$.

Les conditions chromatographiques retenus:

- une phase stationnaire C18 (25 x 4, 6 mm) $,5\mu m$;
- une phase mobile constituée d'un mélange du solvant A et du solvant B
 (20:80,v/v). Elle est constituée d'eau, acétonitrile, acide phosphorique, ethanolamine et de sulfate de sodium ;
- un débit de 1ml/min:
- une détection UV à 254 nm.

L'étude des caractères généraux a montré que tous les produits testés sont conformes aux normes.

Au niveau analytique, la validation de la méthode analytique développée a donné des résultats satisfaisants. En effet, l'étude de la linéarité a mis en évidence un domaine de linéarité de 0,35 μg/ml à 175 μg/ml.

Les coefficients de variation de la répétabilité obtenus pour les solutions à 35 µg/ml et 3,50 µg/ml sont inférieurs à la norme de 2% donc satisfaisants.

Le coefficient de variation de la répétabilité de la procédure est de 4,06 % inférieur à la norme 5 % donc satisfaisant.

Les coefficients de variation de la fidélité intermédiaire manipulateur et jour des échantillons à $3,50 \mu g/ml$ sont respectivement 3,95 % et 4,45 % donc inférieurs à la norme de 5 %. Ils sont satisfaisants. La méthode est répétable.

Le pourcentage de récupération exprimant l'exactitude est 88,37 % avec une erreur moyenne de 11,63 %. Cette valeur n'est pas satisfaisante mais justifiée par l'absence de purification des échantillons.

La limite de détection de l'insuline humaine est évaluée à $0,0588 \mu g/ml$ et la limite de quantification à $0,07 \mu g/ml$.

Les paramètres de la validation déterminés ont montré que la méthode peut être appliquée au contrôle analytique des préparations injectables d'insuline humaine.

Les 30 médicaments analysés contiennent tous de l'insuline humaine. Mais les teneurs de ces médicaments sont en dessous de la limite inférieure de l'intervalle de conformité de [3,30-3,60] mg/ml ou [95-105] UI/ml. Cette faiblesse des teneurs pourrait s'expliquer par des problèmes de conservation. En effet, une mauvaise conservation pourrait avoir des conséquences sur la stabilité des préparations injectables, avec risque d'efficacité thérapeutique insuffisante lors de la prise en charge du diabète des patients.

RECOMMANDATIONS

AUX STRUCTURES EN CHARGE DE LA REGLEMENTATION ET DE CONTROLE DE QUALITE

- Prendre en compte la méthode proposée pour le contrôle de qualité pré et post commercialisation en Côte d'Ivoire des préparations injectables à base d'insuline humaine;
- Prendre des mesures réglementaires adéquates en cas de non-conformité des résultats des contrôles effectués.

AUX STRUCTURES SANITAIRES:

 Assurer une bonne conservation de ces médicaments pour mettre à la disposition des populations des produits de qualité.

AUX STRUCTURES CHARGEES DE LA RECHERCHE:

Poursuivre les travaux sur la méthode développée tout en y incorporant
 l'étape de purification afin d'obtenir des pourcentages de récupération
 améliorées.

A LA POPULATION

- Se procurer les médicaments à base d'insuline humaine uniquement sur ordonnance médicale, dans les circuits officiels de distribution de médicaments après diagnostic d'un diabète de type 1 ou type 2 insulinodépendant.
- Se conformer à la prescription médicale et signaler aux praticiens tous les effets indésirables observés.

AUTORITES POLITIQUES ET A LA DIRECTION DE L'INSP

 Réhabiliter les laboratoires de biologie et de nutrition pour promouvoir la recherche et améliorer la prise en charge des patients.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] **ALAA C.**

Inventaire des traitements antidiabétiques utilisés à l'hôpital militaire d'Abidjan de 2004 à 2008. Thèse de docteur en pharmacie, Abidjan, 2010, n°1686

[2] AGENCE FRANÇAISE DE SECURITE SANITAIRE DES PRODUITS DE SANTE(AFSSAPS)

Recommandation pour le traitement médicamenteux du diabète de type 2 ; traitement de normalisation glycémique. Presse Méd. 1999, 28(28): 1527-1533

[3] AGIN A.

Dosage des analogues de l'insuline à l'aide de deux immunodosages de l'insuline. Thèse de docteur en Médecine, Strasbourg, 2006.

[4] ALLANIC H.

Epidémiologie, hérédité, étiopathogénie du diabète sucré. Encycl. Méd. Chir ; CP Glandes-Nutrition, 1995 ; 4 : 5-12p

[5] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION

Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, Alexandria, Virginia, USA 2004; 27(1): 590-595 p

[6] ANOMA J. P.

Les insulines en Côte d'Ivoire : évolutions et perspectives. Thèse de docteur en pharmacie, Abidjan Juin 2001, n°669 ; 5-82p

[7] **BAZZY H.**

Cystopathie et dysfonctionnements sexuels chez le diabétique ivoirien. Thése de docteur en Médecine, Abidjan 2002; n°2968,149p

[8] BONVIN J.

Insulinothérapie dans le diabète de type 2.

Méd_ Hyg, 2001; 59: 1321-1325

[9] BOSQUET A.

Diététique du diabéte.

L'obj. Méd., 1986; 37:14-16

[10] BRIX R.; HENRIK S; HANSEN S. H.;

From experimental design to uncertainty estimation for the European Pharmacopoeia HPLC analysis of human insulin

The analyst, 2002; 127(12):1676-1681

[11] COOPER M E., GILBERT R E., EPSEIN M.

Récents progrès dans la physiopathologie de la néphropathie diabétique.

XVI Congres de la F.I.D. Helsinki, 1997: 6-7

[12] DARNAUD J., BLOOM D., DENAR DY., CALOT M., AMBON A.

Système HLA et diabète insulinodépendant de la maturité.

In Journée Annuelles de Diabétologie de l'hôtel-dieu.

Flammarion Ed., Paris, 1983; 1:150-158p.

[13] DESENFANT M., PRIEL M., RIVIER C.

De la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure. Définition validation

Laboratoire Nationale d'Essais BNM-LNE

Edition Boissier, Paris 2009; 1-6p

[14] DICTIONNAIRE VIDAL

Insuline humaine; 2010, Paris, édition Vidal

[15] DOLISI G.

Le diabète,

<www.lottin.net/maude/images/pancreas/structure_insuline.PNG>, (page consultée le 25 Mars 2010)

[16] DOROSZ PH.

Guide pratique des médicaments. 27e éd. Paris : Maloine, 2007;1893p

[17] DROUIN P, ZIEGLER O, GOTI, KOLOPP M, DEBRY G.

Le traitement du diabète insulinodépendant.

E.M.C. (Paris) Glandes Nutrition, 1988, vol 10,10366 R30 : 28p.

[18] **FAURE E.**

Le diabète sucré : communiqué de presse OMS/63. Genève. (page consultée le 17/03/10)

[19] GRIMALDI A, CORNET P, MASSEBOEUF N, POPELIER M, SACHON C.

Guide Pratique du diabète. Paris : Collection Mediguides, 1998 : 143-249p.

[20] HELENE J. HENRI H.

Bases nutritionnelles de l'ordonnance diététique.

L'ouest Méd.1985; 365 (12):481-487.

[21] HOYER G. L.; NOLAN P. E.; LEDOUX J. H.;

Selective stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay for recombinant human regular insulin

Journal of Chromatography. 1995, 699 (1-2): 383-388

[22] KACOU A.

Statut en vitamine E de sujets diabétiques suivis au CADA Thèse de doctorat en pharmacie; 2003-2004, n°976,2-24p.

[23] KONE Y.

Evaluation et observance du traitement par les antidiabétiques oraux : cas du Glibenclamide, de la metformine et de leur association.

Thèse de doctorat en pharmacie; 2002-2003; n°779,189 p

[24] LAKPA A. P.

Anomalie de l'hemogramme chez des diabétiques de type 1 traités par les biguanides à l'INSP d'Abidjan

Thèse de doctorat en pharmacie ; 2006-2007, n°1192,9 p

[25] LOKROU A, TOUTOU T, OUEDRAOGO Y, GRAGO-DADA N.

Complications du diabète sucré en milieu hospitalier en Côte d'Ivoire.

Méd.Afr. Noire 1987; 37,(7): 593-601

[26] LOKROU A.

Eléments de diabétologie pratique,

EDUCI santé, Abidjan, 2002, 504 : 13-64p

[27] LOKROU A.

Le diabète sucré: acquisitions récentes,

Synthèse de l'enseignement post universitaire du SYNACASSI, Yamoussoukro, Mai 2010, 2-129p

[28] **MARTIN T.**

Sémiologie des complications aigües du diabète.

Endocrinologie, 08/02/08,

<www.entouftoa.free.fr/semio_complication_diabete.doc>, (page consultée le 22 mars 2010)

[29] M'BANY J-C

Panorama épidémiologique et diversités d'approche du diabète

IDF Diabetes Atlas.

http://www.diabetesatlas.org/content/diabetes

(page consultée le 13 avril)

[30] MOSLEMI P., ABDOLHOSSEIN R., NAJAFABADI T.

A rapid and sensitive method for simultaneous determination of insulin and A2 1 -desamido insulin by high-performance liquid chromatography

Journal of pharmaceutical and biomedical analysis A. 2003; 33, (1), 45-51

[31] OGA S., TEBI A., AKA K A., MALAN KA., KOUADIO L P., LOKROUA.

Le diabète sucré en Côte d'Ivoire : des particularités épidémiologiques.

Méd_Trop. 2006; 66: 241-246.

[32] ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. GENEVE

Qu'est-ce que le diabète ? Extrait de l'article rédigé par l'OMS à l'occasion de la journée mondiale du diabète le 14 Novembre 2009, (page consultée le 25 mars 2010)

http://www.mayite.com/docs/Le_diabete.pdf

[33] PHARMACOPEE EUROPEENNE

6ème Edition, Conseil de l'Europe, Tome 2, Strasbourg 2007, 1500-1502p.

[34] PROGNON P., LEBELLE A.V., TAUBURET A.M.

Démarche méthodologique en analyse pharmaceutique.

L'analyse pharmaceutique du médicament. 2002, Cachan (France) :Ed.Med.Int, 66-114 p

[35] **RAVI S.,DARWIS Y.,KOK K.,**

Development and validation of an HPLC-UV method for the determination of insulin in rat plasma: Application to pharmacokinetic study.

Chromatographia, 2007, 66, (9-10), 805-809.

[36] ROUESSAC F., ROUESSAC A.

Analyse chimique, Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes, Masson, 2ème édition, 1994 : 15-18p

[37] WIKIPEDIA DOCUMENTATION DE REFERENCE SUR INSULINE HUMAINE

http://fr.wikipedia.org../../s/i/l/Sild%C3%A9nafil.html (Page consulté le 26 janvier 2011)

[38] YILMAZ B., YUCEL K.

Development and validation of HPLC method for determination of human insulin in pharmaceutical preparation

International journal of pharmaceutical sciences, 2010 (2); 40-43

[39] **ZMIROU D.**

Epidémiologie du diabète en Côte d'Ivoire

Thèse de doctorat en médecine ; Grenoble : 1979