



Organe officiel d'information de la société de la Biologie Clinique du Bénin – N° 010 – Année 2006

A PROPOS D'UN CAS D'HOLOPROSENCEPHALIE
ALBAIRE

CONSOMMATION D'ALIMENTS GOITRIGENES ET
TROUBLES

ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

ANTIBIORESISTANCE ET PRODUCTION DE TOXINES

INFERTILITE FEMININE

EVALUATION DU POUVOIR ANTIPARASITAIRE

INHIBITION D'UNE BETA LACTAMASE



COMITE DE LECTURE (REFEREES)

Professeur J. BERTHET	(Belgique)
Professeur M. MOURAY	(France)
Professeur I. ZOHOUN	(Bénin)
Professeur M. PHILIPPE	(Belgique)
Professeur M. SOSSO	(Cameroun)
Professeur S.A. AKPONA	(Bénin)
Professeur S.Y. ANAGONOU	(Bénin)
Professeur D. THIAM	(Sénégal)
Professeur M. TOURE	(Sénégal)
Professeur S. ABDOU BA	(Sénégal)
Professeur E. NGOU MILAMA	(Gabon)
Professeur K. KOUMARE	(Mali)
Professeur J. AKA	(Côte d'Ivoire)
Professeur A. MASSOUGBODJI	(Bénin)
Professeur S. LATOUNDJI	(Bénin)
Professeur J. NGOGANG	(Cameroun)

COMITE DE REDACTION

Directeur de publication : Raphaël Darboux
Directeur Adjoint : Marcellin Amoussou-Guenou

Membres : Simon Akpona
Séverin Anagonou

Composition et mise en page :

Centre de production de Matériels Educatifs Pour la Santé
Champ de Foire 01 BP 188 Cotonou
Tél : 229/21301236
E-mail : mepscot@leland.bj



SOMMAIRE

A PROPOS D'UN CAS D'HOLOPROSENCEPHALIE ALOBAIRE ASSOCIE A UN PROBOSCIS ET A UNE COMMUNICATION ATRIO - VENTRICULAIRE . GANGBO F ¹ , LOKOSSOU A ⁽²⁾ , BIAOU O ⁽³⁾ , LALEYE A ⁽¹⁾ , SOSSOU R ⁽³⁾ , CARLES D ⁽⁴⁾ , ALBERTI EM ⁽⁴⁾ , DARBOUX R ⁽¹⁾	5-9
LA MALADIE DE GUMBORO DANS LES ELEVAGES DE POULETS IMPORTES EN REPUBLIQUE DU BENIN : ASPECTS HISTOLOGIQUES DE LA BOURSE DE FABRICIUS. GANGBO ¹ Flore, EDORH ² Patrick, DOUGNON ³ Jacques, KPODEKON ³ Marc, TOSSA ¹ Apolline, KOTTIN ¹ Théophile, DARBOUX ¹ Raphaël	10-16
CONSOMMATION D'ALIMENTS GOITRIGENES ET TROUBLES DUS A LA CARENCE EN IODE (TDCI) DANS LE DEPARTEMENT DES COLLINES EN REPUBLIQUE DU BENIN. TOKOUDAGBA-PADONOU I ¹ , AKPONA A. S ¹ , ABOUDOULAYE I ² , GOMINA ASSOUMANOU M. ¹	17-20
ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE L'EXPRESSION DE L'ONCOPROTEINE pS2 DANS LES CARCINOMES CANALAIRES INFILTRANTS DE GRADES I, II ET III. EDORH ¹ Aléodjrodo Patrick, AHISSOU ¹ Hyacinthe, LALEYE ² Anatole, DOUGNON ³ Jacques Tossou, LEROUX-BROUSSIER ⁴ Agnès, RIHN ⁵ Bertrand	21-25
ANTIBIORESISTANCE ET PRODUCTION DE TOXINES PAR DES SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ISOLEES DE DIARRHEE. BABA-MOUSSA Lamine Saïd ¹ , ZINZENDORF Nanga Yesse ² , YOUSAO A.K. Issaka ³ , ASSOGBA Bérénice ¹ , ANAGONOU Sévérin ⁴ , PREVOST Gilles ⁵ , SANNI Ambaliou ¹	26-32
INFERTILITE FEMININE ET ELEVATION DES IMMUNOGLOBULINES E : <i>PROFIL ET PRISE EN CHARGE DES PATIENTES</i> . ADISSO S. ¹ , BIGOT A.K. ² , LATOUNDJI C. M. ³ , ADJALLA G. ³ , NBESSAN P ³	33-37
EVALUATION DU POUVOIR ANTIPARASITAIRE DES GRAINES DE <i>CARICA PAPAYA</i> . AKPONA S. A. ⁽¹⁾ , OBAMA MENANGA I. O. ⁽¹⁾ , ABDOULAYE I. ⁽²⁾ , AYEDOUN A. M. ⁽³⁾	38-42
ASPECTS CLINIQUES ET HISTOPATHOLOGIQUES DES TUMEURS DU PALAIS EN ORL AU CNHU DE COTONOU (1981-2006). VIGNIKIN-YEHOUESSI B. (1), FLATIN M. (1), AMOUSSOU C-P. (1), VODOUHE S-J. (1), HOUNKPE YYC. (1), MEDJI ALP. (1).	43-46
EFFETS DE <i>ANANAS COMOSUS</i> , (VARIETE « PAIN DE SUCRE ») SUR LES LESIONS HEPATIQUES DUES A L'INTOXICATION AU PARACETAMOL CHEZ LE RAT WISTAR. DOUGNON T. Jacques ¹ , KPODEKON T ¹ . Marc, LALEYE Anatole ² , ADJAGBA Marius ² et DARBOUX B. Raphaël ²	47-50
ACTIVITES ANTIBACTERIENNES DE QUELQUES PLANTES DE LA PHARMACOPEE AFRICAINE SUR DES SOUCHES DE <i>Escherichia coli</i> PRODUCTRICES DE β LACTAMASES. ANAGO ^a Eugénie, GBENOU ^b Joachim, BANKOLE ^c Honoré, ADJILE ^a Aurelle, KOUSSEMOU ^a Hugues, BIO NIGAN ^a Safiath, YAROU MAYE ^a Alexis, LOKO ^a Frédéric *, MOUDACHIROU ^b Mansourou	51-55
ETUDES PHYTOCHIMIQUES DES FEUILLES DE <i>RYTIGYNIA CANTHIOIDES</i> (BENTH.) ROBYNS (RUBIACEAE), UNE PLANTE MEDICINALE ET ALIMENTAIRE UTILISEE AU BENIN. AGASSOUNON DJIKPO TCHIBOZO ¹ Micheline, TOUKOUROU ¹ Fatiou, de SOUZA ² Comlan, DICKO ³ Mamoudou H., TRAORE ³ Alfred S., GBEASSOR ² Messanvi	56-61
INHIBITION D'UNE BETA LACTAMASE A SPECTRE ELARGI EXTRAITE DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PAR LES EXTRAITS TOTAUX D'ORGANES DE 15 ESPECES VEGETALES DE LA PHARMACOPEE AFRICAINE ANAGO ^a Eugénie, LOKO ^a Frédéric, GBENOU ^b Joachim, GBAGUIDI ^c Achille, KOUSSENOUDO Philomène ^c , MOUDACHIROU ^b Mansourou	62-66

EDITORIAL



Les publications du N° 10 sont aussi expérimentales. Nous félicitons les uns et les autres pour le travail abattu et les collaborations scientifiques en cours. Le numéro 11 est pratiquement bouclé.

Dr S.A. AKPONA
Président de Société de Biologie
Clinique du Bénin

Notes aux auteurs

La publication d'articles dans le Journal de la Société de Biologie Clinique est subordonnée à leur acceptation préalable par le Comité de Rédaction.

Les articles proposés ne doivent pas avoir été antérieurement publiés dans une autre revue médicale ni faire l'objet d'une publication en cours.

Les articles doivent être dactylographiés en double interlignes, en recto uniquement et imprimés en double exemplaires.

Les exemplaires dactylographiés seront sauvegardés sur une disquette ou un CDROM. Les caractéristiques du logiciel de traitement de textes utilisé pour la saisie doivent être précisées. Il est inutile de réaliser une mise en page au préalable.

Chaque article, après le titre et les auteurs (Nom suivi des prénoms) doit obligatoirement comporter un résumé et des mots-clés en français et en anglais. La totalité de l'article ne doit pas dépasser huit (8) pages au maximum, figures, photos, tableaux et graphiques compris.

Toute iconographie doit être numérotée et comportée une légende. Les photos doivent être de bonne qualité sur un format 9 x 13 (cm). Elles doivent comporter au verso, le nom du premier auteur et le titre de l'article. La reproduction des photos dans le journal se fait en noir et blanc. Tout tirage en couleur implique des frais supplémentaires à la charge de l'auteur.

En bas de la première page doivent figurer les noms des établissements ou organismes d'origine et des auteurs.

Les références bibliographiques doivent comporter les noms puis les prénoms de tous les auteurs de l'article en question.

La rédaction décline toute responsabilité sur les opinions exprimées dans les articles. Celles-ci n'engagent que leurs auteurs notamment dans les cas de mentions techniques ou de produits pharmaceutiques utilisés.

**A PROPOS D'UN CAS D'HOLOPROSENCEPHALIE ALOBAIRE ASSOCIE A
UN PROBOSCIS ET A UNE COMMUNICATION ATRIO - VENTRICULAIRE**



**GANGBO F¹, LOKOSSOU A⁽²⁾, BIAOU O⁽³⁾, LALEYE A⁽¹⁾, SOSSOU R⁽³⁾,
CARLES D⁽⁴⁾, ALBERTI EM⁽⁴⁾, DARBOUX R⁽¹⁾**

¹ Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou ; 01 BP 188 Cotonou, Bénin; ² Service d'Echographie ; Maternité Lagune, Cotonou, Bénin; ³ Service de Radiologie ; CNHU Hubert Maga, Cotonou, Bénin; ⁴ Unité de Pathologie Fœtoplacentaire, Service d'Anatomie Pathologique, Groupe Hospitalier Pellegrin, Place Amélie Raba-Léon, 33076 Bordeaux Cedex

RESUME

La pathogénicité de l'holoprosencéphalie est multifactorielle. Il s'agit d'une malformation cérébrale complexe résultant d'un défaut de clivage complet ou incomplet du prosencéphale, touchant le cerveau et la face. Son spectre clinique est très variable. Nous décrivons un cas d'holoprosencéphalie alobaire découvert chez un fœtus de 25 semaines sur les signes échographiques. La grossesse a été interrompue et l'examen fœto - placentaire a mis en évidence une dysmorphie cranio - faciale associée à un proboscis au dessus des deux yeux, une fente palatine, un clivage incomplet de l'encéphale et des anomalies cardiaques. Cette étude confirme l'importance de l'échographie et son niveau de concordance avec l'examen fœto - placentaire.

Mots clés : Malformation congénitale, holoprosencéphalie alobaire, communication atrio - ventriculaire

SUMMARY

The holoprosencephaly pathogenesis is multifactorial. It is a developmental field defect resulting from prosencephalon complete or incomplete cleavage, affecting both the forebrain and the face. Clinical expressivity is variable. In this study, the authors analyzed alobair holoprosencephaly case observed in 25 GW old fetus after ultra - sonography. After termination of pregnancy, fetopathological examinations showed cranio - facial dysmorphism associated with proboscis situated above a double eye, a cleft lip, an incomplete cleavage of the encephalon, and cardiac abnormalities.

This study confirm the importance of echographical practice and its correlation with fetopathological findings for better management.

Key words : Congenital malformation, alobair holoprosencephaly, atrio- ventricular communication

INTRODUCTION

Au Bénin, la quasi-totalité des malformations fœtales est découverte au 3^{ème} trimestre de la grossesse grâce à l'échographie, à la radiographie seule à la naissance en complément de l'échographie ou au caryotype [1]. Parmi les malformations, celles du système nerveux central étaient en tête de liste avec dans l'ordre les dilatations ventriculaires, les anencéphalies et le spina bifida [1].

Nous rapportons un cas d'holoprosencéphalie alobaire découvert chez un fœtus de sexe féminin, âgé de 25 semaines et dont le phénotype a été confirmé par l'examen fœtopathologique.

L'holoprosencéphalie (HPE) est caractérisée par l'extrême variabilité des phénotypes, une hétérogénéité génétique et l'absence de relations nettes entre le génotype et le phénotype. Il s'agit d'une malformation cérébrale complexe résultant d'un défaut de clivage complet ou incomplet du prosencéphale. On distingue l'HPE alobaire où n'existe qu'une vaste cavité

mono- ventriculaire surmontant en « fer à cheval » les thalami dilatés sans aucune structure médiane (absence du corps calleux et de la faux du cerveau); l'HPE semi- lobaire où il existe en arrière une ébauche de la faux du cerveau et des cornes occipitales très dilatées mais séparées; l'HPE lobaire caractérisée par la fusion isolée des cornes frontales et la dilatation ventriculaire modérée [2].

OBSERVATION

Madame L M, âgée de 28 ans a une histoire familiale sans particularité. Il n'y a pas de notion de consanguinité. Dans ses antécédents médicaux, on note un épisode palustre simple traité par de la chloroquine.

Madame L M est une primipare (G : 1 ; P : 0) chez qui, l'échographie réalisée le 14 /01/06, à 25 semaines d'aménorrhée (SA) révèle une microcéphalie et une HPE associée à une méningocèle ; une autre échographie réalisée

le 17/01/06, dans un centre différent du premier, évoque une hydrocéphalie.

Le caryotype fœtal réalisé le 26 janvier 2006, à partir du liquide amniotique au laboratoire de Cytogénétique de l'Université Libre de Bruxelles, montre une formule chromosomique normale (46, XX). La recherche de microdélétion Di George est négative.

Après **l'interruption médicale de grossesse** le 27 janvier 2006, une **autopsie fœtale** a été effectuée au laboratoire de Fœtopathologie de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou.

Cette autopsie a été pratiquée selon un protocole adapté de ceux d'autres auteurs [3-4] et incluant des photographies de face et de profil du corps entier, puis centrées sur l'extrémité céphalique, des radiographies sans préparation de face et de profil, une dissection viscérale complète, incluant l'examen de l'encéphale.

Les différentes mesures prises ont permis d'apprécier la croissance du fœtus par rapport à l'âge gestationnel; ces mesures ont été comparées aux courbes de références utilisées dans le service de fœtopathologie du CHU de Bordeaux.

- **L'examen radiographique** de face et de profil montre une boîte crânienne normale; les os propres du nez sont absents. On note onze paires de côtes, une hémivertèbre dorsale droite au niveau de D₁₀ et un élargissement des espaces intervertébraux sacrées. Les canaux semi – circulaires sont normaux en situation et en taille.

- **A l'examen externe**

Le fœtus, de sexe féminin, n'est pas macéré. Il est dysmorphique et présente une dysmorphie cranio – faciale associée à une arrhinie et un philtrum long. Au milieu de son faciès aplati, on note un proboscis de 1,5 cm de long au dessus des deux yeux avec un diamètre inter – canthi (DICI) de 2 mm (Figure 2). Il présente également une fente palatine médiane de 2,5 cm de diamètre et une spini bifida occulta.

L'examen viscéral macroscopique a permis de noter :

- des anomalies cardiaques avec la pointe du cœur à droite, l'aorte, en fer à cheval (calibre : 0,5 cm) et une communication atrio – ventriculaire;
- au niveau de l'abdomen, des surrénales normales en position mais hypotrophiques
- un encéphale immature (Figure 3) caractérisé par :
 - un poids avant fixation, de 49 g
 - une absence totale de la scissure inter – hémisphérique
 - l'absence des bulbes et tractus olfactifs
 - le tronc cérébral et le cervelet étaient normaux en forme et en situation (flèche épaisse).
- le placenta entier, de forme ovoïde, mesure 12 cm sur 10 cm et pèse 193 g (la valeur normale étant 229,97 g). Le cordon comporte trois axes vasculaires et les membranes sont intactes.

Les différentes mensurations ont été comparées à celles d'un fœtus normal de 25 SA (tableau 1) (courbes de références du service de fœtopathologie du CHU de Bordeaux)

Tableau 1 : Comparaison des mensurations de notre cas à celles d'un fœtus du même âge

Paramètres	Poids du fœtus (g)	PT (cm)	PC (cm)	VT (cm)	V – C (cm)	DICI (cm)	DICE (cm)	Poids des surrénales (g)	Poids du cerveau (g)
Cas index	833	20	32	33	20	0,2	28	0,5	49
Normes pour un fœtus du même âge	757,3	19,4	25,95	32,4	22,9	28	40	1,58	115,11

Légendes	Pds : Poids	PT : Périmètre thoracique
	VT : Vertex – talon	DICI : Diamètre inter canthi interne
	VC : Vertex – coccyx	DICE : Diamètre inter canthi externe
	PC : Périmètre crânien	

DISCUSSION

L'absence du développement du sillon inter-hémisphérique observé à l'examen fœtopathologique a permis d'identifier, pour cet âge gestationnel [5], une HPE alobaire, l'état de maturation du cerveau ayant été apprécié en fonction du calendrier d'apparition des sillons primaires [6]. En effet, le cerveau est lisse jusqu'à 18 SA et les sillons primaires se mettent en place entre 18 SA et 28 SA.

La survenue de l'HPE est sporadique. Dans la série fœto-pathologique de DELEZOIDE, la fréquence est de 40 à 70 pour 100.0000 naissances [7].

Le nombre de cas d'HPE décrits dans la littérature varie de un à cinq [8-9-10-11-12-13-14], de 6 à 24 [15-16-17] ou de 25 et plus [18-19]. Si l'on considère, la moyenne annuelle du nombre de cas, elle diffère selon les études, lesquelles ne portent pas sur une durée d'inclusion identique. Cette moyenne varie de un cas [8-9-10-12-13-14], à 2 cas ou plus [11-15-18-19].

Dans notre étude, l'âge de la mère était de 28 ans et se situe dans la tranche d'âge décrite dans la littérature [18-19]. Dans notre étude, l'HPE a été diagnostiquée au terme de 25 SA, ce qui est conforme avec les données de la littérature qui mentionnent un âge fœtal compris entre 23 SA et 38 SA [8-9-10-12-17].

Les possibilités de dépistage échographique des anomalies cranio-faciales et cérébrales dépendent de leur gravité [20- 21].

Dans la plupart des cas, lorsque l'HPE est diagnostiquée, la grossesse est interrompue. Il a été rapporté un cas d'HPE de découverte post – natale tardive [22].

La survie ne dépasse pas la première année de vie ; il a été rapporté un cas de survie longue au prix d'un développement psychomoteur faible, d'une tétraplégie spastique et d'une épilepsie grave dans les cas d'HPE [23].

Le phénotype de l'HPE comporte essentiellement des anomalies cranio-faciales qui font partie intégrante de ces pathologies. Ainsi, toute malformation faciale de la ligne médiane (œil unique, monorhinie, agénésie prémaxillaire et cyclopie) doit faire évoquer une malformation cérébrale.

Dans notre étude, le proboscis a une forme tubulaire et est situé au dessus des deux yeux dont le DIC1 est réduit (0,2 cm), la valeur normale étant de 28 cm pour le même terme. Il ne

contenait pas de structure osseuse radiologiquement décelable. Des auteurs ont décrit un proboscis situé au dessus d'un œil unique [24]. Dans ce dernier cas, cette malformation est associée à une polydactylie de la main gauche et du pied droit, et de petites oreilles. La terminaison exacte du proboscis peut être identifiée à l'aide du scanner dans le plan sagittal et coronal [24].

Les étiologies de l'HPE sont très diverses et il existe vraisemblablement une interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux. La réalisation du caryotype fœtal est donc indispensable. Le caryotype peut être normal [15-17-19], comme dans notre cas index ou présenter des aneuploidies de nombre ou de structure [8-15-17-18-19-25]. Parmi les anomalies génétiques, les plus fréquemment associées à l'HPE, on retrouve les trisomies 13, 18 et 21.

Devant notre cas index, il aurait fallu rechercher des mutations génétiques [15-22-25-26], en particulier au niveau du gène Sonic Hedgehog (SHH), situé sur le chromosome 7 et souvent impliqué dans l'holoprosencéphalie. En effet, dans une cohorte de 143 cas d'HPE, ce sont les mutations du gène SHH qui étaient en tête de liste avec 15 cas ; des mutations étaient présentes dans les gènes ZIC2, SIX3 et TGIF respectivement dans 6 cas, 5 cas et 2 cas [26].

Les mutations génétiques peuvent survenir au niveau des points de cassure d'une translocation incluant le chromosome 7 qui sont responsables de l'altération de l'expression entre autres, du gène SHH [8-22].

CONCLUSION

L'autopsie fœtale que nous avons réalisée a confirmé un phénotype en rapport avec l'holoprosencéphalie alobaire associée à une communication atrio – ventriculaire, évoqués à l'échographie et d'autres anomalies.

Notre étude met donc en exergue le rôle de l'examen fœto - placentaire dans les pathologies malformatives. En effet, la pratique de l'autopsie fœtale permet de vérifier s'il existe une concordance ou une discordance entre les données échographiques et celles de l'autopsie ; elle contribue à améliorer les connaissances dans le dépistage et le diagnostic des pathologies malformatives fœtales, et donc de mieux structurer la prise en charge et le conseil génétique. Une telle amélioration nécessite des progrès technologiques et la formation des praticiens.



Figure 1 : Image échographique de l'HPE alobaire montrant la fusion des thalami et l'absence des structures médianes



Figure 2 : Foetus vu de face présentant une arrhinie (double flèche simple) et un proboscis (flèche simple)



Figure 3 : Vue de face de l'HPE montrant l'absence totale de la scissure inter - hémisphérique (flèche)

BIBLIOGRAPHIE

- 1 : GANGBO F, LOKOSSOU A, KOMONGUI DG, SOSSOU R, PERRIN RX, DARBOUX R (2005) : Les malformations congénitales découvertes dans un hôpital de référence de Cotonou : apport des différentes techniques d'exploration. *Le Bénin Médical* ; 30 : 56 – 60
2. GUERIN B, ARDAENS Y, BAILLEUX B, HOUZE D (1991): *Echographie en pratique obstétricale*. Collection d'imagerie radiologique. Ed. Masson 124 pages.
3. IMBERT MC. *L'examen foetopathologique* (1991) : Technique et apport de l'examen du placenta et de l'autopsie périnatale. *Ann Pathol* (11) : 292 - 298
4. BOVE KE and the autopsy committee of the College of American Pathologists. Practice guidelines for autopsy pathology. *The perinatal and pediatric autopsy* (1997). *Arch Pathol Lab Med* ; (121) : 368 - 376.
5. GUIHARD - COSTA AM, LARROCHE JC (1995) : Fetal biometry growth charts for practical use in fetopathology and antenatal ultrasonography. *Fetal Diagnos The* (10) : 212 – 278
6. GIRARD N, RAYBAUD C, PONCET M (1995) : In vivo MR study of brain maturation in normal fetus. *AJNR*. 16 : 407 - 413
7. DELEZOIDE A, NARCY F, LARROCHE JC (1990) : Cerebral midline development anomalies : spectrum and associated features. *Genetic Counseling*. 1 : 197 - 210
8. NOWACZYK MJ, HUGGINS MJ, TOMKINS DJ, ROSSI E, RAMSAY JA, WOULFE J, SCHERER SW, BELLONI E (2000) : Holoprosencephaly, sacral anomalies, and situs ambiguus in an infant with partial monosomy 7q/trisomy 2p and SHH and HLXB9 haploinsufficiency. *Clin Genet*. 57 (5) : 388 – 393
9. GILBERT-BARNES E, DEBICH-SPICER D, COHEN MM JR, OPITZ JM (2001) : Evidence for the "midline" hypothesis in associated defects of laterality formation and multiple midline anomalies. *Am J Med Genet*. 15 ; 101 (4) : 382 – 387

10. LEHMAN NL, ZALESKI DH, SANGER WG, ADICKES ED (2001) : Holoprosencephaly associated with an apparent isolated 2q37.1-->2q37.3 deletion. *Am J Med Genet.* 1 ; 100 (3) : 179 – 181
11. McCORMACK WM JR, SHEN JJ, CURRY SM, BEREND SA, KASHORK C, PINAR H, POTOCKI L, BEJJANI BA (2003) : Partial deletions of the long arm of chromosome 13 associated with holoprosencephaly and the Dandy-Walker malformation. *Am J Med Genet A.* 15 ; 118 (2) : 384 – 389
12. BALCI S, TEKSEN F, DOKMECI F, CENGIZ B, COMERT RB, CAN B, OZDAMAR S (2004) : Prenatal diagnosis of Meckel-Gruber syndrome and Dandy-Walker malformation in four consecutive affected siblings, with the fourth one being diagnosed prenatally at 22 weeks of gestation. *Turk J Pediatr.* 46 (3) : 283 – 288
13. NEGISHI M, KANO K, SHIMURA N, ARISAKA O : (2005) Hypocalcemia due to tubular dysfunction in a patient with holoprosencephaly. *Clin Exp Nephrol.* 9 (3) : 244 – 246
14. FERNANDEZ BA, SIEGEL-BARTELT J, HERBRICK JA, TESHIMA I, SCHERER SW : (2005) : Holoprosencephaly and cleidocranial dysplasia in a patient due to two position-effect mutations: case report and review of the literature. *Clin Genet.* 68 (4) : 349 - 359.
15. MOOG U, DE DIE-SMULDERS CE, SCHRANDER-STUMPEL CT, ENGELEN JJ, HAMERS AJ, FRINTS S, FRYNS JP (2001) : Holoprosencephaly: the Maastricht experience. *Genet Couns.* 12 (3) : 287 – 298
16. KONIG R, BEEG T, TARIVERDIAN G, SCHEFFER H, BITTER K (2003) : Holoprosencephaly, bilateral cleft lip and palate and ectrodactyly: another case and follow up. *Clin Dysmorphol.* 12 (4) : 221 - 225
17. THAKUR S, SINGH R, PRADHAN M, PHADKE SR (2004) : Spectrum of holoprosencephaly. *Indian J Pediatr.* 71 (7) : 593 – 597
18. FORRESTER MB, MERZ RD (2000) : Epidemiology of holoprosencephaly in Hawaii, 1986-97. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 14 (1) : 61 - 63.
19. CHEN CP, CHERN SR, LIN CJ, LEE CC, WANG W, TZEN CY (2005) : A comparison of maternal age, sex ratio and associated anomalies among numerically aneuploid, structurally aneuploid and euploid holoprosencephaly. *Genet Couns.* 16 (1) : 49 - 57
20. De MYER WE, ZEMAN W, PALMER CG (1996) : The face predicts the brain : diagnostic significance of median facial anomalies for holoprosencephaly(archinencephaly) *Pediatrics.* 34 : 256 - 263.
21. FILLY RA, CHINN DH, CALLENP W (1984) : Alobar holoprosencephaly : ultrasonographic prenatal diagnosis. *Radiology* (78) : 85 - 87.
22. FERNANDEZ BA, SIEGEL-BARTELT J, HERBRICK JA, TESHIMA I, SCHERER SW : (2005) : Holoprosencephaly and cleidocranial dysplasia in a patient due to two position-effect mutations: case report and review of the literature. *Clin Genet.* 68 (4) : 349 - 359.
23. MAUGEY- LAULOM B (1994) : Anomalie de la ligne médiane. In : *Diplôme d'Université d'Echographie en Gynécologie- Obstétrique.* 2 (1) : 144 -146.
24. SITU D, REIFEL CW, SMITH R, LYONS GW, TEMKIN R, HARPER-LITTLE C et PANG SC (2002) : Investigation of a cyclopic, human, term fetus by use of magnetic resonance imaging (MRI) *J Anat* 200 : 431- 438
25. CHANG : LH. Alobar holoprosencephaly : report of two cases with unusual findings (2003). *Chang Gung Med J.* 26 (9) : 700 - 706
26. DUBOURG C, LAZARO L, BLAYAU M, PASQUIER L, DUROU MR, ODENT S, DAVID V (2003) : Etude génétique de l'holoprosencéphalie. *Annales de Biologie Clinique.* 61 (6) : 679 - 687

LA MALADIE DE GUMBORO DANS LES ELEVAGES DE POULETS

IMPORTES EN REPUBLIQUE DU BENIN :

ASPECTS HISTOLOGIQUES DE LA BOURSE DE FABRICIUS

GANGBO¹ Flore, EDORH² Patrick, DOUGNON³ Jacques, KPODEKON³ Marc, TOSSA¹ Apolline, KOTTIN¹ Théophile, DARBOUX¹ Raphaël



¹Unité de Biologie Humaine, Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, B.P.188, Cotonou, Bénin.

²Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Université d'Abomey-Calavi, 01B.P. 526, Cotonou, Bénin.

³Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), Département de Productions Animales, Laboratoire de Recherches en Biologie Appliquée (LARBA), Université d'Abomey-Calavi (UAC), 01B.P. 2009 Cotonou, Bénin.

Auteur pour la correspondance : GANGBO¹ Flore, Unité de Biologie Humaine, Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, 01B.P.188, Cotonou, Bénin., Tél : 00 (229) 95 84 49 29, E-mail : armandegangbo@yahoo.fr

RESUME

Des cas de maladie de Gumboro ont été mis en évidence dans les élevages de poulets importés (poulettes futures pondeuses, poulets de chair) en 2003 et en 2005. C'est la première fois que cette maladie a été diagnostiquée en République du Bénin par méthode histologique. Les lésions classiques de cette virose, révélées lors du diagnostic histologique ont confirmé sa présence dans les bandes de poulets vaccinés en 2003 avec le vaccin TAD Gumboro du Laboratoire Laprovét, Paris-France. La persistance de cette affection virale pose le problème du statut immunitaire des poussins d'un jour importés de différents horizons (France, Belgique, Hollande, Italie, Ghana, Nigéria) ou produits dans des couvoirs locaux. Les éleveurs de poulets importés sont aussi interpellés sur leurs différentes pratiques d'élevage.

Mots-clés : Poulets importés, Maladie de Gumboro, Vaccination.

ABSTRACT

Many cases of Gumboro disease have been underlined in the imported chickens (including chicks for future laying) breeding in 2003 and 2005. It is the first time that these disease has been diagnosed in Benin Republic with histological method. The classical lesions of that viral disease, revealed by the histological diagnose confirmed its presence in the series of chickens vaccinated in 2003 with TAD Gumbobro vaccine of Laprovét laboratory, Paris-France. The persistence of that biological ailment raised the immune status problem of one day chicks imported from different horizons (France, Belgium, Italy, Ghana, and Nigeria) or from local incubating centres. For their different breeding practices breeders of imported chickens are then sharply addressed to.

Key words: Imported chickens, Gumboro disease, Vaccination.

INTRODUCTION

La maladie de Gumboro ou bursite infectieuse est une pathologie virale causée par un virus de la famille des *Birnavirus*. Elle se rencontre surtout dans le genre *gallus*. Cette maladie a été découverte pour la première fois aux U.S.A, près du village de Gumboro dans le Delaware, par Cosgrove en 1962. Elle est actuellement mondialement répandue et en pleine recrudescence (Villate, 1997). On l'a décrite chez le faisan (Van den Berg et coll., 2000). Le canard et le dindon développent des formes subcliniques inapparentes.

La maladie de Gumboro est la «maladie aux deux visages» en fonction de l'âge où survient l'infection :

- durant les deux premières décades de vie, l'infection précoce provoquera une immuno-

suppression sévère (Van den Berg et coll., 2000).

- de 3 à 6 semaines, c'est l'âge de la plus grande sensibilité au virus. Il y a apparition des formes cliniques de la bursite infectieuse.

-

Le virus de la maladie de Gumboro est très résistant dans le milieu extérieur (Vindevoguel, 1992) ; ce qui lui permet de persister pour une longue durée et de ce fait constituerait une source permanente d'infections et de réinfections. Cette maladie a sévi en République du Bénin en 2003 et a repris en 2005 sur tout le territoire national ; ceci, malgré la disponibilité de vaccins vivants atténués et de vaccins inactivés contre cette pathologie. L'accalmie observée entre la période allant de 2003 à 2005 est due à l'utilisation du vaccin vivant atténué

Bur-706 du Laboratoire Mériat, Paris en remplacement du Gumboral-CT. Ce dernier vaccin a été retiré de la vente au Bénin après le premier épisode épidémique de la maladie de Gumboro mais a été réintroduit en 2005.

MATERIEL

Les manifestations ont concerné des poulettes futures pondeuses et des poulets de chair âgés de 6 à 8 semaines. Ces oiseaux étaient issus de différents couvoirs provenant de la Belgique, de la Hollande, du Nigéria, du Ghana et du couvoir local de Pahou. Les premiers signes de la maladie de Gumboro sont apparus dans les élevages de poulets importés dans tous les départements :

Atlantique-Littoral, Ouémé-Plateau, Zou-Collines, Mono-Couffo, Borgou-Alibori, Donga-Atacora. Le premier cas a été détecté le 18/02/2003 dans le département de l'Atlantique-Littoral, zone à forte concentration d'élevage de poulets importés. L'épidémie a

repris le 27/05/2005 dans tous ces départements précités.

METHODE

Signes cliniques

Les sujets de 6 à 8 semaines apparaissent avec une diarrhée aqueuse blanchâtre avec le cloaque souillé. Certains poulets se sont livrés au picage. Ils étaient prostrés, les plumes ébouriffées avec une faiblesse générale et une démarche vacillante.

Examen nécropsique

Les autopsies ont porté sur 30% de l'effectif de chaque bande affectée : 20% de poulets fraîchement morts et 10% de poulets en pleine crise.

Examen histologique

Des coupes histologiques de 5µm d'épaisseur ont été réalisées au niveau de la bourse de Fabricius sur plusieurs blocs d'inclusion. Les lames colorées à l'hémalum-éosine (HE) ont été observées au microscope à fond clair.

RESULTATS

Suivant les localités affectées par l'épidémie, il a été rapporté une mortalité variant entre 60% et 93%.

Tableau I : Différentes localités affectées et mortalité par la maladie de Gumboro.

Localité	Date d'apparition de la maladie de Gumboro	Âge	Mortalité (%)	
			Nombre	Pourcentage
Abomey-Calavi	18/02/2003	42 jours	4000	60
Allada	20/02/2003	40 jours	2000	75
Tori	20/02/2003	35 jours	500	67
Abomey	12/05/2005	35 jours	3000	69
Bohicon	20/02/2003	50 jours	3000	70
Cotonou	13/5/2005	49 jours	4000	90
Porto-Novo	20/02/2003	37 jours	4000	91
Sakété	11/5/2005	33 jours	4000	93
Comè	23/02/2003	35 jours	1000	80
Lokossa	13/5/2005	34 jours	1500	82
Savè	13/05/2003	34 jours	500	62
Parakou	22/02/2003	38 jours	3000	75
Natitingou	14/05/2005	40 jours	1500	80

Les examens nécropsiques retrouvent une bourse de Fabricius nettement plus augmentée que la normale.

Sur les Figures 1 et 2, on observe respectivement une bourse de Fabricius normale et celle hypertrophiée d'un poulet malade.



Figure 1: Bourse de Fabricius de poulet normal.



Figure 2 : Bourse de Fabricius hypertrophiée de poulet malade. Elle est plus volumineuse que celle du poulet normal.

Sur les Figures 3 et 4, on observe respectivement une coupe transversale d'une bourse de Fabricius de poulet normal qui présente un aspect lisse avec des replis serrés au niveau de la lumière de l'organe, comparée à une autre issue d'un poulet malade et dont l'aspect irrégulier présente un corps plus gélatineux avec des replis larges.

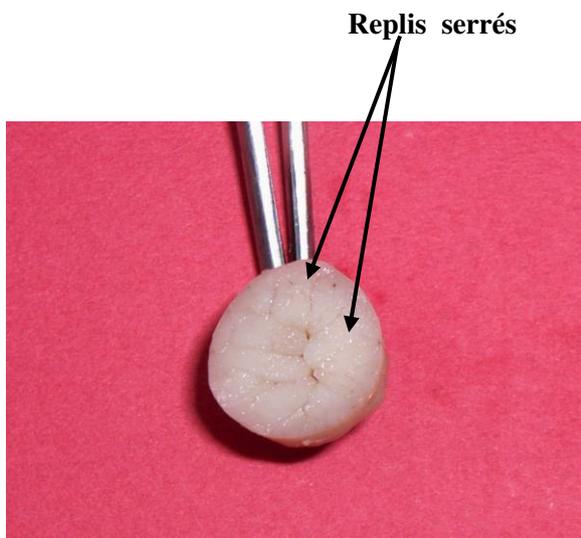


Figure 3 : Coupe transversale de la bourse de Fabricius de poulet normal : l'aspect est lisse.

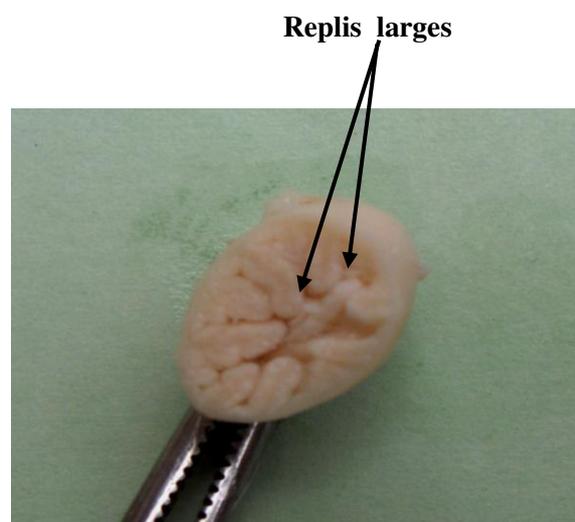


Figure 4 : Coupe transversale de la bourse de Fabricius de poulet malade : l'aspect est irrégulier.

L'examen microscopique fournit la preuve d'une atrophie des follicules lymphoïdes

La Figure 5 montre la structure histologique normale d'une bourse de Fabricius normale colorée à l'hémalun-éosine (HE) et dont le chorion des replis est riche en follicules tassés les uns contre les autres. Par contre, la Figure 6 montre la structure histologique d'une bourse de Fabricius issue d'un poulet malade, également colorée à l'hémalun-éosine (HE) et qui présente un œdème interfolliculaire et des nécroses des follicules.

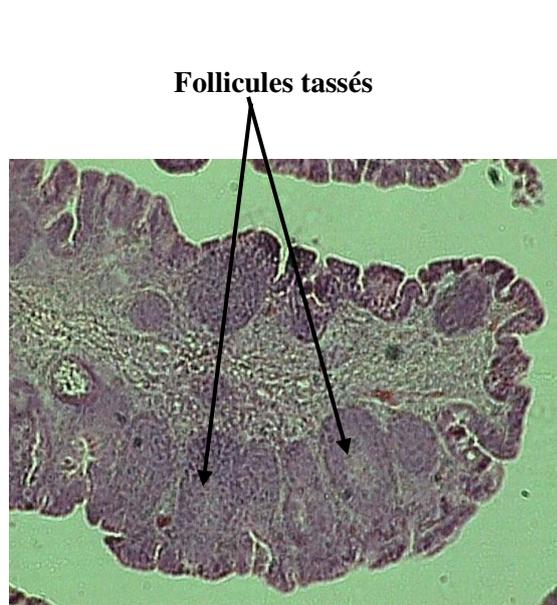


Figure 5: Coupe d'une bourse de Fabricius normale montrant de nombreux follicules tassés.

Coloration : HE (X200)

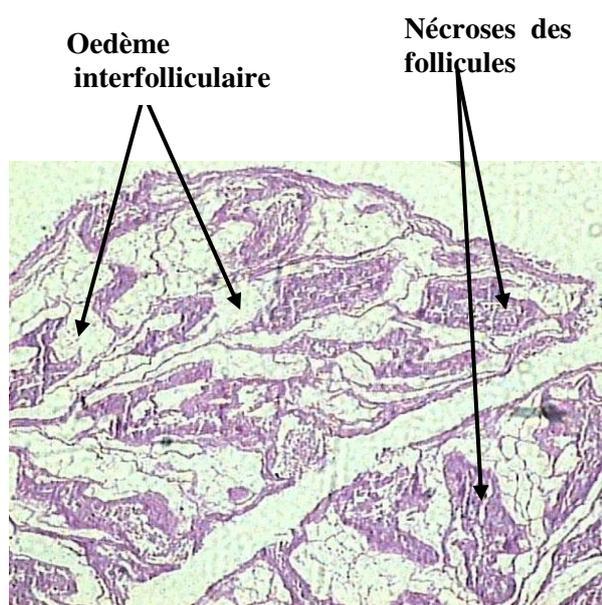


Figure 6: Coupe d'une bourse de Fabricius malade montrant un œdème interfolliculaire et des nécroses des follicules.

Coloration : HE (X 200)

DISCUSSION

Les lésions histologiques observées dans les bourses de Fabricius des poulets atteints de la maladie de Gumboro 48 heures après le déclenchement consistent en une dégénérescence et nécrose des lymphocytes de quelques follicules de la bourse de Fabricius.

Ces lésions observées au niveau de la bourse de Fabricius sont similaires à celles décrites par Allan et coll.; (1972) et sont proches de ceux de Brugere-Picoux et Silim (1992). Ces

derniers ont montré que la réversibilité des lésions histologiques de la bourse de Fabricius dépend de l'importance de la destruction du système réticulo-histiocytaire.

Dans le contexte avicole du Bénin, la prophylaxie médicale contre la maladie de Gumboro consiste en l'utilisation dans l'eau de boisson de TAD Gumboro du Laboratoire Laprovét, Paris-France. Ce vaccin a été remplacé après l'épidémie au niveau national en 2003 par le vaccin Bur-706 du Laboratoire Merial. Le vac-

cin TAD Gumboro s'utilisait le 7^{ème} jour avec rappel deux semaines plus tard. Quant au vaccin Bur-706, les aviculteurs l'utilisent dès le 1^{er} jour d'âge des poussins avec rappel deux semaines plus tard en République du Bénin. Le déclenchement de l'épidémie de la maladie de Gumboro dans l'un ou dans l'autre cas d'utilisation de ces deux vaccins constitue une contrainte dans l'élevage des poulets importés; ce qui nous a poussé à mener une enquête sur les pratiques d'élevage au Bénin en vue d'une analyse exhaustive de ces différents épisodes d'épidémie de la maladie de Gumboro.

Les taux de mortalité variant de 62% à 93% sont plus élevés que ceux observés par Jourdain (1990) et Villate (1997) où ces auteurs ont respectivement rencontré 10% et 15% comme taux de mortalité chez des poulets atteints de la maladie de Gumboro. Par exemple, au cours de différents entretiens avec les éleveurs, il a été constaté que seuls 50% des éleveurs observent le vide sanitaire.

Les résultats de terrain indiquent que très peu d'élevage obéit aux normes d'élevage. Qu'il s'agisse des normes d'implantation des poulaillers ou du matériel utilisé, il a été rarement observé une adéquation entre le nombre de mangeoires ou d'abreuvoirs et l'effectif de la volaille. Selon, Aliou (2001), le pourcentage d'éleveurs qui observent le vide sanitaire serait de 59.2%, norme limite déterminée par Smith (1992).

Les réponses données par les éleveurs ont permis de conclure que 80% d'entre eux importent leurs poussins d'un jour d'Europe contre 81% rapporté par Aliou (2001). Le reste l'acquiert du couvoir local des «Poussins du Roi» de Pahou, du Ghana et du Nigéria.

La faible part accordée au couvoir de Pahou serait due selon N'Noume (2000), à la faible capacité de cette unité de produire des oiseaux en quantité et en qualité. Cette affirmation a été confirmée par Aliou (2001), qui a rapporté qu'au niveau des «Poussins du Roi», le seul critère utilisé dans le contrôle sanitaire des poussins produits est la vigueur et la cicatrization de l'ombilic. Aucun contrôle sanitaire n'est exécuté bien que l'importance d'un contrôle de qualités des produits ait bien été spécifiée par Arbelot et coll., (1998).

Pour ces derniers, le contrôle pourrait s'étendre jusqu'aux animaux reproducteurs.

Les investigations ont rapporté également que la plupart des éleveurs préparent ou achètent leur aliment dans les fabriques prestataires de service. Les effets néfastes de ces pratiques ont été largement discutés par Bastianelli et coll., (1998) et confirmés par Aliou (2001). Il n'y a pas sur le territoire du Bénin un protocole commun de protection contre les grandes pathologies infectieuses. Si la Direction de l'Élevage dispose d'un centre de commande des produits biologiques, il a été noté que la provenance des intrants vaccinaux est variée et est contraire aux conditions draconiennes à observer dans le transport et la conservation de ces produits.

Lorsque l'on prend en compte le suivi vétérinaire, seulement 4% des exploitations sont suivies par un personnel qualifié. Cet état de choses pourrait être expliqué certainement par la confusion faite par la population ou les exploitants sur la dénomination vétérinaire. En effet, selon la grande masse, tout agent d'élevage est vétérinaire. La perception des producteurs sur l'efficacité des vaccinations qu'ils effectuent indique que ces derniers ne sont pas du tout satisfaits des résultats vaccinaux.

En effet, 44% des exploitations modernes visitées ont reconnu que des épizooties d'origine inconnue ont éclaté même après des séances d'immunisation bien faites selon eux. Cette situation pourrait s'expliquer par une insuffisance de formation des éleveurs; ce qui aurait entraîné des erreurs techniques au cours du processus vaccinal ou par la méthode vaccinale utilisée. En effet, il pourrait s'agir des produits biologiques utilisés ou de la méthode vaccinale dont la plus couramment utilisée par les éleveurs est l'eau de boisson. Cette méthode bien qu'elle soit la plus facile, est la moins fiable car on ne sait jamais la dose exacte reçue par les oiseaux (Halajkann, 1996).

Ainsi lorsqu'un oiseau reçoit une dose inférieure à la normale, il pourra faire la maladie malgré la vaccination. Cela pourrait être aussi une cause intrinsèque aux oiseaux; par exemple la variation de l'état physiologique, immunitaire surtout en ce qui concerne le Gumboro (Kreager, 1989) et l'état de santé général des oiseaux. On pourrait aussi expliquer cela par le fait que des vaccins utilisés

étaient périmés. Aussi, il peut être observé parfois l'inhibition des anticorps par certains vaccins si ces derniers sont administrés très tôt aux poussins (Kreager, 1989).

Il est à noter qu'en dehors de quelques exploitations avicoles du Mono-Couffo où sont observées quelques similitudes dans leur programme de vaccination, nous avons autant de programmes de vaccination que d'unités visitées. Certains éleveurs établissent les calendriers de vaccination sans tenir compte de l'épidémiologie de leur zone. Ce fait pourrait être à la base de l'échec vaccinal. Selon Halajkann (1996), l'application d'un programme de prophylaxie doit être raisonnée et réalisée collectivement. Cela permet non seulement d'apporter une protection à un élevage donné mais aussi permet de limiter la diffusion des agents infectieux. Il faut donc une volonté collective et une certaine fédération des exploitations avicoles pour une harmonisation des programmes de vaccination pour une zone épidémiologique donnée. On remarque dans toutes ces pratiques sanitaires qu'il n'y a aucune harmonie. Cela s'expliquerait par la disparité du niveau de formation des acteurs de la

filière avicole ou de l'inexistence des Associations ou de Groupements. Ces derniers devraient permettre d'uniformiser les pratiques afin d'avoir un programme de vaccination fédérateur.

CONCLUSION

Nos travaux nous ont permis d'observer dans les bourses de Fabricius des poulets affectés la présence d'importantes inflammations, d'oedèmes interfolliculaires et de nécroses folliculaire.

Les épisodes répétés de la maladie de Gumboro posent le problème des échecs vaccinaux dans les élevages de poulets importés. Ceci doit amener tous les acteurs de la filière avicole à adhérer à un programme de vaccination fédérateur qui tiendrait compte de la virulence et du comportement du virus de la maladie de Gumboro dans le contexte avicole en République du Bénin. Par ailleurs, l'Etat doit renforcer son rôle régalien en matière de contrôle des produits biologiques importés; ce qui implique la mise en place de Laboratoires d'Analyses Vétérinaires efficaces.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aliou Y., (2001). Contribution à l'étude des caractéristiques dominantes de gestion technique des exploitations avicoles commerciales des grandes agglomérations au Sud-Bénin. Mémoire de fin d'études au Collège Polytechnique Universitaire d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi. 65p.
2. Allan W.H., Faragher J.T., Cullen G.A. (1972). Etude des pathologies aviaires. *Vet Rec.*, **90** : 511.
3. Arbelot B., Dayon J.F., Ramis D., Gueye J.C., Tall F., Samb H., (1998). Enquête sur la prévalence sérologique des principales pathologies aviaires au Sénégal : mycoplasmoses, pullorose, typhose, maladie de Newcastle, maladie de Gumboro et bronchite infectieuse. *Elev. Vét. Pays Trop*, **50** (3) : 197-203.
4. Bastianelli D., Arbelot B., Guerin H., (1998). Développement et organisation des filières avicoles autour de Dakar : L'agriculture périurbaine en Afrique subsaharienne. Actes de l'atelier international tenu à Montpellier du 20 au 24 avril 1998. Edités par Moustier P., M'baye A., De Bon H., Guérin H. et Pages J. 167-172.
5. Brugère-Picoux J. et Silim A., (1992). Manuel de pathologie aviaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (France), *Rec. Méd. Vét*, 1^{ère} édition 150-155.
6. Halajkann M., (1996). Aviculture et pratique vaccinale: L'art et la manière de protéger son cheptel. Dossier vaccination. *Afrique Agriculture* **237** : 67-78.
7. Jourdain I. (1990). L'alimentation en milieu tropical. Collection «La technique » Paris- France. 82-126.
8. Kreager K., (1989). Infections Bursal diseases. Vaccination timing in relation to maternal antibody decline. Proceedings International Conference held from 19 to 22 June in Dorint Hotel Wesserberglund, Hamelkon, Germany.
9. N'Noume L., (2000). La filière poulet dans le Sud-Bénin : Etat des lieux. Mémoire de fin de cycle CPU/UNB Abomey-Calavi. 56 p.

10. Villate D., (1997). Maladies des volailles. 1ère édition. Editions France Agricole. 398 p.
11. Van den Berg T. P., Etteradossi N., Toquin D., Meulemans G. (2000). La bursite infectieuse (maladie de Gumboro). Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.; 19 (2) : 527-543.
12. Vindevoguel H., (1998). Conduite sanitaire et Management des Elevages Avicoles. Office des Cours Cureghem. 135 p.



**CONSOMMATION D'ALIMENTS GOITRIGENES ET TROUBLES DUS A LA
CARENCE EN IODE (TDCI) DANS LE DEPARTEMENT DES COLLINES EN
REPUBLIQUE DU BENIN**

TOKOUDAGBA-PADONOU I¹, AKPONA A. S¹, ABOUDOULAYE I², GOMINA
ASSOUMANOU M.¹

1 UER de Biochimie BP 123 Parakou République du Bénin
2 Laboratoire de Biochimie CNHU HKM Cotonou Bénin

RÉSUMÉ

Les troubles dus à la carence en iode (TDCI) constituent encore de nos jours, un véritable problème de santé publique dans le Département des collines. En effet, en dépit d'une iodation correcte du sel de cuisine dans la localité, la grande majorité de la population présente encore des risques sévères ou modérés de troubles. Parmi elle : 3,75% développe un goitre avant l'âge de 20 ans ; 8,33% ont une thiocyanatémie en dessous du seuil de tolérance, 20% présentent un taux élevé de thiocyanaturie et 20,40% ont des troubles thyroïdiens patents.

Ces problèmes auraient pour cause, la consommation de manioc, base de l'alimentation dans la région, et riche en glycosides cyanogènes.

Les auteurs recommandent vivement un changement dans le procédé de transformation de ce tubercule avant sa consommation.

Mots clés : - troubles dus à la carence en iode (TDCI), Goitre, thiocyanate, glycoside cyanogène.

SUMMARY

The Disorders Due to the Iodine Deficiency (TDCI) is still a major public health problem in the Department "des Collines". This situation is normal according to the well iodine enrichment of cooking salt in this area by the national program. We found out: 3,75% cases of goitre among the population; 8,33% of them have blood thiocyanate rate under the accepted value and 20% of the population present a high urine elimination of this compound; 21,40% of thyroid disorders are found within the studied population.

It is recommended the population to adopt another form of cassava consumption.

Key words : - Disorders Due to the Iodine Deficiency (TDCI), Goitre, thiocyanate, glycosides cyanogens.

INTRODUCTION

Fléau social tant dans les pays à haut niveau de vie que dans les zones en développement, les troubles dus à la carence en iode (TDCI) constituent encore de nos jours un véritable problème de santé publique [3,7].

Conformément aux recommandations internationales qui préconisent une iodation systématique du sel de cuisine, un programme national de lutte contre les TDCI travaille au Bénin depuis 1985. L'évaluation des activités de ce programme a permis d'identifier les départements du Borgou et des Collines comme étant des régions où persiste encore l'endémie goitreuse [4,10].

En effet, malgré une iodation acceptable du sel de cuisine dans ces deux localités, on y retrouve encore des cas de goitre à des proportions non négligeables, 40,8% dans le Borgou contre 47,5% dans les collines. L'environnement, le mode de vie et surtout les habitudes alimentaires pourraient être incrimi-

nés dans la persistance anormale de cette situation.

Le but de ce travail est préciser le rôle délétère de la consommation du manioc séché et de certains aliments dans la genèse des TDCI dans deux localités du département des Collines.

**CADRE D'ETUDE, MATERIEL ET
METHODES**

Les localités de Savè et de Tchalla Ogoï ont servi de cadre à l'enquête préliminaire. Les élèves et écoliers des établissements primaires et secondaires de ces localités se sont prêtés, après consentement éclairé, aux différents prélèvements de sang et d'urine pour les déterminations biochimiques. Au total, 240 écoliers et élèves, tout sexe confondu, ont été prélevés. Le laboratoire de biochimie du Centre Hospitalier et Universitaire de Cotonou est le lieu où le dosage des différents paramètres de l'étude a été réalisé.

Il s'agit d'une étude transversale de type descriptif et analytique. Elle porte, comme signalé plus haut, sur une population d'écoliers et d'élèves des deux sexes, âgés de 6 à 18 ans et sélectionnée, le matin, au hasard de leur arrivée à l'école et après un consentement éclairé. Ceci a permis de ne retenir que 240 enfants. Ils sont repartis en 116 enfants de sexe féminin soit 41,80% des cas contre 124 sujets de sexe masculin soit 51,66% des cas, avec un sexe ratio de 1,07 en faveur des garçons.

Des prélèvements sanguins et urinaires ponctuels ont été réalisés chez chacun des enfants à distance du dernier repas (10 heures). Le sérum décanté puis congelé et les urines prélevées sur azide de sodium et conservées au

frais avant d'être utilisés pour le dosage des paramètres retenus dans le cadre de l'étude. Le dosage de la TSH et de la T4 libre a utilisé une technique immuno enzymatique de type sandwich avec un réactif des Laboratoires RANDOX. La détermination de l'iode urinaire a fait appel à une méthode dérivée de celle décrite par Sandell et Kolthoff (1937) et qui utilise la réduction des sels cérriques jaunes en sels cérreux incolores. L'accélération de la réaction est proportionnelle à la teneur en iode qui agit comme catalyseur dans le milieu réactionnel.

Cette méthode a été standardisée et permet de mesurer des taux d'iode compris entre 0,1 et 100µg/l [9]. La mesure du taux de thiocyanate sanguin et urinaire a utilisé la technique de Bowler [2]

RESULTATS

L'enquête préliminaire

Elle a porté sur les habitudes alimentaires de la population et concerne la consommation d'aliments goitrigène comme le manioc et ses dérivés, les modalités de sa transformation avant la consommation et le mode de cuisson. Cette enquête a permis de se rendre compte que le manioc est l'aliment de base dans ces localités comme le montre le tableau n°1.

Tableau n° : 1 – Répartition de la population d'étude selon le degré de la consommation du manioc ou de ses dérivés.

Localité	Consommation journalière de manioc				TOTAL	
	+ de 2 fois/j		au moins 1 fois/j		Nbre	%
	Nbre	%	Nbre	%		
SAVE	124	51,66	08	3,33	132	55
CHALLA OGOÏ	97	40,41	11	4,56	108	45
TOTAL	221	92,70	19	7,89	240	100

En effet, plus de 98% des enquêtés consomment du manioc. Environ 83% déclarent le manger au moins deux fois ou plus dans la même journée au cours des principaux repas. Le taux d'iodation du sel de cuisine est satisfaisant dans les deux centres. Enfin, on note que, 3,75% des enfants présentent déjà un goitre visible à l'œil nu bien que l'enquête n'ait pas visé la recherche systématique de cette tumeur.

L'enquête biologique

Les indicateurs biologiques des troubles de la gestion de l'iode que nous avons mesurés sont : la TSH ultrasensible, la T4 libre, l'iode urinaire et, le thiocyanate sanguin puis urinaire. Le tableau n° 2 présente les résultats d'une telle approche et compare les garçons aux jeunes filles de l'échantillon.

Tableau n° : 2 – Valeurs comparées des paramètres étudiés par tranche d'âge

Age	6-8ans (n=30)	9-11ans (n=90)	12-14ans (n=94)	15-18ans (n=26)
Paramètres				
ThioU mg/l	60,40 ± 34	63,50 ±35	52,50 ± 22	52,45±32
IodU µg/dl	37,30 ±16	36,40 ±16	34,80± 14	35,80±17
ThioU/IodU	1,65±0,65	1,82±0,91	1,70±0,96	1,52±0,75
ThioSang mg/l	8,90±6	10,44±8,8	9,90±7,4	12,40±2,3
TSHus µU/ml	2,73±1,8	2,63±1,5	2,54±1,3	2,92±1,04
T ₄ L ng/dl	2,21±1,4	1,68±0,93	1,83±0,44	1,50±0,63

Le taux de la TSH combiné à celui de la T4 libre permet de retrouver 21,30% de perturbations thyroïdiennes dont 13,33% pour les sujets de sexe féminin. Ces résultats permettent d'analyser les différents profils de la population par rapport aux paramètres retenus. En effet, à partir de ces données, les perturbations observées permettent de classer les enfants en deux sous groupes, en fonction du sexe tableau n° 3.

Tableau n° : 3 – Profil hormonal thyroïdien de la population d'étude

Sexe	MASCULIN				FEMININ				TOTAL			
	Perturbation		Euthyroïdie		Perturbation		Euthyroïdie		Perturbation		Euthyroïdie	
Provenance	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
SAVE	10	4,2	55	22,9	17	7,1	50	20,8	27	11,25	105	43,70
CALLA OGOÏ	9	3,75	50	20,8	15	6,25	34	14,2	24	10	84	35
TOTAL	19	7,91	105	43,73	32	13,3	84	35,0	51	21,30	189	78,70

L'iode urinaire

La gravité des TDCI est évaluée en se basant sur le taux médian de l'iodurie [8]. L'étude de la répartition de notre population par rapport à ce critère ne montre pas une carence en iode mais plutôt une tendance nette à un taux élevé voire fortement élevé de l'iode urinaire.

La thiocyanatémie et la thiocyanaturie

La thiocyanatémie est anormale c'est-à-dire élevée de façon péjorative lorsque son taux est supérieur à 20mg/l. Une telle observation n'est faite que chez 20 enfants, tout sexe confondu, de notre échantillon soit 8,33% des cas qui risquent un TDCI.

Quant aux valeurs de la thiocyanaturie, son taux permet de distinguer des sujets normaux (taux < 20mg/l), des sujets à haut risque (taux compris entre 20 et 80mg/l) et des sujets présentant une toxicité (taux >80mg/l). Notre population comporte 9,6% de sujets sans risque contre, respectivement, 70,4% de sujets à haut risque et 20% de sujets au dessus du seuil de toxicité.

Le rapport thiocyanate urinaire sur l'iode urinaire (ThioU/IodU)

L'analyse du rapport thioU sur IodU selon les critères de Delange et Coll. [5] est très intéressante. Ce rapport définit mieux les risques de TDCI. En effet, pour :

- un rapport <2 le risque est sévère.
- un rapport entre 2 et 7, le risque est modéré, et,
- un rapport supérieur à 7, le sujet est sans risque.

Par rapport à ce critère, 72% de notre population présentent un risque sévère contre 29% de risque modéré sans aucune différence significative entre le deux sexes, tableau 4.

Tableau n° : 4 – Répartition du rapport ThioU sur IodU en fonction du sexe

Sexe	MASCULIN		FEMININ		TOTAL		SIGNIFICATION
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	
ThioU/IodU							
< 2	84	35	86	35,83	170	71,8	TDCI sévère
2 à 7	40	16,66	29	12,08	69	28,8	TDCI modéré
> 7	-	-	1	0,4	1	0,4	Pas de carence

COMMENTAIRES

La civilisation des tubercules est celle que l'on rencontre dans la plupart des localités du département des collines. Cela explique que la grande majorité des populations de Savè et de Challa Ogoï consomme du manioc comme aliment de base bien que l'on y rencontre d'autres types de tubercules. Le manioc est consommé bouilli, cru ou après séchage sous forme de cossette, forme de conservation par évaporation d'eau qui concentre les glycosides cyanogènes dans le reste de la racine.

Les Troubles Dus à la Carence en Iode (TDCI) sont visibles puisque 3,75% des enfants portent déjà un goitre avant l'âge de 20 ans et que, au regard de la TSH et de la T4 libre, 21,20% présentent des perturbations parmi lesquels 13,30% sont du sexe féminin. Cette prédominance féminine n'est qu'apparente puisque l'analyse affinée des autres paramètres permet de ne retenir que 8,33% seulement de la population comme des sujets présentant un risque réel de TDCI surtout au regard de la thiocyanatémie. Ce faible pourcen-

tage est en définitive certainement en rapport avec une assez bonne élimination urinaire du composé toxique. Il confirme d'un autre côté que la thiocyanatémie n'est pas un bon marqueur de l'intoxication aux substances goitrigènes.

L'analyse du taux de l'iode urinaire ne retrouve pas de risque de TDCI. En effet, l'élimination urinaire de l'iode dépasse largement les 10µg/dl recommandés par l'OMS [8]. L'une des explications serait que l'iode disponible ne serait pas convenablement utilisé par la glande pour ses besoins de synthèse. La carence en iode ne serait donc qu'apparente puisque un certain défaut de captation de l'iode disponible pourrait être à la base du taux élevé de son élimination urinaire.

Le rapport thiocyanate urinaire (ThioU) sur l'iodurie (IodU) permet de mieux expliquer la situation. Il montre que plus de 99% de la population présentent un risque élevé ou /et modéré. Il donne mieux le vrai visage des effets délétères de la consommation d'aliments goitrigènes comme le manioc surtout dans sa variété amère, très riche en glycosides cyanogènes. L'accumulation de ses glycosides dans l'organisme s'expliquerait d'une part par le mode de conservation de ce produit et, d'autre part, par l'importance de la quantité consommée par jour par la population pour qui le manioc séché constitue l'aliment de base. Or le processus d'élimination de la linamarine et de la lotaustraline du manioc par l'organisme passe par leur transformation en thiocyanate. Le thiocyanate est un facteur goitrigène directe qui empêche la captation de l'iode par la glande thyroïde [3,6]. On comprend, pourquoi dans notre étude, les taux d'élimination de

l'iode et du thiocyanate urinaires sont si élevés de même que celui du thiocyanate sanguin. Cela explique, d'un autre côté, le paradoxe entre le fait qu'une iodation satisfaisante du sel de cuisine coexiste avec des risques sévères et modérés de TDCI dans la population des Collines en général et, à Savè puis à Challa Ogoï en particulier. Dans ce département comme dans celui du Borgou, les TDCI ne seraient plus donc le fait d'une insuffisance de l'iode dans l'alimentation, mais plutôt, ils seraient dus à d'autres facteurs tels que ceux contenus dans les aliments dits « goitrigènes » comme le manioc, le sorgho largement consommé dans le Borgou, le chou et leurs dérivés [5,6].

CONCLUSION

En dépit de l'efficacité constatée de la campagne d'iodation du sel de cuisine dans les départements du Borgou et des Collines, les TDCI persistent et continuent d'être un véritable problème de santé pour nos populations. Cette situation est entretenue par les habitudes alimentaires séculaires qui conservent au manioc, aliment de base pour plus de 92% de la population dans les Collines, sa teneur en glycosides cyanogéniques sources de production d'une grande quantité de thiocyanate qui entre en compétition avec l'iode au niveau de la glande thyroïde pour induire ainsi des troubles. Un changement de comportement dans le mode de traitement et de conservation des aliments dits « goitrigènes » est donc nécessaire pour réduire et ou éliminer les effets délétères de ces aliments au niveau de l'organisme à l'instar de ce qui se fait déjà dans d'autres pays [1].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - **BOURDOUX P., MAFUTA M., VANDERPAS J. et Coll.**- Traditional cassava detoxication process and nutrition education in Zaïre In: - Cassava toxicity and thyroid research and public health issues. OTAWA, CRDI/IRDC, 1983; 134-135.
- 2 - **BOWLER R.G.** Kinetic spectrophotometric determination of thiocyanate based on its inhibitory effect on the oxidation of methyl by bromate Biochem. J., 1944, 38; 385p
- 3 - **BRUJN G.H.** The cyanogenic character of cassava In: - Chronic cassava toxicity OTAWA, CRDI/IRDC (10), 1973; 43-148.
- 4 - **DANA (Direction de l'Alimentation et de la Nutrition Appliquées)** Enquête nationale sur la prévalence des Troubles dus à la Carence en Iode (TDCI) en milieu scolaire primaire au Bénin. Rapport, 2001; 70pp
- 5 - **DELANGÉ F., ERMANS A.M.** Endemic goitre and cretinism. Naturally occurring goitrogens. Pharmacol. Ther. C, 1976, 1; 57-93
- 6 - **ERMAN A. M., BOURDOUX P., KINTHAERT S., LAGASSE K. et Coll.** Role of cassava in the aetiology of endemic goitre and cretinism In: - Cassava toxicity and thyroid research and public health issues. OTAWA, CRDI/IRDC, 1983; 9-16.
- 7 - **HETZEL B. S.** L'histoire de la carence en iode. Un déficit mondial en matière de nutrition. Oxford University Press, 1992, 38 - 75
- 8 - **OMS/UNICEF/ICCIDD** Indicateur d'évaluation des Troubles Dus à la Carence en Iode et de la lutte contre ces troubles par l'iodation du sel. WHO/NUT, 1994, 6, 1-39
- 9 - **SANDEL E.B., KOLTFF I.M.** Microdetermination of iodine by catalytic method. Mikroklim. Acta, 1937; 1, 9-25.

10 – UNICEF/BENIN Les activités de lutttes contre les Troubles Dus aux Carence en Iode (TDCI) appuyées par l'UNICEF au Bénin. Rapport, 1998 ; 60p.



ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE L'EXPRESSION DE L'ONCOPROTEINE pS2 DANS LES CARCINOMES CANALAIRES INFILTRANTS DE GRADES I, II ET III

EDORH¹ Aléodjrodo Patrick, AHISSOU¹ Hyacinthe, LALEYE² Anatole, DOUGNON³ Jacques Tossou, LEROUX-BROUSSIER⁴ Agnès, RIHN⁵ Bertrand

¹Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Université d'Abomey-Calavi, 01B.P. 526, Cotonou, Bénin.

²Unité de Biologie Humaine, Laboratoire de Cytogénétique, Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, B.P. 188, Cotonou, Bénin.

³Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), Département de Productions Animales, Laboratoire de Recherches en Biologie Appliquée (LARBA), Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Bénin.

⁴Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Centre Régional de Lutte contre le Cancer (Centre Alexis Vautrin), Avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cédex, France.

⁵Unité Inserm U525. Faculté de Pharmacie, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France.

Auteur pour la correspondance : Aléodjrodo Patrick EDORH, ¹Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Université d'Abomey-Calavi, 01B.P. 526, Cotonou, Bénin. Tél. : 00 (229) 97071596, E-mail : patrickedorh@yahoo.fr

RESUME

Le gène pS2 est l'un de ceux dont l'expression est contrôlée par l'œstradiol que ce soit dans les cellules mammaires humaines en culture MCF-7 ou dans les lésions tumorales du sein. Nous avons recherché par immunohistochimie la présence de pS2 dans 37 cas de carcinomes canaux infiltrants (CCI) : 3 CCI de grade I, 16 CCI de grade II et 18 CCI de grade III. Au total, 18 cas étaient positifs (48 %) : 2 positifs de grade I (66,7 %), 9 positifs de grade II (56 %), 7 positifs de grade III (39 %). 62 % des tumeurs exprimant la pS2 ont des récepteurs pour les estrogènes.

Cette étude montre l'utilité de l'analyse immunohistochimique de la protéine pS2 dans les carcinomes canaux infiltrants dans l'orientation des décisions thérapeutiques.

Mots-clés : Carcinomes canaux infiltrants, pS2, immunohistochimie, hyperexpression.

ABSTRACT

The pS2 gene is one of genes whose expression is controlled by estradiol, at both in the breast cancer cell line MCF-7 or in the human breast cancer. We have studied by immunohistochemistry the presence of pS2 in 37 infiltrating ductal carcinomas : 3 of grade I, 16 of grade II, and 18 of grade III. Our results have been showed 18 positive cases (48%) : 62% of tumors which have a pS2 hyperexpression presented estrogen receptors. This study shows the usefulness of immunohistochemical analysis of pS2 protein expression in the infiltrating ductal carcinomas in the orientation of therapeutical decisions.

Key words: Infiltrating ductal carcinomas, pS2, immunohistochemistry, hyperexpression.

INTRODUCTION

Le gène pS2 est l'un des gènes dont l'expression est contrôlée par l'œstradiol que ce soit dans les cellules mammaires humaines en culture MCF-7 ou dans les lésions tumorales du sein [1, 2]. La protéine pS2 est exprimée dans 45% à 70% des cancers du sein [3]. Afin d'apprécier la fonctionnalité des récepteurs aux estrogènes, la recherche de la protéine pS2 est proposée comme biomarqueur [4, 5]. Cette recherche a un intérêt pronostique; en effet, la durée de survie des patientes dont les tumeurs répondent aux hormones est en moyenne de un an et demi à deux ans supérieure à celles dont les tumeurs ne répondent pas à l'action des hormones stéroïdes.

La présence des récepteurs d'estrogènes a été détectée grâce à des anticorps monoclonaux (Laboratoires Abbott, Chicago, U.S.A.) sur des tissus congelés. Dans tous les cas, la présence des deux protéines RE (récepteur aux estrogènes) et pS2 est liée à celle de leurs ARNm. La présence de la protéine pS2 dans les cancers du sein reflète une augmentation de la transcription du gène pS2, comme cela avait été démontré antérieurement dans les cellules MCF-7.

Le gène pS2 a été cloné et séquencé [6, 7]; il est localisé sur le chromosome 21 en q22.3. La protéine pS2 présente des similitudes avec des facteurs de croissance tels que les insu-

line-like growth factors I et II qui sont des polypeptides sécrétés, constitués respectivement, de 67 et 70 acides aminés et renferment de nombreux résidus de cystéines.

L'ARNm de pS2 est induit par divers facteurs de croissance comme l'EGF, l'insuline, l'IGF-1 et le FGF [1, 8, 9]. La synthèse de pS2 est

sous le contrôle du récepteur d'estrogènes (RE). Les délétions dans la partie NH₂-terminale du RE bloquent la synthèse de la protéine pS2 [10]. La suppression de l'estradiol dans les cultures de cellules MCF-7 [11, 12, 13, 14] entraîne la disparition de pS2 et la mort de la cellule [15].

MATERIEL ET METHODES

Patients

Trente sept prélèvements de carcinomes canaux infiltrants (CCI) mammaires (3 de grade I, 16 de grade II, 18 de grade III) (Tableau 1), ont été étudiés dans le Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du Centre Régional de Lutte contre le Cancer (Centre Alexis Vautrin, 54511 Vandoeuvre-Lès-Nancy, France). Il s'agit de pièces issues de mastectomies ou de prélèvements biopsiques, fixés dans du paraformaldéhyde et qui ont été inclus dans de la paraffine. Le diagnostic anatomopathologique a été réalisé par deux lecteurs indépendants.

Tableau 1 : Nombre de cas de carcinomes canaux infiltrants mammaires

Carcinomes canaux infiltrants	Nombre de cas
Carcinomes canaux infiltrants de grade I	3
Carcinomes canaux infiltrants de grade II	16
Carcinomes canaux infiltrants de grade III	18
Total	37

Technique immunohistochimique

Des coupes histologiques de 5 µm d'épaisseur, déparaffinées, ont été placées dans une solution à 3% de peroxyde d'hydrogène afin de neutraliser les activités de peroxydases endogènes pouvant être présentes dans les tissus, puis rincées dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline: NaCl 135 mM ; Na₂HPO₄ 8 mM ; KCl 2 mM ; KH₂PO₄ 1 mM ; MgCl₂.6H₂O 1 mM ; pH 7,2). Afin de réduire les marquages aspécifiques, les coupes ont été recouvertes d'une solution de sérum normal de chèvre pendant 5 minutes (solution de blocage prête à l'emploi, Kit LSAB-K681, Dako). L'excès de sérum a été ensuite éliminé. Après 5 minutes de rinçage au PBS à deux reprises, les coupes ont été incubées avec un anticorps de liaison biotinylé de souris et de lapin (Dako) pendant 10 minutes à température ambiante. Puis, elles ont été incubées en présence de l'anticorps primaire anti-oncoprotéine pS2 (anticorps monoclonal pS2 prêt pour emploi : AM 190-5M, EuroBio, Les Ulis, France) à température ambiante pendant 2 heures.

Les coupes ont été successivement rincées dans du PBS pendant 5 minutes, placées dans une solution contenant de l'Amino-3-Ethyl-9-Carbazole (AEC, Dako 697) et rincées à l'eau courante pendant 10 à 15 minutes. Elles ont été ensuite contre colorées avec de l'hématoxyline de Harris durant 15 secondes et rincées à l'eau distillée. Enfin ces coupes ont été immergées dans de l'eau ammoniacale (2 mL d'ammoniacale pour un litre d'eau), puis dans de l'eau bidistillée, ensuite dans de l'alcool absolu (passage), et enfin dans du toluène. Elles ont été montées entre lame et lamelle en milieu aqueux (EukittTM : Surgipath, Labonord, France) puis observées.

RESULTATS

Les tumeurs seront considérées comme positives si plus de 10 % des cellules sont marquées et négatives si plus de 90 % des cellules ne sont pas marquées.

La protéine pS2 était localisée dans le cytoplasme tandis que le RE se trouve exclusivement dans le noyau (Figure 1).

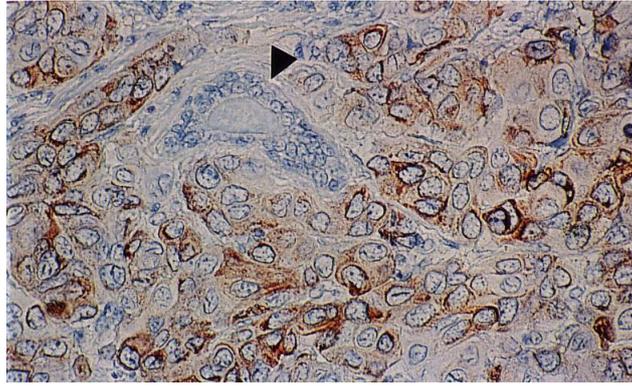


Figure 1 : Carcinome canalaire infiltrant de grade III : noter le marquage à l'anticorps anti pS2 du cytoplasme des cellules tumorales et l'absence de marquage des cellules d'un canal résiduel normal (Gr. x 250).

On observe souvent une densification périnucléaire correspondant probablement à l'appareil de Golgi. Le marquage par les anticorps est hétérogène (Figure 2).

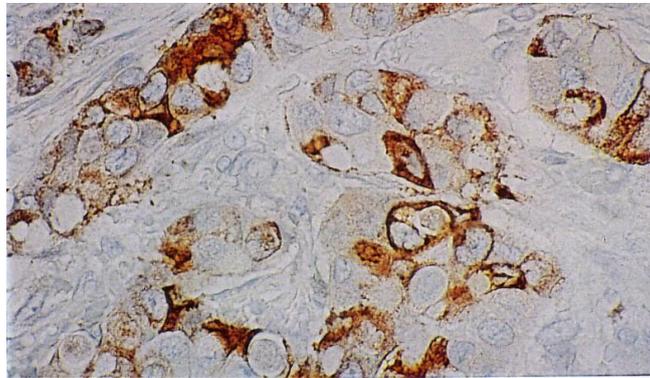


Figure 2 : Carcinome canalaire infiltrant de grade II : environ 60% des cellules néoplasiques montrent au niveau de leur cytoplasme un marquage à l'anticorps anti pS2 (Gr. x 400).

Au total, 18 cas étaient positifs (48 %), avec le taux diminuant avec la gravité : 2 positifs de grade I (66,7 %), 9 positifs de grade II (56 %), 7 positifs de grade III (39 %) (Tableau 2).

Tableau 2 : Résultats immunohistochimiques des carcinomes canaux infiltrants mammaires

Carcinomes canaux infiltrants	Nombre de cas	pS2 positif	pS2 négatif
Carcinomes canaux infiltrants de grade I	3	2	1
Carcinomes canaux infiltrants de grade II	16	9	7
Carcinomes canaux infiltrants de grade III	18	7	11
Total	37	18 (48 %)	19 (52 %)

DISCUSSION

Dans notre étude, les cas de tumeurs ayant exprimé la pS2 traduisent la présence de récepteurs pour les estrogènes. Nos résultats sont proches de ceux de Schwartz et coll., [16] et de Henry et coll., [3]; en effet, la mise en évidence de la protéine pS2 est un bon indicateur du pronostic. D'autres techniques peuvent être utilisées pour mettre en évidence les ré-

cepteurs à l'estrogène et à la progestérone et la protéine pS2. L'immunohistochimie peut donc être couplée au LBAs (Ligand-Binding Assays), étude dans laquelle il a été montré une importante corrélation entre ces deux méthodes [17]; elle peut également être couplée à l'immunoradiométrie [18].

Une étude rétrospective de 205 cytosols provenant de tumeurs du sein conservées dans

de l'azote liquide a été réalisée par dosage radio-immunologique de la protéine pS2.

En superposant les résultats immunohistochimiques des récepteurs pour l'estrogène, des récepteurs pour la progestérone et la présence de pS2 aux données cliniques et au suivi thérapeutique, des auteurs ont montré que l'évolution des tumeurs qui expriment la protéine pS2 était favorable comparée à celle des tumeurs qui ne l'exprimaient pas.

L'association entre la présence de la protéine pS2 et la réponse à l'hormonothérapie a été démontrée dans une étude *in vivo* portant sur 21 cas de cancers du sein [19]. Une liaison a été établie entre la présence de la protéine pS2 et la rémission de la maladie dans une étude immunohistochimique portant sur 72 cas de cancer du sein avec des métastases diverses chez des patientes ayant reçu un traitement hormonal. Dans le groupe des patientes où la recherche de la protéine pS2 était positive (pS2⁺), 52% ont eu une rémission partielle ou complète, et chez 24%, le processus tumoral était stable. Les taux sont plus bas dans le groupe des patientes où la recherche de la protéine pS2 était négative (pS2⁻), puisque 27% avaient une rémission partielle ou complète, et chez 10%, une stabilisation [16].

L'étude de Henry et coll., [3] incluant 172 cas de carcinomes mammaires et réalisée par dosage immunohistologique sur des coupes paraffinées, a conclu que la présence de pS2 dans la tumeur primaire est prédictive de la réponse à la thérapie hormonale.

Des études concernant plusieurs oncogènes ont révélé que la présence de pS2 ne paraît pas être corrélée au nombre de copies de l'oncoprotéine c-erbB-2 et que pS2 est expri-

mée quand le gène suppresseur de tumeur p53 ne l'est pas [20]. Khan et coll., [21] ont montré que le profil biologique des cancers du sein pourrait varier avec le cycle menstruel. La présence de l'oncoprotéine pS2 dans une lésion tumorale est donc le témoin de son caractère hormonosensible et de la bonne fonctionnalité des récepteurs d'estrogènes.

La pS2 pourrait jouer le rôle d'indicateur de pronostic dans les cancers du sein devant permettre de mieux définir les groupes de patients susceptibles de bénéficier d'une thérapie adjuvante [5].

CONCLUSION

Dans l'espèce humaine, il semble que les hormones jouent un rôle étiologique de premier ordre dans la genèse des cancers du sein, bien qu'un tiers des femmes bénéficient de l'administration d'hormones ou d'anti-hormones ainsi que de l'ablation d'une glande endocrine. La protéine pS2, comme facteur discriminant d'une population à haut risque, a fait l'objet de plusieurs études [22].

Depuis plus d'une décennie, l'une des préoccupations des chercheurs dans le domaine du cancer du sein se situe dans la recherche des facteurs pronostiques. Notre étude va dans ce sens et permet donc de mieux orienter la thérapie des patientes atteintes d'un cancer du sein apparemment non métastasé [2].

Les travaux de biologie moléculaire permettent actuellement de mieux connaître les mécanismes cellulaires de la sensibilité ou de la non-réponse des cellules du cancer du sein aux stimuli hormonaux. Il est aussi indispensable d'étudier plusieurs protéines à la fois pour mieux comprendre la pathogenèse des cancers du sein [20, 23, 24, 25, 26].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. RIO M. C., BELLOCQ J. P., GAIRARD B., KOEHL C., RENAUD R., CHAMBON P., 1988.- Expression spécifique du gène humain pS2 dans les cancers du sein. *Biochimie*, 70 : 961-968.
2. BESSE G., KWIATKOWSKI F., GAILLARD G., DAVER A., DALIFARD I., BASUYAU J. P., BRUNELLE P., WAFFLART J., ANGIBEAU R. M., AUVRAY E., GOUSSARD J., 1994.- Rôle pronostique de la protéine pS2 dans 1065 cas de cancer du sein. Etude multicentrique. *Bull. Cancer*, 81 : 289-296.
3. HENRY J. A., PIGGOT N. H., MALLICK U. K., NICHOLSON S., FARNDON J. R., WESTLEY B. R., MAY F. E. B., 1991.- PNR-2/pS2 immunohistochemical staining in breast cancer : correlation with prognostic factors and endocrine response. *Br. J. Cancer*, 63 : 615-622.
4. GION M., MIONE R., PAPPAGALO G. L., GATTI C., NASCIMBEN O., BARI M., LEON A. E., VINANTE O., BRUSCAGNI G., 1993.- pS2 in breast cancer- alternative or complementary tool to steroid receptor status? Evaluation of 446 cases. *Br. J. Cancer*, 68 : 374-379.
5. FOEKENS J. A., VAN PUTTEN W. L. J., PORTENGEN H., DE KONING H. Y., THIRION B., ALEXIEVA-FIGUSEH J., KLIJN J. G., 1993.- Pronostic value of pS2 and cathepsin D in 710 human primary breast tumors: multivariate analysis. *J. Clin. Oncol.*, 11 : 899-908.
6. JELTSCH J. M., ROBERTS M., SCHATZ C., GARNIER J. M., BROWN A. M., CHAMBON P., 1987.- Structure of the human estrogen-responsive gene pS2. *Nucl. Acids Res.*, 15 : 1401-1414.

7. ROBERTS M., WALLACE J., JELTSCH J. M., BERRY M., 1988. The 5' flanking region of the human pS2 gene mediates its transcriptional activation by estrogen in MCF-7 cells. *Biochem. and Biophys. Com.*, 151 : 306-313.
8. CAVAILLES V., GARCIA M., ROCHEFORT H., 1989.- Regulation of cathepsin-D and pS2 gene expression by growth factors in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.*, 3 : 552-558.
9. KIDA N., YOSHIMURA T., MORI K., HAYASHI K., 1989.- Hormonal regulation of synthesis and secretion of pS2 Protein relevant to growth of human breast cancer cells (MCF-7). *Cancer Res.*, 49 : 3494-3498.
10. KUMAR V., GREEN S., BERRY M., CHAMBON P., 1987.- Function domains of the human estrogen receptor. *Cell*, 24 : 941-951.
11. MORI K., FUJII R., UHTA M., KIDA N., OHTA M., HAYASHI K., 1988.- Identification of a polyoetude secreted by human breast cancer cells (MCF-7) as the human estrogen-responsive gene (pS2) product. *Biochem. Biophys. Res. Common.*, 1 : 366-372.
12. FOEKENS J. A., RIO M. C., SEGUIN P., VAN PUTTEN W. L., FAUQUE J., NAP M., KLIJN J. G. M., CHAMBON P., 1990.- Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res.*, 50 : 3832-3837.
13. CHO H. S., KATZENELLEN B. S., 1991.- Differential regulation of gene expression by estrogen in estrogen growth-independent and -dependent MCF-7 human breast cancer cells sublines. *Mol. Endocrinol.*, 5 : 1323-1320.
14. KOERNER F. C., GOLDBERG D. E., EDGERTON S. M., SCHWARTZ H., 1992.- pS2 protein and steroid hormone receptors in invasive breast carcinomas. *Int. J. Cancer*, 52 : 183-188.
15. KYPRIANOU N., ENGLISH H. F., DAVIDSON N. E., ISAACS J. T., 1991.- Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer Res.*, 51 : 162-166.
16. SCHWARTZ L., KOERNER F., EDGERTON S. M., SAWICKA J. M., RIO M. C., BELLOCQ J. P., CHAMBON P., THOR D., 1991.- pS2 expression and response to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Research*, 51 : 624-628.
17. ELLEDGE R. M., GREEN S., PUGH R., ALLRED D. C., CLARK G. M., HILL J., RAVDIN P., MARTINO S., OSBORNE C. K., 2000.- Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer : a Southwest Oncology Group Study. *Int J. Cancer*, 89(2) : 111-117.
18. LUQMANI Y, TEMMIM L, MEMON A, PARKAR A, ALI M, MOTAWY M, BAKER H., 1999.- Immunoradiometric measurement of pS2 in breast cancer--correlation with steroid receptors and plasminogen activators. *Acta Oncol.*, 38(6) : 805-14.
19. HENRY J. A., NICHOLSON S., HANNESY C., LENNARD T., MAY F., WESTLEY B. R., 1989.- Expression of estrogen regulated pNR-2 mRNA in human breast cancer : relation to estrogen receptor mRNA levels and response to tamoxifen therapy. *Br. J. Cancer*, 61 : 32-38.
20. EDORH A., 1996.- *Expression d'oncogènes et tumeurs mammaires: Etude clinique et développement d'un modèle de souris transgéniques pour v-Ha-ras en toxicologie.* Doctorat de l'Université de Metz, France, 181p.
21. KHAN S. A., GONCHOROFF N. J., MILLER L. E., 1997.- Expression of pS2, c-erbB-2, and cathepsin D during the menstrual cycle in human breast cancers. *Ann. Surg. Oncol.*, 4(6) : 462-469.
22. CHARAFE-JAUFFRE E., EISINGER F., MATHOULIN-PORTIER M. P., SOBOL H., JACQUEMIER J., 2001.- pS2 expression in BRCA1-associated breast cancers. *Anticancer Res.*, 21(4B) : 2877-2881.
23. ATHANASSIADOU P. P., ATHANASSIADES P. H., DAVARIS P., PETRAKAKOU E. I., ZERVA C. I., KYRKOU K. A., 1998.- Expression of cathepsin D and pS2 in imprint smears of breast carcinoma. *Cytopathology*, 9(4) : 240-247.
24. EDORH A., LEROUX A., N'NOSSANI B., PARACHE R. M., RIHN B., 1999.- Detection by immunohistochemistry of *c-erbB2* oncoprotein in breast carcinomas and benign mammary lesions. *Cell. Mol. Biol.*, 45(6) : 831-840.
25. SUROWIAK P., DZIEGIEL P., ZABEL M., MATKOWSKI R., KORNAFEL J., 2001.- Prognostic value of immunocytochemical estimation of estrogen receptor (ER) and of pS2 estrogen-dependent protein in cells of mammary ductal carcinoma. Analysis of five-year course of the disease. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 39(2) : 143-144.
26. SUROWIAK P., DZIEGIEL P., ZABEL M., MATKOWSKI R., KORNAFEL J., 2001. Analysis of estrogen receptor (ER) and estrogen-dependent pS2 protein expression in cells of mammary ductal carcinoma. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 39(2) : 141-142.

**ANTIBIORESISTANCE ET PRODUCTION DE TOXINES PAR DES SOUCHES
DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLEES DE DIARRHEE**



BABA-MOUSSA Lamine Saïd^{1*}, ZINZENDORF Nanga Yesse², YOUSAO A.K. Issaka³, ASSOGBA Bérénice¹, ANAGONOU Sévérin⁴, PREVOST Gilles⁵, SANNI Ambaliou¹

1. Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, FAST, Université d'Abomey-Calavi, BENIN, 04 BP 0320 Cotonou

2. UFR de Pharmacie, Laboratoire de microbiologie, BP V 34 Abidjan

3. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Département des Productions Animales, Université d'Abomey-Calavi, BP 2009, Cotonou Bénin

4. Service de bactériologie, CHU Hubert MAGA de Cotonou, Bénin

5. UPRES EA-3432, Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine, Université Louis Pasteur-Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Rue Koeberlé 3, F-67000 Strasbourg, France

Auteur correspondant : BABA-MOUSSA Lamine Saïd, Email : laminesaid@yahoo.fr

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, FAST, Université Abomey-Calavi, BENIN, 04BP0320 Cotonou Tel : (00229) 90942906 ou (00229)21301024, FAX (00229)21301024

RESUME

Les diarrhées aiguës infectieuses représentent un problème majeur de santé publique dans le monde, surtout dans les pays en développement où elles sévissent à l'état endémique. On évalue entre 5 et 10 millions par an le nombre de morts par diarrhée infantile et la bactérie *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) est l'un des principaux agents. Très peu de donnée existe sur les facteurs de pathogénicité produits par ces souches de *S.aureus* isolées de diarrhées dans les pays africains. Le but de cette étude est donc d'isoler cette bactérie à partir des selles de diarrhées chez des patients du Centre Hospitalier Hubert Koutoucou MAGA de Cotonou et de rechercher les leucotoxines et entérotoxines qu'elle produit. De Novembre 2004 à Janvier 2005, 230 selles de diarrhées ont été prélevées et analysées chez 198 patients et 32 contenaient la bactérie *S. aureus* en culture pure soit 13, 91%. La majorité des patients chez lesquels les souches de *S. aureus* ont été isolées, était sous antibiotique. Les toxines ont été recherchées par la PCR multiplex ou immunoprécipitation. Toutes les souches sont résistantes à la Pénicilline G et 62% à l'Oxacilline. Quant aux toxines, la majorité des souches soit 56% produisent la leucotoxine Luke-LukD. Toutes les souches qui produisent l'entérotoxines A produisent également la leucotoxine Luke-LukD. La leucocidine de Panton et Valentine est produite par 19% des souches. Cette étude apporte des connaissances nouvelles notamment sur les facteurs de virulence produits par la bactérie *S. aureus*. C'est en partie par une grande rapidité dans le diagnostic et la mise en oeuvre des thérapeutiques que l'on pourra diminuer l'incidence de ces infections.

Mots-clés : *Staphylococcus aureus*, diarrhées, leucotoxines, entérotoxines

ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY AND TOXIN PRODUCTION BY STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS ISOLATED FROM DIARRHOEA

ABSTRACT

Acute infectious diarrhea is a major public health issue in the world, particularly in developing countries where such diseases remain endemic and the resulting dehydration complicates prognosis. Infectious infant diarrhea caused between 5 to 10 millions deaths per year and *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) was one of their causative agents. Little is known on the virulence factors produced by the diarrhoea isolated strains of *S.aureus* in Africa. The goal of this study is therefore to find out the leucotoxins and enterotoxins produced by its strains isolated from diarrhoea from patients attending the Centre Hospitalier Hubert Koutoucou MAGA, in Cotonou, Benin. The toxins were screened par multiplex PCR or immunoprecipitation. From November 2004 to January 2005, 230 faecal diarrhoea were investigated from 198 patients and 32 (13.91%) were positive for *S. aureus*, in pure culture. Most of the patients from whom the bacteria were isolated were under antibiotics treatment regimen. All isolated strains are resistant to penicillin G, and 62% to Oxacillin. Concerning the toxins, the Leucotoxin Luke-LukD was produced by 56 % of the studied strains. All the strains that produced Luke-LukD, also produced the Enterotoxin A (SEA). The Panton and Valentine Leucocidine (PVL) were produced by 19% of the strains. This study brings new insight into the virulence factors produced by *S. aureus* strains isolated from diarrhoea in Cotonou, Benin. The characterization of these factors may improve diagnosis.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, diarrhoea, leucotoxins, enterotoxins

INTRODUCTION

S. aureus est responsable de nombreux types d'infections chez l'homme. C'est une espèce saprophyte, ubiquitaire et présente à l'état commensal. Trente à cinquante pour cent d'individus sains sont porteurs de ce germe.

Pendant longtemps la bactérie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a été considérée comme étant une des causes de diarrhées associées à la prise d'antibiotique [1]. C'est la bactérie la plus fréquemment isolée en milieu hospitalier. Son équipement génétique lui permet d'être responsable d'une grande variété d'infections touchant les systèmes de l'organisme. Cet agent est responsable d'environ 20% des infections nosocomiales [2] et la multirésistance de nombre de ses souches aux différentes familles d'antibiotiques est une cause d'échecs thérapeutiques et de morbidité en milieu hospitalier. Ces aléas augmentent les séjours et les coûts d'hospitalisation. Depuis une vingtaine d'années, des infections intestinales à *S. aureus* sont rapportées. McDonald *et al.* [3] rapportent 10 cas et Scopetti *et al.* [4] 9 cas. Les facteurs de risque sont la prise d'antibiotiques, l'âge, une chirurgie intestinale récente [4]. Les souches impliquées sont le plus souvent résistantes à la pénicilline.

Le constat est que dans les pays en voie de développement comme le Bénin la prise en charge des malades souffrant de diarrhées commence toujours par un traitement antibiotique sans même que le germe mis en cause ne soit diagnostiqué et ce n'est qu'en cas de persistance de la diarrhée qu'on passe à la recherche des germes. La bactérie *S. aureus* est très rarement recherchée dans les selles dans les hôpitaux au Bénin alors que des études effectuées précédemment ont déjà montré qu'elle peut être responsable de diarrhée. Vu le nombre de souches de *S. aureus* de plus en plus résistantes à la pénicilline en Afrique [5, 6] il était important d'étudier la prévalence de cette bactérie dans les diarrhées au Bénin et de rechercher les toxines et facteurs d'adhésion associés. En effet, *S. aureus* est responsable de nombreux types d'infections où les facteurs d'adhésion, d'opsonisation et d'invasion se complètent pour exprimer la virulence de la bactérie. Plusieurs souches sont capables de produire une ou plusieurs entérotoxines [7] responsables des symptômes gastro-intestinaux observés lors des intoxications alimentaires [8].

Très peu de données existent sur les facteurs de virulence produits par les souches de *S. aureus* en Afrique [9]. Ce travail a eu donc

pour objectif de rechercher les toxines sécrétées par ces souches de *S. aureus* isolées dans les selles de patients souffrant de diarrhées au Centre Hospitalier Hubert Koutoucou MAGA (CHU-HKM) de Cotonou et d'étudier leur antibiorésistance.

MATERIELS ET METHODES

Identification des souches

L'isolement a été réalisé au laboratoire de bactériologie du CHU-HKM. Cette collecte a été faite pendant la période de Novembre 2004 à janvier 2005. Les souches de *S. aureus* ont d'abord identifiées comme des cocci groupés en amas à Gram (+), aérobies-anaérobies facultatif produisant une catalase, une coagulase et de l'acétone. Les autres bactéries entéropathogènes à savoir *Salmonella sp*, *Shigella*, *E. coli*, *Clostridium difficile* ont été également recherchées mais seuls les prélèvements où *S. aureus* était en culture pure ou majoritaire de la flore aérobie ($\geq 90\%$ UFC) ont été considérés pour cette étude afin d'être certain que la diarrhée est associée à cette bactérie. Les coprocultures ont été ensemencées de façon classique [10].

Des questionnaires ont été établis afin d'avoir des renseignements sur l'identité, l'âge, le sexe, les raisons d'admission, la durée de la diarrhée, les autres symptômes, et l'antibiothérapie des malades concernés. La diarrhée est définie comme l'émission d'au moins 3 selles liquides ou semi-molles par jours pendant une durée d'au moins 48 h.

Test de résistance aux antibiotiques

Les sensibilités aux antibiotiques ont été déterminées par diffusion sur milieu Mueller-Hinton gélosé conformément aux recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [11]. Les antibiogrammes présentés ont été effectués par la méthode de diffusion en gélose à partir de disques chargés en antibiotiques: Pénicilline G, Oxacilline, kanamycine, gentamicine, Ofloxacine, pristinamycine, érythromycine, rifampicine, fosfomycine, acide fusidique, triméthoprimesulfaméthoxazole, Tobramycine, Linezolid, Chloramphénicol, Tétracycline. La résistance à l'oxacilline a été déterminée par le diamètre d'inhibition de croissance sur une gélose hyper salée à 6,5% (p/v) NaCl après 24 h d'incubation à 30°C.

Détection phénotypique des toxines leucotoxines

Les différentes leucotoxines à savoir la Leucotoxine de Pantan et Valentine (PVL), la leucotoxine LukE-LukD ont été détectées à partir de

surnageant après 18 heures de culture dans le milieu YCP [12] par un test d'immunoprécipitation après une diffusion radiale. La réaction s'effectue dans un gel d'agarose 0,6% (p/v) dans le tampon PBS (10 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.5), contenant des puits d'un volume de 50 µl, espacés de 8 mm entre eux, dans lesquels ont été déposés des anticorps de lapin anti-leucotoxine purifiés par affinité [12] à DO_{280nm}3 qui vont réagir avec les surnageants de culture ou les lysats bactériens. Après une diffusion de 16 heures, les arcs de précipitation ont été visionnés directement à l'œil nu ou après une coloration au bleu de Coomassie.

Recherche des entérotoxines par le Test d'agglutination

Les entérotoxines A, B, C et D ont été déterminées par des tests semi quantitatifs utilisant respectivement des kits SET-RPLA (Reversed passive latex agglutination) et TST-RPLA (Oxoid, Hampshire, England). Ces tests sont connus pour être très sensibles et spécifiques [13]. Les réactions ont lieu dans des microplaques ELISA à 96 puits en présence de 25 µl surnageant de culture des souches et 25 µl des billes de latex imbibés des anticorps adéquats. Lorsque la réaction est positive on observe, après 24 H à température ambiante, un dépôt blanchâtre au fond de la plaque.

Détection génotypique des entérotoxines

Les autres toxines pour lesquelles nous n'avons pas d'anticorps ont été détectées par PCR Multiplex (Tableau I) sur ADN purifié à partir de Kit : QIAamp®DNA Mini Kit (Qiagen, GmbH, Germany) La présence des gènes codant les entérotoxines E (*see*), G (*seg*), H (*seh*), K(*sek*), L(*sel*), T(*set*), épidermolysine D (*etd*), les gènes codant les facteurs ADP-ribosylants EDIN-A,-B,-C (Epidermal Cell Differentiation inhibitor). La PCR a été réalisée avec un appareil Gene Amp® PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) dans un volume total de 50 µl contenant 25 pmole de chaque amorce, 50 ng d'ADN, 5 mM MgCl₂, 10 mM du mélange de dNTP, Tampon PCR 10X concentré et 5 unités de Fast Taq DNA polymerase (Roche Applied Science, GmbH, Germany).

La réaction de PCR comprend une étape initiale de dénaturation (2 min à 92°C) suivie par 35 cycles d'amplification comprenant chacun 2 min de dénaturation à 92°C, 1 min d'hybridation à 50°C et une elongation de 2 min 30 s à 72°C. La réaction est terminée par une étape d'extension finale de 3 min à 72°C. Le produit de PCR a été analysé par une électrophorèse sur agarose 1,4% (Euro-medex, Mundolsheim, France). Le gel a été ensuite visualisé sous lumière ultraviolette (UV).

Tableau 1 : Oligonucléotides utilisés pour la recherche des toxines

Facteurs de virulence	Sequences des amorces	Polarité	Taille (pb)	PCR Multiplexe
EDIN B	EDIN B1 : 5'-ACAGACTTAGTTGAAGCTACTAAATG-3'	Sens	522	4
	EDIN B2 : 5'-TGTCCTGTAGGCAAAAGAACTTCTTG-3'	Antisens		
SEH	SEH1 : 5'-CATCTACCCAAACATTAGCAC-3'	Sens	222	4
	SEH2 : 5'-AGAAATCAAGGTGATAGTGGCAA-3'	Antisens		
EDIN A	EDIN A1 : 5'-TCATAGAAGTATCTAATACTTCTTTAGCA-3'	Sens	604	1
	EDIN A2 : 5'-TCCAACACGGTATTCTGTGCCTCTAGGTA-3'	Antisens		
SET	SET1 : 5'-GAAGGTCTACAAGGCCAAAATGTCT-3'	Sens	363	5
	SET2 : 5'-TCAACACATCGCCCATGCGCTCGA-3'	Antisens		
SEE	SEE1 : 5'-CTTACCGCCAAAGCTGTCTG-3'	Sens	159	2
	SEE2 : 5'-GTCCACTTGTAATGGTAGCGAGAA-3'	Antisens		
SEK	SEK1 : 5'-TGATACTCCTATAGCTAATCAACTACA-3'	Sens	300	2
	SEK2 : 5'-ATCAATCTCTTGAGCGGTAACA-3'	Antisens		
SEG	SEG1 : 5'-AATTATGTGAATGCTCAACCCGAT-3'	Sens	408	2
	SEG2 : 5'-CTTTAGTGAGCCAGTGTCTTGCTTTG-3'	Antisens		
ETD	ETD1 : 5'-ACGAATTCAATACATATGAAGAATCTGAAATTTTA-3'	Sens	800	1
	ETD2 : 5'-GCAGAATTCAAGTTATTCCATAATGATTAGAATGA-3'	Antisens		
SEL	SEL1 : 5'-ACCAGAATCACACCGCTTAGAATAC-3'	Sens	422	1
	SEL2 : 5'-TGGAATACTACACTCCCCTTATCAAAG-3'	Antisens		
EDIN C	EDIN C1 : 5'-AGGTCTTCCAGCTAATGCAGCTCCTT-3'	Sens	543	5
	EDIN C2 : 5'-ACAGTTCAAAGACAAAGAAGCTATT-3'	Antisens		
ETB	ETB1 : 5'-GAGGTTCCACCTACAGATAAAGAG-3'	Sens	243	5
	ETB2 : 5'-CTGATCCAGAGTTTACCACTGTGA-3'	Antisens		

RESULTATS

Données cliniques

La plupart des malades hospitalisés ne souffraient pas de diarrhées avant leur hospitalisation. Sur 230 prélèvements de selles de diarrhée analysées, chez 198 malades, 32 souches soit un pourcentage de 13,91% ont été identifiées comme des *S. aureus*, 17 souches provenaient de patients de sexe féminin et les 15 autres de sexe masculin. L'âge des patients féminins varie de 1 à 70 ans avec une moyenne d'âge de 31,76 ans ($\pm 20,30$) celui des patients masculins varie de 8 mois à 60 ans avec une moyenne d'âge de 28,88 ans ($\pm 23,11$ ans). La moyenne d'âge de tous les patients étant 30,32 ans.

Parmi les patients chez lesquels les souches de *S. aureus* ont été isolées, 21 reçoivent une antibiothérapie depuis au moins 5 jours. La durée moyenne des antibiothérapies varie de 5 à 14 jours. Sept (7) malades étaient sous Ampicilline, 10 sous Amoxicilline, 3 sous Gentamycine, 1 sous Zinnat® (Céfuroxime). La durée moyenne du traitement avant le prélèvement est de 4 jours.

Antibiorésistance

De rares données existent sur les profils de sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. aureus* isolées de diarrhées en Afrique équatoriale [9]. Le Tableau 2 indique les résultats obtenus pour les souches isolées au CHU-HKM de Cotonou. Toutes les souches sont résistantes à la Pénicilline G. Par contre aucune souche n'est résistante à la Vancomycine, à la Tétracycline, à la Linezolid, et à l'Ofloxacine. Vingt cinq pour cent (25%) des souches sont résistantes à la Kanamycine, la Tobramycine et la Chloramphénicol alors que 53% sont résistantes à l'Erythromycine. La majorité des souches soit 62% sont résistantes à l'Oxacilline.

Recherche de la production de toxine

Les résultats sont représentés dans le Tableau 3. La leucocidine de Pantan et Valentine est produite par 19% des souches, tandis que 56% des souches produisent la leucotoxine LukE-LukD. Les entérotoxines A et B sont produites respectivement par 40% et 25% des souches. Quatre souches sur les 32 produisent ces deux entérotoxines à la fois. Aucune souche produisant les épidermolysines ETB et ETD, les entérotoxines C, D, SEL, SEK, SET, SEH ainsi que les facteurs EDIN B et EDIN C n'a été identifiée. Les entérotoxines A et B sont produites à la fois par 12,5% (4/32) des souches. Toutes les souches produisant

l'entérotoxine A produisent également la leucotoxine LukE/LukD (40%).

DISCUSSION

Les données obtenues à partir de cette étude permettent de tirer plusieurs enseignements. Une grande majorité des souches de *S. aureus* isolées de diarrhées (62%) étaient résistantes à la méthicilline. Des résultats obtenus dans une étude précédemment effectuée au Nigeria [15] donnaient 5 SARM sur 72 souches de soit 7% seulement des souches isolées de diarrhées sporadiques chez des enfants âgés de moins de 5 ans. Cette différence peut s'expliquer par le fait que l'étude réalisée au Bénin porte sur une large gamme de patient dont la moyenne d'âge est de 30 ans et comprend des adultes et des personnes âgées.

Au Togo une étude effectuée au CHU de Tokoin à Lomé montrait un taux de résistance de 67% [5]. En France ce taux a baissé aujourd'hui à 35% [16]. La grande majorité des souches résistantes à la méthicilline étaient prélevées chez les malades sous antibiothérapie. Ces diarrhées étaient consécutives à la prise d'antibiotiques et la plupart du temps elles disparaissaient avec l'arrêt du traitement. Les diarrhées sont observées dans 30% des cas, au cours des traitements antibiotiques. La plupart du temps elles sont bénignes, mais dans certaines circonstances les perturbations de l'écologie de la flore intestinale induites par l'antibiothérapie permettent l'émergence d'agents infectieux pathogènes dont *S. aureus*.

Les SARM sont responsables de plus de 20% des infections nosocomiales dans un pays développé comme la France où la qualité des soins est bien meilleure que dans les pays africains. Des données n'existent pas encore pour ces derniers mais on imagine que ce chiffre peut être beaucoup plus élevé vu le faible niveau de couverture sociale et les prises en charge pas toujours efficaces des malades dans leurs hôpitaux. La résistance à la méthicilline des souches de *S. aureus* est aujourd'hui un problème mondial. Aujourd'hui plusieurs études montrent que le staphylocoque doré encore appelé *S. aureus* élargit son territoire.

Les infections extrahospitalières liées au *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) progressent aux Etats-Unis [17]. Jusqu'à récemment, les souches SARM résistantes à la pénicilline M et parfois à d'autres antibiotiques n'apparaissaient que rarement en dehors des hôpitaux ou des centres médicalisés. Mais une étude des Centers for Disease

Control and Prevention (CDC) révèle que les infections dites communautaires, survenues chez des personnes n'ayant pas été en contact avec le milieu hospitalier depuis au moins un an, sont plus fréquentes [17].

En analysant les données épidémiologiques des villes de Baltimore et d'Atlanta et de l'Etat du Minnesota, Fridkin *et al.* [17] ont constaté que, sur l'ensemble des cas d'infections par SARM déclarées entre 2001 et 2002, 17%

avaient une origine communautaire. Six pour cent correspondaient à des infections invasives (méningites, pneumonies, etc.) et 77% à des infections cutanéomuqueuses.

Les traitements s'orientent aujourd'hui vers la vancomycine. Comme on peut le constater dans le Tableau 2, aucune des souches isolées de diarrhées au Bénin n'est résistante à cet antibiotique.

Tableau 2 : Résistance aux antibiotiques des souches de *S. aureus*

Antibiotiques	Pourcentage de Résistance
Oxacilline	20/32 (62)
Pénicilline G	32/32 (100)
Vancomycine	0/32 (0)
Téicoplanine	0/32 (22)
Kanamycine	8/32 (25)
Gentamycine	2/32 (6)
Tobramycine	8/32 (25)
Chloramphénicol	7/32 (0)
Rifampicine	2/32 (6)
Acide Fusidique	2/32 (6)
Triméthoprim Sulfaméthozoline	6/32 (19)
Ofloxacin	0/32 (0)
Pristinamycine	2/32 (0)
Linezolid	0/32 (6)
Erythromicine	17/32 (53)

Le Tableau 3 montre que 65% des souches produisent au moins l'une ou l'autre des entérotoxines A et B. L'entérotoxine A est produite par 40% des souches alors que l'entérotoxine B est produite par 25% des souches. Des études ont montré que l'entérotoxine A est la plus fréquemment impliquée (65%) dans les Toxi-infections Alimentaires Collectives (TIAC) en France [18]. Le biotype B serait la deuxième cause avec 20% [18]. Ces deux types sont impliqués dans 80% des TIAC dans ce pays.

Les chiffres observés au CHU-HKM de Cotonou (Bénin) pour les souches de *S. aureus* isolées de selles de diarrhées se rapprochent de ceux obtenus pour la France. Les entérotoxines sont des toxines excrétées qui activent les récepteurs de la paroi intestinale dont le stimulus, parviennent jusqu'au centre de vomissement via le nerf vague. La bactérie *S. aureus* peut produire d'autres entérotoxines non identifiables par les méthodes sérologiques. Dans cette étude, les entérotoxines G (9%) et E (6%) ont pu être identifiées par la PCR.

Tableau 3 : Recherche de la présence de toxine ou de gène codant les toxines

Toxines	Pourcentage (%)
SE(A)	13/32 (40)
SE(B)	8/32 (25)
SE(C)	0/32 (0)
SE(D)	0/32 (0)
SE(AB)	4/32 (12,5)
LPV	6/32 (19)
LukE/LukD	18/32 (56)
ETD	0/32 (0)
SEL	0/32 (0)
SEG	3/32 (9)
SEK	0
SEE	2/32 (6)
SET	0/32 (0)
SEH	0/32 (0)
EDIN B	0/32 (0)
EDIN C	0/32 (0)
EDIN A	3/32 (9)

SE=Staphylococcal enterotoxin

La leucocidine de Panton et Valentine est produite par 6 souches sur 32 (19%) tandis que la leucotoxine LukE-LukD est produite à un fort pourcentage à savoir 53%. L'épidermolyse A (ETA) est produite par 19% des souches (Tableau 3). La remarque la plus importante est que toutes les souches qui produisent l'entérotoxine A (SEA) produisent également la leucotoxine LukE-LukD. Ces chiffres confirment les résultats déjà observés pour des souches de *S. aureus* isolées de Diarrhées Post-antibiotiques (DPA) en France [19]. Cette étude rapportait que les souches de *S. aureus* isolées de DPA sont le plus souvent productrices de LukE-LukD et SEA. De 1998 à 2001, le rôle pathogène de *S. aureus* dans les DPA a été évoqué pour des patients hospitalisés au CHU de Lille, au CHU d'Amiens et l'hôpital Vitry Le François en France (A.Gravet, Thèse 2001, Université Louis Pasteur, Strasbourg). Les souches de *S. aureus* isolées en culture pure ou prédominantes dans les coprocultures ont été étudiées à l'Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine de l'université Louis Pasteur de Strasbourg (France) et elles produisaient toutes l'entérotoxine A et la Leucotoxine LukE-LukD [19]. La virulence de la bactérie *S. aureus* passe par une étape de colonisation assurée par la fixation sur les organes cibles. Elle sécrète des toxines qui se fixent spécifiquement sur les cellules de la muqueuse et stimule l'hypersécrétion d'eau et d'électrolytes.

CONCLUSION

Le traitement antibiotique n'est pas toujours nécessaire. Il doit être, si possible, guidé par la mise en évidence de l'agent pathogène. Il est indiqué dans certaines conditions notamment dans un tableau clinique grave, un syndrome dysentérique. Son but est d'abroger l'évolution des symptômes, de limiter le risque de dissémination et d'éviter les complications en cas de bactériémie. La contamination bactérienne des aliments peut donner des symptômes gastro-intestinaux ou des symptômes de maladies généralisées. Ces maladies sont dues à une toxine préformée et sécrétée lorsque l'aliment est ingéré.

La culture des selles ne permettra donc généralement pas les diagnostics. Il est donc important de mettre au point des techniques permettant de rechercher les toxines produites par les bactéries diarrhéogènes. *Staphylococcus aureus* est souvent impliqué dans les intoxications avec symptômes gastro-intestinaux. Notre étude apporte des connaissances nouvelles sur les profils toxinogéniques des souches de *S. aureus* isolées de selles de diarrhées. La méthode de PCR a permis la recherche de toxines non identifiables par les méthodes sérologiques. La présence d'une bactérie dans les selles ne suffit pas pour dire qu'elle est responsable de la diarrhée. Il faut prouver qu'elle possède l'équipement toxinogénique. Ainsi les méthodes de numération bactérienne doivent être couplées à la recherche des toxines.

La présence de cette bactérie dans les selles de diarrhées au Bénin et la production de facteurs de virulence par ces souches devraient conduire à une prise de conscience collective dans nos pays africains afin que les diagnostics soient mieux posés. La plupart du temps, faute de moyen financier, on se limite à une identification morphologique des germes ce qui ne permet pas toujours la meilleure prise en charge thérapeutique possible.

REMERCIEMENTS

Nous remercions tous les techniciens et le personnel du laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire Hubert Koutoucou Maga de Cotonou.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Surgalla M. J., Dack G. M., Enterotoxin produced by *Micrococci* from cases of enteritis after antibiotic therapy. JAMA 1955. 158, 649-650.
- 2-Emori TG., Gaynes RP.. An overview of nosocomial infections, including the role of microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Rev 1993. 6, 428-442
- 3-McDonald M., Ward P., Harvey K., Antibiotic-associated diarrhoea and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Med. J. Aust. 1982., 1, 462-464.
- 4- Scopetti F., Orefici G., Biondi F., Benini F., *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and gentamicin as a cause of outbreak of epidemic enteritis in a hospital. Boll. Ist. Sieroter Milan. 1983. 62, 406-411.
- 5-Dagnra A. Y., Hounkpati A., Prince-David M., Fort pourcentage de souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline au CHU de Lomé (Togo). Med Mal Infect, 2001. 31, 14-15
- 6-Baba-Moussa L., Sanni A., Dagnra A. Y., Anagonou S., Prince-David P., Edoh V., et al, Approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de la production de leucotoxines par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées en Afrique de l'Ouest. Méd Mal Infect 1999. 29, 689-696.
- 7-Balaban N., Rasooly A., Analytical chromatography for recovery of small amounts of staphylococcal enterotoxins from food. Int. J. Food Microbiol. 2001. 64, 33-40.
- 8-Tamarapu S., Mckillip J. L., Drake M., Development of a multiplex Polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. J. Food Prot 2001. 64, 664-668.
- 9-Voss A., Doebbeling B. N., The worldwide prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents 1995. 5, 101-106.
- 10-Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. *Precis de Bactériologie Clinique*. Eds ESKA ed Paris, 2000.
- 11-Kloos W. E., Bannermann T. L., *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In Murray, P. R., Baron, E.J., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C. 1999, 264-282.
- 12-Gravet A., Colin D., Keller D., Girardot R., Monteil H., Prevost G., Characterization of a novel structural member, Luke-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. FEBS Lett. 1998. 436, 202-208.
- 13-Brett M., Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. Journal of Applied Microbiology. 1998. 84, S110-S118.
- 14-Prevost G., Pottecher B., Dahlet M., Bientz M., Mantz J. M., Piemont Y., Pulsed field electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care unit. J. Hosp. Infect. 1991. 17, 255-269.
- 15-Efuntoye M. O., Adetosoye A. I., Enterotoxigenicity and drug sensitivity of Staphylococci from children aged five years and below with sporadic diarrhoea. East African Medical Journal. 2003. 12, 656-659.
- 16-Mahoudeau I., Elkhaili H., Delabranche X., Freitas I., Meunier O., Prevost G., et al. Epidémiologie de *S.aureus* dans les Hôpitaux Universitaire de Strasbourg. J. Med. Strasbourg. 1997. 28, 153-159.
- 17- Fridkin S. K., Hageman J. C., Morrison M., Sanza L. T., Como-Sabetti K., Jernigan J. A., Harriman K., Harrison L. H., Lynfield R., Farley M.M., Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease in Three Communities. N Engl J Med. 2005. 352, 1436-1444.
- 18- H. Dupin, *Alimentation et Nutrition Humaine*, eds 1983
- 19- Gravet A., Rondeau M., Harf- Monteil C., Grunenberger F., Monteil H., Scheffel J. M., Prevost G., Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin Luke-LukD. J Clin Microbiol. 1999. 37, 4012-4019



INFERTILITE FEMININE ET ELEVATION DES IMMUNOGLOBULINES E PROFIL ET PRISE EN CHARGE DES PATIENTES

ADISSO S.¹, BIGOT A.K.², LATOUNDJI C. M.³, ADJALLA G.³, NBESSAN P.³

¹Clinique Universitaire de Gynécologie-Obstétrique, 01BP 1822, Cotonou

²Service d'Immuno-hématologie, 01BP 386, Cotonou

³Clinique de Gynécologie-Obstétrique Mahouna, Cotonou

RESUME

L'élévation des Immunoglobulines E dans les cas d'infertilité peut rendre la prise en charge difficile car on n'y pense pas assez. Notre étude vise à déterminer chez les femmes infertiles fréquentant la Clinique Mahouna, le profil épidémiologique et le statut immunologique des IgE en IgE et l'issue reproductive de leur prise en charge. Nous avons effectué une étude transversale analytique de 489 cas de femmes infertiles sur une période de 5 ans. Sur cinq femmes infertiles, quatre sont identifiées en infertilité secondaire. Dans près de 65% des cas, l'infertilité est associée à un terrain allergique. La prise en charge de ces femmes infertiles par le kétotifène a montré la survenue d'une grossesse dans 77,2% des cas ($p < 0,033$), 10% de morts-nés ($p = 0,009$) et 3,2% d'avortement ($p = 0,023$). Les états allergiques provoquent une élévation du taux d'immunoglobuline E, et influencent la fertilité féminine. La prise en charge par le kétotifène est favorable à la survenue de grossesse. Nous recommandons le dosage des IgE en vue du dépistage de son élévation dans les cas d'infertilité féminine pour une meilleure prise en charge.

Mots-clés : Infertilité féminine, Immunoglobulines E, prise en charge

SUMMARY

Woman infertility and elevating immunoglobulin level: Profile and treatment of patients

Elevated level of immunoglobulin E in infertility case, could make difficult taking in charge of that because no thinking about that. That survey had to determine among infertility women frequenting Mahouna clinic, the epidemiological profile, the immunological status about IgE and their reproductive issue after taking in charge. We have done a transversal and analytic study about 489 cases of female infertility on 5 years.

Among 5 infertility women, 4 cases are identified as secondary infertility. In 65% of cases, female infertility is associated with allergy. The treatment of those women by kétotifen is followed by becoming of pregnancy, 77.2% ($p = 0.033$), 10% of stillborn ($p = 0.009$) and 3.2% abortion cases ($p = 0.023$). Allergic states occasioned high level immunoglobulin E that disturbs female fertility. Using kétotifen as therapy occurs pregnancy.

We recommend to research elevated level of immunoglobulin E for etiologic diagnosis of female infertility and a better treatment.

Key-words: Female infertility, Immunoglobulin E, treatment.

INTRODUCTION

Le désir d'un enfant demeure, pour la plupart des couples, un sujet de préoccupation dans toutes les sociétés du monde. De ce fait, l'infertilité a de tout temps été un sujet d'inquiétude, d'appréhension de prise en charge souvent onéreuse pour le couple désireux d'avoir des enfants. Malheureusement, 7 à 15% de couples en activité génitale sont confrontés aux problèmes d'infertilité [1] dont 5% d'entre eux demeurent sans étiologies connues. Outre les causes organiques et fonctionnelles liées aux organes génitaux, les facteurs immunologiques dont l'élévation pathologique du taux sérique des IgE serait associée à certains cas d'infertilité féminine inexplicables.

Notre travail vise à déterminer chez les femmes infertiles fréquentant la Clinique Ma-

houna, le profil épidémiologique et le statut immunologique en IgE et l'issue reproductive de leur prise en charge.

CADRE - MATERIEL ET METHODE

Cadre d'étude

Notre travail s'est déroulé à la clinique polyvalente Mahouna de Cotonou et dans le laboratoire d'immuno-hématologie (Banque de sang) du Centre National Hospitalier Universitaire Hubert Koutoukou MAGA (CNHU-HKM).

Notre échantillon d'étude regroupe des femmes en âge de procréer ayant une infertilité primaire ou secondaire, désireuse de maternité et ayant bénéficié du dosage des immunoglobulines E (IgE) et ayant des antécédents de fausses couches. Nous avons exclu de notre étude toutes femmes en âge de procréer présentant une infertilité de causes orga-

niques, tumorales, infectieuses ou hormonales avérées de même que celles chez qui le dosage des IgE n'est pas été réalisé.

Matériel

Nous avons utilisé les dossiers des patientes infertiles, des questionnaires de dépouillement préalablement élaborés. Pour le dosage des IgE, nous avons utilisé, les petits équipements de laboratoire pour les prélèvements et un équipement lourd dont l'automate mini VIDAS des laboratoires dont le principe est basé sur la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Les données sont traitées par un outil informatique.

Méthode d'étude

Il s'agit d'une étude transversale analytique comportant une phase rétrospective sur 5 ans

RESULTATS

Répartition des patientes selon le type d'infertilité

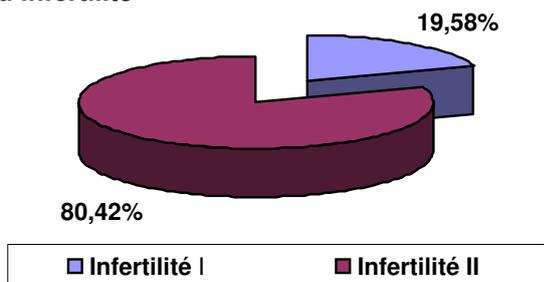


Figure 1 : Répartition des patientes selon le type d'infertilité

Parmi les femmes infertiles recensées au cours de notre étude, 70,16% d'elles ont connu dans leurs antécédents des allergies.

Répartition des patientes selon le type d'infertilité et le taux d'IgE

Tableau I : Répartition des patientes selon le type d'infertilité et le taux d'IgE

	IgE Normale		IgE Elevée		Total	
	N	%	N	%	N	%
Infertilité I	28	06,52	56	13,05	84	19,57
Infertilité II	134	31,24	211	49,19	345	80,43
Total	162	37,76	267	62,24	429	100

(p=0,048)

(du 1er janvier 2000 au 30 Juillet 2005) et une phase prospective du 31 Juillet 2005 au 30 Mai 2006 (10 mois). Durant ces deux phases, nous avons recruté les femmes selon les critères énumérées plus haut. Selon le protocole de prise en charge de la Clinique polyvalente Mahuna, le dosage des IgE est demandé systématiquement à toutes les femmes reçues pour infertilité.

Les femmes chez qui le dosage des IgE est effectivement réalisée et qui présentent un taux élevé c'est-à-dire supérieur à 150 KUI / L, sont traitées au Kétotifène (Zaditen®) selon la posologie de un comprimé le matin et un comprimé le soir avant et pendant la grossesse.

Les données collectées ont été traitées dans le logiciel Excel 2003.

Répartition des patientes suivant le taux d'IgE

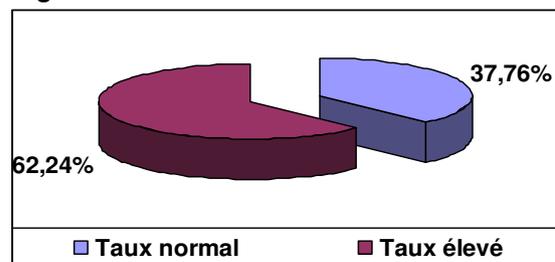


Figure 2 : Répartition des patientes suivant le taux d'IgE

Répartition des patientes à taux d'IgE élevé en fonction de la survenue de grossesse

Tableau II : Répartition des patientes à taux d'IgE élevé en fonction de la survenue de grossesse

	Patientes traitées	
	Nombre	%
Grossesse	130	75,58
Pas de grossesse	42	24,42
Total	172	100

Répartition des femmes soumises au traitement suivant le type d'infertilité

Tableau III : Répartition des femmes soumises au traitement suivant le type d'infertilité

	Traitées		Non traitées		Total	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Infertilité I	48	17,97	8	2,99	56	20,96
Infertilité II	182	68,17	29	10,87	211	79,04
Total	230	86,14	37	13,86	267	100

(p=0,9833)

Etude comparée des patientes traitées et non traitées suivant le type d'infertilité et la survenue ou non de grossesse

Tableau IV : Répartition des patientes traitées et non traitées suivant le type d'infertilité et la survenue ou non de grossesse

		Infertilité I		Infertilité II		Total	
		N	%	N	%	N	%
Traitées	Grossesse	34	14,11	152	63,06	186	77,17
	Pas de grossesse	12	04,98	16	06,63	28	11,61
Non traitées	Grossesse	00	00	00	00	00	00
	Pas de grossesse	08	3,32	19	7,9	27	11,22
Total		54	22,41	187	77,59	241	100

(p=0,033)

Répartition des grossesses selon leur issue et le type d'infertilité chez les femmes traitées

Tableau V : Taux d'évolution des grossesses obtenues après traitement suivant le type d'infertilité

	Infertilité I		Infertilité II		Total	
	N	%	N	%	N	%
Avortements	02	1,07	04	2,16	06	3,23
Grossesses à terme	32	17,20	148	79,57	180	96,77
Total	34	18,27	152	81,73	186	100

(p=0,023)

Etude comparée de la vitalité des nouveaux-nés issus des grossesses suivant le type d'infertilité

Tableau VI: Répartition des nouveaux-nés issus des grossesses suivant leur vitalité et le type d'infertilité

	Infertilité I		Infertilité II		Total	
	N	%	N	%	N	%
Enfants vivants	25	13,89	137	76,10	162	89,99
Enfants morts- nés	07	03,89	11	06,12	18	10,01
Total	32	17,78	148	82,22	180	100

(p=0,009)

DISCUSSION

Répartition des patientes selon le type d'infertilité.

Les femmes ayant une infertilité secondaire représentent pratiquement quatre femmes infertiles sur cinq. Une femme sur quatre présente une infertilité primaire (Figure 1). Cette infertilité peut être due à une intolérance du sperme par la femme [2,3].

Les résultats trouvés par HODONOU [4] au Togo ne sont pas très différents des nôtres. Par contre, CISSE [5] signale des fréquences inversées, dans un travail sur l'infertilité conjugale à Dakar, 65% de cas d'infertilité I et 35% de cas d'infertilité II.

Répartition des patientes infertiles suivant les antécédents d'allergies

L'association des allergies à l'infertilité et l'avortement n'est pas toujours établie. En effet, ZAC [6] lors de son étude sur l'association entre allergie, infertilité et avortement a trouvé 64,80% de femmes infertiles allergiques, résultats comparables aux nôtres. Par contre, MORIN [7] n'a trouvé aucune manifestation d'allergie chez ses patientes.

Répartition des patientes suivant le taux d'IgE

L'élévation du taux d'IgE est plus fréquente dans notre étude (figure 2). Le taux moyen est d'IgE est de 253,87 KUI/l. Cette situation s'observe dans les cas d'infections parasitaires, les allergies broncho-pulmonaires, l'aspergillose ou les dermatoses [8,9] et explique en partie les infertilités primaires et secondaires.

Répartition des patientes selon le type d'infertilité et le taux d'IgE

Selon les résultats du tableau 1, près de 2 femmes infertiles sur 3, ont présenté un taux élevé d'immunoglobulines E dans notre échantillon. Cette élévation est plus fréquente dans les cas d'infertilité secondaire ($p=0,048$).

Les travaux réalisés par HARRISON [10] montrent une élévation des IgE de presque même proportion dans les cas d'infertilité primaire ou secondaire

Répartition des patientes ayant des taux d'IgE élevés suivant les antécédents d'allergies

Dans notre échantillon, 172 patientes soit 64,41% ont signalé un antécédent d'allergie à la quinine, à la poussière de maison, au lait de vache, au crabe. Ces résultats expliquent la forte relation qui pourrait exister entre les infertilités I et II et les antécédents d'allergie.

Notre résultat est différent de celui trouvé par JOHANSSON [11]. Celui-ci dans sa série rapporte que 1 femme sur 4, a des antécédents d'allergie.

Selon Jacob [2], certaines patientes se plaignent de démangeaison et de prurit après des relations sexuelles avec leur conjoint. Ces désagréments peuvent résulter d'une allergie au liquide séminal qui est responsable de l'inflammation de la vulve et du vagin après des rapports sexuels.

Evolution de l'infertilité suite au traitement par le Zaditen

Dans la population des patientes ayant des taux d'IgE élevés, 86,14% ont été prises en charge et 13,86% ne l'ont pas été. L'absence de traitement chez ces patientes s'explique par le coût élevé du Zaditen et son utilisation sur une longue période (au moins 6 mois).

Parmi les patientes à taux d'IgE élevés et ayant déclaré des antécédents d'allergie et traitées, 3 sur 4 ont eu une grossesse (Tableau 2). Ces résultats montrent qu'il existerait alors une corrélation entre le traitement de l'allergie et la survenue de grossesse.

Dans la population des patientes non traitées, 2,99% ont une infertilité I et 10,87% ont une infertilité II (Tableau 4).

Le traitement par le Zaditen a donné des résultats concluants. La proportion des grossesses enregistrées après traitement s'élève à 77,17% (Tableau 5). Par contre, aucune grossesse n'a été enregistrée chez les patientes non traitées ($p=0,033$).

96,77% des grossesses obtenues dans les deux types d'infertilité sont allées à terme, soit 17,20% dans l'infertilité I et 79,57 % dans l'infertilité II. La différence de proportion entre les grossesses à terme et les grossesses non à terme est significative (Tableau 6, $p=0,0023$). Après les accouchements, 9 enfants sur 10 sont nés vivants (Tableau 7, $p=0,009$).

CONCLUSION

Les états allergiques entraînent l'élévation des Immunoglobulines E qui sont des facteurs agissant sur la fertilité féminine. L'association IgE élevée et infertilité est plus fréquente chez les femmes qui ont au moins une grossesse que celle qui n'en a jamais portée. La prise en charge de l'infertilité féminine incluant le dosage des IgE pourrait révéler le contexte allergique et le traitement par le Kétotifène redonnerait l'espoir de procréation au couple avec une issue favorable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **CHARPIN J.; VERVLOET D.** Allergologie Médecine - Sciences Flammarion; Paris ; 17-32
2. **JACOB S. ; LEVEQUES J. et coll.** Gynecologic allergy to spermatid fluid. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* (Paris). 1997; 26 (8): 825 – 7
3. **VOGT H J.** Sperm intolerance as a possible cause for infertility ? *Hautarzt*. 1996 Apr; 47(4):312-3
4. **HODONOU A. K. S.; BAYILABOU K.; VOVOR M.** La stérilité conjugale en milieu africain au CHU de Lomé : Ses facteurs étiologiques à propos de 976 cas *Gynécologie* ; 1984 ; 35,2 ; 123- 128
5. **CISSE C. T. ; NGOM A. ; AFOUTOU J. M.; MENSAH A.; DIADHIOU F.; WONE I.** Stérilité conjugale à Dakar *Rev. Sages- femmes* ; 1991 ; 15, (5) ; 5-11
6. **ZAC R I.; MACHADO V M. et coll.** Association of allergy, infertility and abortion. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2005 May-Jun; 51(3):177-80
7. **MORIN P.; CHOUKROUN J.; LEBEL B** Fécondité et facteur immunologique- Déduction thérapeutique *Bull. Féd. Soc. Gynecol. Obstet.* ; 1968 ; 20, (5) 409
8. **DOLEN W. K.** The diagnostic allergy laboratory In rose NR, Hamilton RG, Detrick B, eds. *Manuel of clinical laboratory Immunology* 6 th ed. Washington; DC: ASM Press; 2002; 883 – 890.
9. **ZEISS R C; PRUZANSKY J J.** Immunology of IgE – Mediated and other Hypersensitivity states In Grammer L C, Greenberger P A, eds. *Patterson's allergy diseases* 6 th ed. Hagerstown, Md: Lippincott Williams and Wilkins; 2002:43-54
10. **HARRISON R. F.; UNWIN A.** Atopy in couples with unexplained infertility *Br J Obstet. gynaecol.* 1989 Feb; 96 (2): 192 – 5
11. **JOHANSSON S G. et coll.** High prevalence of IgE antibodies among blood donors in Sweden and Norway *Allergy*. 2005 oct; 60 (10): 1312 – 5



EVALUATION DU POUVOIR ANTIPARASITAIRE DES GRAINES DE *CARICA PAPAYA*

AKPONA S. A.⁽¹⁾, OBAMA MENANGA I. O.⁽¹⁾, ABDOULAYE I.⁽²⁾, AYEDOUN A. M.⁽³⁾

1 Laboratoire de biochimie, Faculté de Médecine, Université de Parakou, BP : 123 Parakou

2 Laboratoire de biochimie, CNHU-HKM de Cotonou

3 Laboratoire de chimie FAST Université d'Abomey-Calavi

RESUME

Les auteurs rapportent leurs résultats de l'évaluation du pouvoir antiparasitaire des graines de *Carica papaya* en conditionnement de 200mg par gélule à raison de deux gélules trois fois par jour pendant trois jours. Avec une possibilité de la reprise de la cure à une semaine d'intervalle, l'efficacité du traitement est assez satisfaisante : **83,24%**. L'innocuité du produit est prouvée et sa bonne tolérance permet de le recommander dans le traitement des parasitoses intestinales chez l'enfant comme chez l'adulte en attendant la détermination du spectre d'action du benzyle isothiocyanate qui est le principe actif présumé du produit.

MOTS CLES : *Carica papaya*, parasitoses intestinales, benzyle isothiocyanate.

EVALUATION OF ANTI PARASITE EFFECT OF *CARICA PAPAYA* SEEDS

SUMMARY

The anti parasite effect of *Carica papaya* seeds is evaluated. With two gelules of 200mg/gelule three times a day during three days, the authors point out a good efficacy of the product. This efficacy is enhanced with a second treatment within a week giving a satisfactory treatment result in **83,24%** of the cases treated. A good tolerance of the product allows us to recommend it in the large scale treatment of children and adults people while waiting for the determination of the spectrum activity of the benzyle isothiocyanate, the presume active substance in *Carica papaya* seeds.

KEY WORDS: *Carica papaya*, intestinal parasite, benzyle isothiocyanate.

INTRODUCTION

En République du Bénin comme partout ailleurs en Afrique, les parasitoses intestinales sont fréquentes chez l'enfant et constituent un véritable problème de santé publique. Dans cette tranche de la population, la gravité des troubles est liée à la fois à la nature du parasite et surtout à l'état de santé de l'enfant parasité [8,11].

Dans nos pays aux moyens limités, le manque d'hygiène, la dénutrition larvée et la pratique courante du système du « tout au vent » aggrave la situation et complique la lutte pour la prévention des parasitoses intestinales de l'enfant. Dans le département du Borgou-Alibori, et selon les statistiques des services sanitaires, l'ascaridiose, la lambliaose et l'ankylostomiase comptent parmi les parasites les plus fréquemment rencontrés avec leur cortège de troubles organiques. Ici, devant l'ampleur de ce problème, aggravé par le péril fécal « obligatoire » lié à la rareté de l'eau et surtout en saison sèche et en début de saison pluvieuse, il nous a paru nécessaire de rechercher des solutions alternatives et à moindre

coût pour le traitement des parasitoses intestinales de l'enfant.

Dans ce travail, nous évaluons le pouvoir antiparasitaire des graines de *Carica papaya* largement utilisées dans la pharmacopée traditionnelle sans codification et sans efficacité réellement prouvée.

MATERIEL ET METHODES D'ETUDE

Le matériel végétal est constitué essentiellement de graines de papaye mures collectées fraîches et séchées à l'ombre puis déshydratées au four à 80°C pendant toute une nuit. Les graines séchées sont broyées puis tamisées pour obtenir une poudre fine de granulométrie acceptable pour la fabrication de gélules. Un appareil manuel a servi à la fabrication de gélules de 200 mg conditionnées dans des sachets plastiques à fermeture à raison de 18 gélules par sachet. Le tout est conservé dans des boîtes hermétiques avant l'utilisation.

Un bilan biochimique de base (glycémie, azotémie, créatininémie, transaminasémie, protidémie et taux d'hémoglobine) et une coprologie parasitaire complète ont été réalisés avant l'administration des gélules. Les gélules ont été administrées à des enfants de 5 à 15 ans

recrutés à l'école primaire de Baka, un quartier de la banlieue proche de la ville de Parakou. Les critères de sélection des enfants sont :

- avoir entre 5 et 15 ans et être inscrit à l'école de Baka ;
- avoir une coprologie parasitaire positive ;
- présenter un bilan biochimique rénal et hépatique normal.

Ces critères ont permis de sélectionner 625 enfants parasités qui entrent dans notre étude. Il s'agit d'une étude prospective de type expérimental qui a couvert la période allant de Août 2001 à Juin 2002 en prenant en compte la phase de la collecte des graines, de la fabrication des gélules et, de l'administration puis du contrôle des effets du produit.

Le produit a été administré à tous les enfants quelque soit le type de parasite retrouvé et du mode de leur association. La dose est de deux gélules trois fois par jour pendant trois jours. La prise du matin est accompagnée d'un bol de bouillie ; celle du midi et du soir d'un morceau de biscuit et/ ou de bonbon. Dans tous les cas les enfants sont restés sous la surveillance d'un adulte pour éviter qu'ils ne jettent

les gélules et introduire un biais dans les résultats.

Une semaine après la première prise, un bilan biochimique et une coprologie de contrôle ont été pratiqués pour vérifier l'état des fonctions hépatique et rénale puis le statut parasitaire de l'enfant traité.

RESULTATS

Les enfants répondant aux critères d'inclusion pour notre étude sont au nombre de 625. ils représentent 74,31% des 841 enfants de l'école de Baka située dans la banlieue Est de la ville et dépourvue de latrines, d'adduction d'eau potable et de puits aménagés. Ils constituent le lot des enfants parasités de l'école contre 216 soit 25,68% d'enfants présumés sains. Parmi les enfants porteurs de parasites, on dénombre 285 filles (45,60%) contre 340 garçons (54,40%) soit une sexe ratio de 1,2. le tableau n° 1 présente la répartition par tranche d'âge et par sexe de tous les enfants de l'école ayant bénéficié d'une coprologie.

Tableau n°1 : Répartition par tranche d'âge et par sexe de la population d'étude

Sexe \ Age	Masculin		Féminin		Total	
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
5-6 ans	54	11,77	90	23,49	144	17,12
7-8 ans	160	34,94	134	34,90	294	34,96
9-10 ans	166	36,24	137	35,77	303	36,03
11-12 ans	58	12,66	18	04,70	76	09,03
13-14ans	16	03,49	04	01,04	20	02,38
15 ans	04	00,87	-	-	04	00,47
Total	458	54,46	383	45,54	841	100

Sexe ratio = 1,2

Les résultats de la coprologie de départ figurent au tableau n°2 qui permet une appréciation par tranche d'âge et par sexe du statut parasitaire d'une part et de la prévalence des parasitoses d'autre part dans l'école de Baka

Tableau n°2 : Statut parasitaire par âge et par sexe

Sexe \ Age	Masculin		Féminin		Total		Prévalence %
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	
5-6 ans	41	12,05	67	23,50	108	17,28	75,00
7-8 ans	120	35,29	99	34,73	219	35,04	74,50
9-10 ans	122	35,88	102	35,80	224	35,84	73,92
11-12ans	43	12,64	14	04,91	57	09,12	75,00
13-14ans	12	03,52	03	00,58	15	02,40	75,00
15 ans	2	00,58	-	-	02	00,32	50,00
Total	340	54,40	285	45,60	625	100	74,31

Le tableau n° 3 présente par classe le type de parasites rencontré. Il permet de constater que *Ankylostoma duodenale* et les amibes sont les types dominant de parasites dans les conditions de vie des écoliers de Baka

Tableau n°3 : Type et classe des parasites retrouvés

Classe	Types	Nombre	Total%
Protozoaires 86/201 : (44,78%)	Amibes	267	42,72
	<i>Trichomonas intestinalis</i>	10	01,60
	<i>Giardia lombricoides</i>	3	00,48
Plathelminthes 10/201 :(04,97%)	<i>Himinolepis nana</i>	31	04,96
Helminthes 101/201 (50,25%)	Ascaris	3	00,48
	<i>Ankylostoma duodenale</i>	298	47,68
	<i>Schistosoma mansoni</i>	10	01,60
	Anguillules	3	00,48
Total		625	100

Tableau n°4 : Type de parasites et d'association parasitaires

Modalité d'association	Types d'association	Total Nombre	%
Mono parasitisme		283	45,28
Bi parasitisme (52, 33%)	Entamoeba C+H	43	06,88
	Amibe + ténia	21	03,36
	Amibe + Ankylostome	177	28,32
	Amibes+ trichomonas	06	00,96
	Ankylostomes + ténia	80	12,80
Tri parasitisme (2, 38%)	Amibes+Ankylostomes+ténia	10	01,60
	Amibes+trichomonas+ténia	05	00,78
Total		625	100

Tous les enfants, quelque soit la classe, le type de portage parasitaire et le mode d'association des parasites, ont reçu le traitement de deux gélules trois fois par jour pendant les trois jours qu'a duré la prise dans les conditions sus mentionnées. Un contrôle des paramètres biochimiques et de la coprologie parasitaire est réalisé au huitième jour après le traitement. Il permet de constater que les enfants ont eu une coprologie négative dans 78,60% des cas contre 21,40% qui restent porteurs de parasites. Les résultats comparés du bilan biochimique avant et après traitement ne mettent pas en évidence une différence statistiquement significative entre la valeur des différents paramètres étudiés. le tableau n° 5 montre les résultats du traitement à la poudre de graines de *Carica papaya* en fonction du type de parasite et des modalités de leur association. Pour environ 10% de cas d'enfants non retrouvés, ces résultats sont assez satisfaisants.

Tableau n°5 : Résultats après le traitement

Modalités associatives	Types de parasites	Coprologie positive avant traitement	Traitement		Non revus	Efficacité %
			Coprologie Positive	Coprologie Négative		
Mono parasitisme	Ankylostome	273	48	193	32	
	Amibes	216	32	184	-	
	Schistosome	16	08	08	-	80,08
	Ténia	08	-	08	-	
Bi parasitisme	Ankylostome+amibes	88	24	32	32	
	Amibes+ténia	08	-	08	-	85,20
	Amibes+trichomonas	08	-	08	-	
Tri parasitisme	Amibes+ankylostome+trichomonas	08	08	-	-	57,14
Total		625	120	441	64	78,61

Un deuxième traitement administré aux enfants à coprologie positive (19,20% des cas) après la première administration du produit et selon les mêmes modalités a permis de récupérer 21,66% de cas de coprologie négative supplémentaire, soit un gain de 4,63% par rapport à la totalité de l'effectif des enfants présents au contrôle. Ainsi, avec deux prises à une semaine d'intervalle, nous constatons une amélioration de l'efficacité qui passe de 78,61% à 83,24%.

COMMENTAIRES

La phytothérapie à base de plantes médicinales est largement pratiquée par nos populations qui savent différencier dans la flore qui les entoure celle qu'il convient d'utiliser dans telle ou telle situation pathologique. Des recettes existent qui indiquent comment utiliser la graine de papaye pour le traitement de certains troubles digestifs. Les affections du tractus digestif et les parasitoses intestinales sont très fréquentes avec une forte prévalence dans la tranche de 7 à 10 ans parmi les enfants de Baka : 74% de portage.

Un bon conditionnement de la graine de *Carica papaya* administrée à une bonne dose évaluée à partir des données de la pratique traditionnelle nous a permis de traiter 625 enfants dans l'école avec un résultat satisfaisant, 83,24% des enfants sont complètement déparasités après deux traitements à une semaine d'intervalle. Aucun effet secondaire n'a été observé dans le cadre de notre étude.

Les utilisations médicinales de *Carica papaya* sont nombreuses [5,6]. Les graines de papaye sont considérées comme un vermifuge efficace. Dans ces graines, les composés les plus importants sont : la carpasémine un benzyle thiourée, le benzylsénévol qui est un benzyle isothiocyanate, la caricine un glucoside et enfin, la myrosine qui est une enzyme. Le benzyle isothiocyanate serait le seul produit responsable de l'action antiparasitaire de la graine de papaye [7,10]. C'est une substance que l'on peut extraire facilement à l'eau, un solvant polaire par excellence. Elle aurait une action ovicide sur les œufs d'*Ascaris lumbricoïdes* [3,7]. Son action kératolytique permettrait une élimination du parasite dans un état de dégradation plus ou moins avancée. Leur élimination est alors facilitée par un laxatif. Par ailleurs les

graines de papaye auraient une action antibactérienne sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *shigella flexneri* [1,5].

L'efficacité observée et l'innocuité du produit qui est facile à se procurer permettent de le recommander pour un traitement de masse des enfants parasités dans nos écoles. En effet, l'ingestion des gélules n'entraîne aucune modification du bilan rénal et hépatique. Le produit ne semble pas modifier l'homéostasie glucidique et protidique. Son effet semble purement local.

L'extrait aqueux de la graine de *Carica papaya* testé chez le rat permet de conclure à une absence de toxicité chez cet animal [2, 4,9]. Cependant le mode d'action du benzyle isothiocyanate sur les parasites et/ou sur leur paroi reste à déterminer in vitro pour mieux comprendre le mécanisme par lequel ce dérivé détruit ou tue le parasite infestant.

Enfin nous n'avons pas fait une étude comparative de l'efficacité du produit avec celle des antiparasitaires du commerce et, nous n'avons pas non plus déterminé, à proprement parler, le spectre d'action du principe actif du produit. Par ailleurs, nous n'avons pas étudié la dose létale 50 puisque la littérature fait déjà état de l'innocuité du produit comme nous l'avons d'ailleurs confirmé dans notre approche. Malgré cette limite, les gélules de 200mg de la graine de *Carica papaya*, à la dose recommandée donnent de bons résultats avec deux traitements à une semaine d'intervalle.

CONCLUSION

La recherche de solutions alternatives et à moindre coût pour la gestion efficiente des problèmes de santé de nos populations passe par la valorisation des ressources endogènes de la pharmacopée et des plantes médicinales dont foisonnent nos forêts. Cette valorisation passe également par la confiance qu'il faut accorder aux détenteurs du savoir endogène que sont les tradithérapeutes que consulte plus de 90% de la population avant de se référer à nos services de santé. Les graines de *Carica papaya* avec leur efficacité prouvée sur certaines parasitoses intestinales constituent une réponse possible à un traitement de masse, dans nos écoles grâce au conditionnement, à la dose et à la codification que nous avons proposés dans ce travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- BEVER O-B.-Medical plants in tropical West Africa Cambridge University Press, 1986
- 2- BOYLER F. C., DIGGS E. G. –Effect of catecholamines on pregnant rat uterus Journal of Anatomic Pharmacology, 1982; 2, 97-102
- 3- DARR N., GARG L. C., PATHAK R.D.-Antihelminthic activity of *Carica papaya* seeds Indian journal of pharmacology, 1965; 27(12): 335-336
- 4- DAS R. P.-Effect of papaya seeds on the genital organs and fertility of male rats Indian journal of experimental biology, 18, 408-409
- 5- EMERUWA J.-Antibacterial substance from *Carica papaya* fruit extract Journal of natural products, 1982; 45(2): 123-124
- 6- KERHARO J., ADAMS J. G.-La pharmacologie sénégalaise traditionnelle: plantes médicinales et toxiques Edition Vigots et frères, Paris, 1974, 597-602
- 7- KHRISHNAKUMARI M. K., MAJUMBER S. K.-Studies on the antihelminthic activities of seeds of *Carica papaya* linn Anal of biochemistry and experimental medicine, 1960, 20, 551-557
- 8- L'enfant en milieu tropical Parasitoses intestinales Centre international de l'enfance, Paris 1994, 210, 47p
- 9- NIRMAL K., LOHI Y. A. and all-Contraceptive evaluation and toxicological studies of aqueous extract of the seeds of *Carica papaya* in male rabbits Journal of ethnopharmacology, 2000, 70, 17-27
- 10- PANSE T. B., PARANJPE A. S.-Isolation of carpasemine from papaya seeds Proceedings of Indian Academy of Science, 1943, 18A,140
- 11- Parasitoses intestinales de l'enfant Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Paris, 4015F10-1, 1972



ASPECTS CLINIQUES ET HISTOPATHOLOGIQUES DES TUMEURS DU PALAIS EN ORL AU CNHU DE COTONOU (1981-2006)

VIGNIKIN-YEHOUESSI B. (1), FLATIN M. (1), AMOUSSOU C-P. (1),
VODOUHE S-J. (1), HOUNKPE YYC. (1), MEDJI ALP. (1).

(1) Service d'ORL et de Chirurgie cervico-faciale CNHU-Cotonou 01 BP 386 Rep du Bénin.

RESUME

Dans une étude rétrospective entre le 1^{er} Juillet 1981 et le 30 Juin 2006, 56 cas de tumeurs du palais avec confirmation histopathologique ont été recensées en ORL au CNHU de Cotonou soit une moyenne de 2 à 3 par an. Les sujets de sexe féminin ont constitué 62,5% de la série. Au plan clinique, les tumeurs étaient bourgeonnantes 62,5% et ulcéro-bourgeonnantes 20%. Le diamètre de la tumeur a dépassé 4 centimètres dans 66 % des cas. L'examen anatomo-pathologique avait indiqué une tumeur bénigne dans 55,4% et une tumeur maligne dans 44,6%. L'adénome pléomorphe 52% et le carcinome adénoïde kystique ou cylindrome 23% étaient les variétés histopathologiques les plus fréquentes.

Mots-clés : tumeur, palais, adénome pléomorphe, carcinome adénoïde kystique.

CLINIC AND HISTOPATHOLOGIES ASPECTS OF PALATE TUMOURS IN ENT AT CNHU OF COTONOU (1981-2006)

SUMMARY

In a retrospective study, between July 1st, 1981 to June 30th, 2006, 56 cases of palate tumours with histological confirmation have been received in ENT at CNHU of Cotonou. We noted an average of two to three cases per year. Females represented 62,5% of cases against 37,5% for males. On clinical field, the tumours were budding 62,5% and ulcero-nodes 20%. The diameter of the tumour was more than 4-6 centimeters in 66% of cases. The anatomo-pathologic analysis confirmed a benign tumour in 55,4% and malignancy in 44,6%. Pleomorphic adenoma 52% and adenoïde cystic carcinoma 23% were the histological varieties the most frequent.

Key-words : tumour, palate, pleomorphic adenoma, adenoïde cystic carcinoma.

INTRODUCTION

Le palais qu'il soit mou ou osseux peut être le siège d'agressions diverses : infectieuses, traumatiques, allergiques ou tumorales. Cependant les tumeurs semblent être les préoccupations les plus enregistrées en pratique hospitalière ORL.

Ces tumeurs peuvent être aussi bien bénignes que malignes.

En ORL au CNHU, 56 tumeurs histologiquement confirmées du palais ont été recensées en 25 ans. Cette étude vise les manifestations cliniques et histopathologiques de ces tumeurs du palais.

PATIENTS ET METHODE

Cette étude a été réalisée dans le service d'ORL du CNHU de Cotonou. Le matériel était les dossiers des patients reçus et suivis du 1^{er} Juillet 1981 au 30 Juin 2006 soit en 25 ans, pour des tumeurs du palais avec confirmation histopathologique et des comptes rendus opératoires. Ont été exclus de cette étude, les patients avec des dossiers incomplets ou inexploitable. Au total 56 dossiers ont été retenus. Les paramètres étudiés ont été : l'âge, le sexe, les motifs de consultation, les caractéristiques cliniques et histopathologiques. L'analyse de ces données a été réalisée grâce aux logiciels Epi info et excel.

RESULTATS

EPIDEMIOLOGIE

Incidence

En 25 ans 56 tumeurs histologiquement confirmées du palais ont été recensés en ORL au CNHU de Cotonou soit une moyenne 2 à 3 cas de tumeur du palais par an.

Age

Le tableau n° I donne la répartition selon l'âge en années.

Tableau n° I : Répartition selon l'âge (année)

Age	Nbre de cas	%
10-20	09	17,07
21-30	15	26,78
31-40	07	12,50
41-50	04	07,14
51-60	11	19,64
61et +	10	17,85
Total	56	100

Sexe

Sur les 56 sujets reçus et suivis pour des tumeurs du palais, 35 sujets soit 62,5% ont été de sexe féminin contre 21 sujets soit 37,5% de sexe masculin. La sex-ratio a été de 1,6 au risque du sexe féminin.

CLINIQUE

Motif de consultation

Le tableau n° II indique la répartition selon le motif de consultation.

Tableau n° II : Répartition selon le motif de consultation

Motifs de consultations	Nbre de cas	%
Gêne endobuccale	38	67,85
Douleur spontanée	08	14,28
Hémorragie endobuccale	06	10,71
Découverte fortuite	04	07,14
Total	56	100

Caractéristiques des tumeurs

Le tableau n° III donne des précisions sur les caractéristiques des tumeurs

Tableau n° III : Répartition selon les caractéristiques des tumeurs

Caractéristiques cliniques	Nbre de cas	%
Siège (série)	56	100
Atteinte de tout le palais	30	53,57
Hémi-palais osseux gauche	15	26,78
Hémi-palais osseux droit	08	14,28
Tout le voile	02	03,57
Hémi-voile gauche	01	01,78
Aspect macroscopique (série)	56	100
Bourgeonnant	35	62,50
Ulcéré	08	14,28
Ulcéro-bourgeonnant	10	17,85
Infiltrant	03	05,35
Diamètre (série) centimètre	56	100
2 – 4	19	33,92
4 – 6	29	51,78
+ de 6	08	14,28
Mobilité (série)	56	100
Mobile	44	78,57
Fixée	12	21,42
Consistance (série)	56	100
Ferme	33	58,92
Rénitente	16	28,57
Dure	07	12,50
Adénopathie homolatérale	10	17,85
Tumeur concomitante	01	01,78
Sérologie VIH	02	03,57

VARIETES HISTOLOGIQUES

Le tableau n° IV renseigne sur les variétés histopathologiques des tumeurs reçues.

Tableau n° IV : Répartition selon l'histopathologie

Histopathologie	Nbre de cas	%
Tumeurs bénignes	31	55,35
Adénome pléomorphe	29	51,78
Adénome monomorphe	01	01,78
Oncocytome	01	01,78
Tumeurs malignes	25	44,65
Carcinome adénoïde kystique	13	23,21
Adénocarcinome	04	07,14
Carcinome épidermoïde	07	12,50
Carcinome muco-épidermoïde	01	01,78
Total	56	100

COMMENTAIRES

Au plan épidémiologique

En ORL au CNHU de Cotonou (BENIN), Nous avons reçu 2 à 3 cas par an de tumeurs du palais. Ce taux est resté en dessous du taux réel, car seuls ont été pris en compte les cas admis en ORL et documentés.

Lorsque l'on se réfère à la littérature, ce taux est variable. PANDEY M. et coll (1) en Inde en 2003 ont recensé 42 tumeurs malignes du palais en 17 ans soit 2 à 3 cas par an. BATAINEH AB et coll (2) en Jordanie en 2002, ont enregistré 6 cas par an d'adénome pléomorphe du palais.

Le plus grand taux a été noté en Chine où LI YN et coll (3) en 2004 ont retrouvé 30 cas par an. Quant à l'âge, le plus jeune de notre série avait 15 ans et le plus âgé avait 90 ans. Il a existé une prédominance des tumeurs bénignes chez les sujets jeunes avec une moyenne d'âge de 22 ans et une prédominance de cancer chez les sujets âgés (leur moyenne d'âge était de 51 ans). BATAINEH AB et coll (2) en Jordanie ont rapporté des âges allant de 15 à 25 ans pour l'adénome pléomorphe du palais. Pour LI YN et coll (3) en Chine l'âge moyen a été de 40,9 ans pour les tumeurs bénignes et de 49,1 ans pour les tumeurs malignes. Mais le sujet peut être beaucoup plus jeune. LIANG CC et coll (4) en Taïwan en 2003 ont rapporté un cas de tératome bénin du palais chez une fillette de 4 ans.

Selon le sexe, il a été noté une prédominance féminine dans notre série d'étude. La littérature a rapporté une variabilité. LI YN et coll (3) en Chine ont signalé une prédominance féminine en cas de tumeur bénigne alors que le sexe masculin a été majoritaire pour les tumeurs malignes. Pour PANDEY M. et coll (1) en Inde, la prédominance y était masculine avec une sex ratio de 1,4 dans une étude sur les tumeurs malignes du palais.

Au plan clinique

Dans la série d'étude, le principal motif de consultation a été la gêne endobuccale 64% des cas. Pour MURTHY SV et coll (5) en Inde, ce motif peut être un syndrome d'apnée du sommeil en rapport avec l'augmentation de volume de la tumeur. Pour PANDEY M. et coll (1) en Inde, le motif de consultation a été représenté par la survenue d'une masse palatine progressivement douloureuse. Et pour LIANG CC et coll (4) en Taïwan, le motif de consultation a été une rhinolalie. Quant aux caractéristiques cliniques des tumeurs, elles ont varié d'un type histologique à un autre. Pour l'ensemble des tumeurs de notre série, la masse palatine occupe presque tout le palais dans 54%. La masse était bourgeonnante 60%, sans saignement 60%, mesurant 6 centimètres au moins 76%, mobilisable 76%, ferme 58% et sans adénopathie 80%. Les adénopathies ont été palpées dans 10 cas de tumeurs malignes : (10 sur 23 cas soit 43,5%).

Pour CLAUSER L. et coll (6) en Italie en 2004, l'adénome pléomorphe du palais se présente sous la forme de masse ferme, peu douloureuse dans la majorité des cas, sans ulcération et généralement mobile. Pour CHEN YK. et coll (7) à Taïwan en 2004, l'adénome pléomorphe du palais peut dans de rares cas donner lieu à une nécrose étendue surtout à l'occasion de transformation kystique posant ainsi en l'absence d'examen anatomopathologique, un problème de diagnostic différentiel. Pour PANDEY M. et coll (1) en Inde, les tumeurs malignes du palais se présentent sous la forme d'une masse progressivement douloureuse, ulcérée ou non avec des adénopathies cervicales palpables dans 33% des cas.

Au plan anatomie pathologique

Nous avons recensé dans notre série d'étude 55,35% de tumeurs bénignes contre 44,65% de tumeurs malignes. Le type histopathologique bénin le plus rencontré a été l'adénome pléomorphe 52% de la série et 92,5% des tumeurs bénignes. Le carcinome adénoïde kystique ou cylindre du palais a représenté 22% de la série et 47,8% des tumeurs malignes. CLAUSER L. et coll (6) en Italie ont rapporté 70% d'adénome pléomorphe, tandis que PANDEY M. et coll (1) en Inde ont trouvé le carcinome muco-épidermoïde comme le type histopathologique prédominant parmi les tumeurs malignes. LI YN et coll (3) en Chine ont trouvé quant à eux 43% de tumeurs bénignes contre 57% de tumeurs malignes.

L'adénome pléomorphe a occupé la première place dans le groupe des tumeurs bénignes 38,1% de leur série, et le carcinome adénoïde kystique a été en tête dans le groupe des tumeurs malignes 18% de leur série.

CONCLUSION

Les tumeurs du palais ne sont pas rares. Alors que les tumeurs bénignes s'observent chez le sujet jeune, les cancers sont l'apanage de l'adulte et du sujet âgé. L'adénome pléomorphe est le type histopathologique bénin le plus enregistré et le carcinome adénoïde kystique ou cylindre la variété maligne la plus retrouvée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1. PANDEY M., THOMS S., MATHEW A., NAIR MK.** Malignant tumors of the minor salivary glands : a survival analysis of 17 years from a tertiary referral cancer center. J. post grad med. 2003, 49, 25-28
- 2. BATAINEH AB., AL-DWAIRI ZN.** Surgical management of pleomorphic Adenoma of the palate J Ir Dent Assoc. 2002, 48, 126-131.
- 3. LI YN, HE ZX, LIU LK, HE HW.** A retrospective study on 615 cases of Minor salivary gland tumors Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2004, 22, 204-206.
- 4. LIANG CC, LAI JP, LUI CC.** Cleft palate with congenital midline teratoma Ann Plast Surg. 2003, 50, 550-554.
- 5. MURTHY SV MURTHY NC BELAGAVI CS MUNISHWARA GB.** A large pleomorphic adenoma of soft palate causing sleep apnea syndrome a case report. Indian J Pathol Microbiol. 2003, 46, 466-467.
- 6. CLAUSER L, MANDRIOLI S, DALLERA V, SARTI E, GALIE M, CAVAZZINI L.** Pleomorphic adenoma of the palate J Craniofac Surg. 2004, 15, 1026-1029.
- 7. CHEN YK, LIN CC, LAI S, CHEN CH, WANG WC, LIN YR, HSUE SS, LIN LM.** Pleomorphic adenoma with extensive necrosis :report of two cases Oral Dis. 2004, 10, 54-59.



EFFETS DE ANANAS COMOSUS, (VARIETE « PAIN DE SUCRE ») SUR LES LESIONS HEPATIQUES DUES A L'INTOXICATION AU PARACETAMOL CHEZ LE RAT WISTAR

DOUGNON T. Jacques¹, KPODEKON T¹. Marc, LALEYE Anatole², ADJAGBA Marius² et DARBOUX B. Raphaël²

1: Laboratoire de Recherches en Biologie Appliquée (LARBA), Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), Université d'Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 2009 Cotonou, Bénin.
2 : Unité de Biologie Humaine Laboratoire d'Histologie FSS/ UAC, 01 BP188 Cotonou

Auteur correspondant : DOUGNON T. Jacques, Laboratoire de Recherches en Biologie Appliquée, mail : dougnonj@yahoo.fr

RESUME

Des altérations morphologiques ont été recherchées sur le foie de rats Wistar préalablement intoxiqués au paracétamol et traités avec *Ananas comosus* frais, variété « Pain de sucre ».

Le Doliprane® utilisé à raison de 2 g/kg de poids corporel et qui contient 20% de paracétamol actif s'est avéré hépatotoxique chez le rat Wistar. L'ananas frais, variété "pain de sucre" distribué à raison de 26 mg/kg de poids vif a eu un effet réparateur sur les lésions hépatiques chez les rats intoxiqués. Ces observations seraient en rapport avec les effets biologiques de la bromélaïne, principale enzyme de l'ananas.

Mots clés : *Ananas comosus*, hépatotoxicité, rat Wistar

Effects of COMOSUS pineapple, (a variety of "Sugar loaf pineapple") on hepatic lesions due to the intoxication caused by paracetamol in wistar rat.

SUMMARY

Morphological changes have been inquired into, on the Wistar rat's liver precedently intoxicated by paracetamol and treated with fresh *Comosus pineapple* "a sugar loaf pineapple variety".

The Doliprane® used on the basis of 2g per kg of body weight and that contains 20% of active paracetamol proved to be hepatotoxic in Wistar rat fresh pineapple, "a sugar loaf variety" distributed on the basis of 26mg per kg of fresh weight has had a repairing or reconstructive effect on the hepatic lesions in intoxicated rats.

These remarks would have to do with the biological effects of bromelain contained in the pineapple.

Key-words: *comosus pineapple*, hepatotoxicity, Wistar rat

INTRODUCTION

De nombreux agents exogènes agressent le foie et affectent son fonctionnement physiologique.

En Afrique et en Asie, les affections hépatiques, qu'elles soient d'origine toxique ou infectieuse sont fréquentes et constituent un véritable problème de santé humaine. La consommation exagérée d'alcool, les infections du foie dues aux bactéries et aux virus, l'aflatoxine et l'utilisation non contrôlée de médicaments en sont souvent les facteurs favorisants [1].

Souvent, le mauvais pronostic et les traitements onéreux liés aux atteintes hépatiques notamment les hépatites virales, peuvent entraîner des complications et des récives surtout dans les pays en voie de développement où l'auto-médication est fréquente [2].

L'issue de telles affections est généralement fatale dans un tableau de cachexie et de dou-

leurs, car les traitements mis en place sont souvent prohibitifs et inefficaces. Dans ces conditions, l'utilisation scientifique et rationnelle des plantes médicinales pourrait constituer une alternative thérapeutique en raison de son accessibilité dans la plupart des régions d'Afrique. L'ananas a été identifié comme un fruit efficace dans le traitement des états d'hépatotoxicité ; sa principale substance active est la bromélaïne.

Cette enzyme qui se trouve autant dans la plante que dans le fruit, exercerait selon Hou et coll., 2006 [3], de multiples actions dont notamment des effets anti-inflammatoire, anti-tumorale et anti-œdémateuse.

La présente étude a pour but d'évaluer sur la base d'études morphologiques, les propriétés de détoxication de *Ananas comosus* sur le foie

de rats Wistar préalablement intoxiqués au paracétamol.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Le matériel animal est constitué de 27 rats mâles albinos de souche Wistar répartis en trois lots de 9 animaux.

Le Doliprane® utilisé en vue de l'induction de l'intoxication hépatique contient 20% de paracétamol.

Le matériel végétal est constitué de pédoncule d'*ananas comosus* frais. Ce pédoncule est pesé et distribué frais aux rats élevés dans des cages individuelles à raison de 26 mg/kg de poids vif. L'ananas frais, distribué aux rats en fonction de leur poids contient 13, 51% de matière sèche déterminée en faisant séjourner le pédoncule pendant 24 heures à une température de 100° C dans une étuve.

Méthodes

Le lot 1 ou lot « témoin » n'a reçu ni paracétamol, ni ananas frais.

Le lot 2 ou lot « intoxiqué et traité » est constitué de rats ayant reçu du Doliprane® à la dose de 2 g/kg de poids corporel par jour pendant 2 semaines puis traités avec de l'ananas frais à raison de 26 mg/kg de poids corporel par jour pendant 4 semaines.

Le lot 3 ou lot « intoxiqué et non traité » renferme les rats Wistar qui ont reçu du Doliprane® à raison de 2g/kg de poids corporel par jour pendant 2 semaines et n'ont reçu aucun traitement avec l'ananas frais.

Les différents traitements au paracétamol sont effectués par gavage dans un volume final de 2 ml d'eau.

Au terme de deux semaines d'intoxication au Paracétamol puis de 4 semaines de traitement avec de l'ananas frais, 50% de l'effectif de chaque lot ont été sacrifiés, leurs foies examinés, prélevés, pesés puis fixés au formol tamponné à 10%. Les foies de rats ainsi fixés, ont servi à la confection de coupes histologiques de 5µm d'épaisseur, colorées à l'hématéine-éosine. Elles sont observées sur un microscope photonique de marque Olympus BX-41 muni d'une caméra (JVC, ½ pouces). Les observations sont faites au grossissement X20. Les images sont enregistrées au format JPEG sur un ordinateur.

RESULTATS ET DISCUSSION

Aucun signe clinique d'intoxication ni de mortalité n'a été observé chez les animaux. Au plan macroscopique, le foie des rats intoxiqués au Paracétamol et non traités avec de l'ananas a une coloration jaunâtre, comparé à celle du foie normal rouge sombre chez le rat non intoxiqué. La consistance du foie du rat intoxiqué est friable. Le poids moyen du foie chez le rat intoxiqué est passé de 3 g à 2,1g. Chez les rats intoxiqués au paracétamol et traités avec de l'ananas frais, le gain moyen de poids du foie a été de l'ordre de 21g avec une consistance plus dure et une coloration moins ictérique.

En microscopie photonique, les figures 1, 2 et 3 montrent respectivement les photos de foie normal de rats Wistar ; de foie de rats intoxiqués au paracétamol et non traités puis de foie de rats intoxiqués au paracétamol et traités avec de l'ananas frais.

Chez les rats du lot témoin, l'architecture du parenchyme hépatique est normal marqué par des travées hépatocytaires disposées de façon radiaire autour de la veine centrolobulaire. Les hépatocytes présentent un cytoplasme, basophile et volumineux, un ou deux noyaux bien visibles et peu colorés (figure 1).

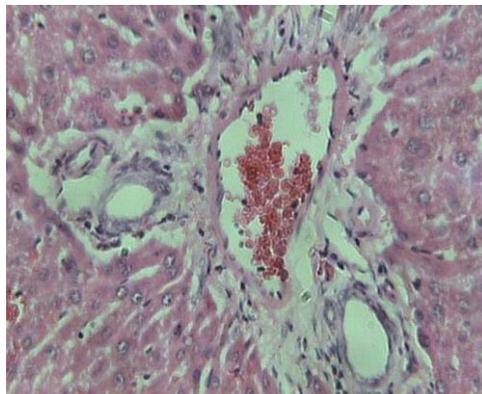
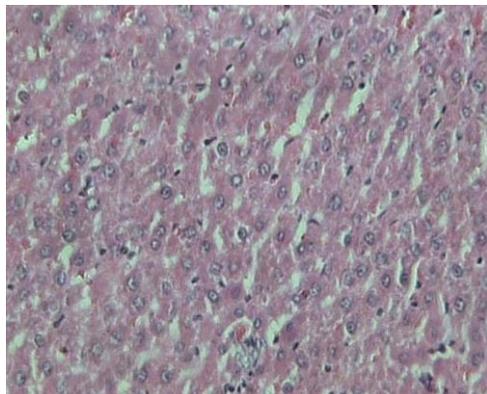


Figure 1 : Aspects morphologiques du foie normal de rat Wistar (HE grossissement X20). Le parenchyme hépatique est fait de travées d'hépatocytes disposés de façon radiaire autour d'une veine centrolobulaire: ce sont des cellules au cytoplasme important et basophile ; leur noyau bien visible est légèrement pâle. Les travées hépatiques sont peu espacées

Chez les rats du lot 2 c'est-à-dire intoxiqués avec du paracétamol et non traités avec de l'ananas frais, le parenchyme hépatique est désorganisé avec élargissement des espaces entre les travées hépatiques. Les noyaux des hépatocytes sont pycnotiques, le cytoplasme est moins dense et acidophile. Les sinusoides hépatiques sont presque absents (figure 2).

Quant au foie des rats intoxiqués avec du paracétamol et traités avec de l'ananas frais (lot 3), le parenchyme hépatique est à différents stades de régénérescence ; les noyaux sont moins sombres, les espaces entre les travées hépatiques moins larges ; le cytoplasme des cellules hépatiques acquiert sa basophilie (figure 3).

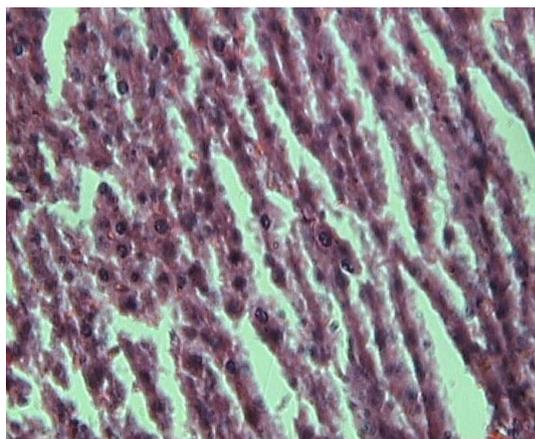


Figure 2 : Foie de rat intoxiqué au paracétamol (HE X20)
Le parenchyme hépatique est désorganisé : les espaces entre les travées hépatiques sont larges, les noyaux d'hépatocytes sont pycnotiques voire absents ; leur cytoplasme est moins dense et légèrement acidophile ; les sinusoides hépatiques sont presque absents

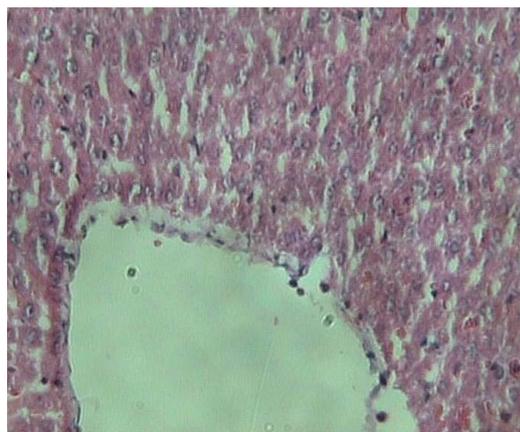


Figure 3 : Foie de rat intoxiqué au paracétamol et traité à l'ananas (HE X20). Le parenchyme reprend progressivement son organisation fonctionnelle avec des noyaux moins sombres, des espaces entre travées hépatiques moins larges

Les lésions hépatiques similaires à celles observées chez les animaux qui ont été intoxiqués avec du paracétamol et qui n'ont reçu aucun traitement à base d'ananas ont été notées chez l'homme par Knight et coll., 2003 [4] dans des cas d'intoxication avec le paracétamol. Ce produit en cas de surdosage provoque une dégénérescence hépatique grave. Le paracétamol est largement métabolisé par le foie en dérivés glucuro ou sulfoconjugués. En temps normal, une faible fraction de ces dérivés est transformée en un métabolite très réactif, le N-acétyl-*p*-benzoquinimine qui réagit rapidement avec le glutathion dont il diminue les concentrations. En cas de surdosage, cette réaction devient importante et induit une déplétion plus rapide en glutathion, à l'origine d'un stress oxydatif pouvant entraîner une nécrose hépatique surtout centrolobulaire. La toxicité hépatique impliquerait également une production de peroxy-nitrites à l'origine d'un stress nitrosant [5].

Le paracétamol est un toxique qui agit avec retard sur son organe cible principal, le foie. Toutefois, une intoxication aiguë, souvent ac-

cidentelle chez l'enfant, volontaire chez l'adulte, peut provoquer une insuffisance hépatocellulaire aiguë par nécrose hépatique centrolobulaire [6]. La toxicité du paracétamol est souvent majorée chez les sujets présentant une induction enzymatique (barbituriques, alcool) ou une déplétion chronique en glutathion (dénutrition, alcoolisme chronique). La dose toxique chez l'homme adulte est comprise entre 10 et 15 grammes de paracétamol en prise unique [7]. Chez les patients qui présentent un déficit en glutathion (dénutris, alcooliques chroniques, femme enceinte) et chez les patients traités par inducteurs enzymatiques (rifampicine, phénobarbital, carbamazépine, phénytoïne), le seuil de toxicité est abaissé à 5 grammes. La dose de paracétamol utilisée au cours de nos travaux pour induire une atteinte hépatique chez le rat est de 2 mg/kg de poids corporel par jour pendant 2 semaines.

La dose de paracétamol utilisée au cours de nos travaux pour induire une atteinte hépatique est de 2 g/kg de poids corporel par jour pendant 2 semaines. L'action cytolytique du paracétamol sur le foie serait également liée à une

inhibition de la cyclooxygénase ce qui provoque une ischémie ayant pour conséquence la nécrose hépatocytaire [8].

L'ananas frais utilisé a réduit la gravité de l'intoxication hépatique due au paracétamol chez le rat Wistar. Cet effet favorable de l'ananas serait en rapport avec la présence dans ce fruit d'une enzyme appelée bromélaïne [9].

La bromélaïne, enzyme protéolytique agit sur les prostaglandines et inhibe la bradykinine, une substance qui accroît la perméabilité vasculaire et qui stimule la douleur [6]. De même, cette enzyme favorise la production de cytokines, éléments catalyseurs du système immunitaire et du stress [3]. La bromélaïne réduit la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT), enzyme plasmatique dont le taux augmente dans les atteintes hépatiques comme les lésions liées à l'intoxication au paracétamol.

Les différents effets biologiques de cette enzyme pourraient expliquer le rétablissement progressif des structures hépatiques préalablement désorganisées suite au surdosage au paracétamol. Il est aussi important de signaler que la bromélaïne est la principale enzyme que renferme l'ananas [10].

Cette enzyme a des propriétés anti-oedémateuses, anti-inflammatoires, anti-

thrombotiques et anti-fibrinolytiques qui pourraient être favorables au processus de réparation suite à la nécrose hépatocytaire.

L'administration par voie orale de la bromélaïne n'a aucun effet indésirable et l'enzyme est un produit d'usage courant en phytothérapie. Même si des anticorps anti-bromélaïne se libèrent lors de son utilisation prolongée, ceci n'affecte pas l'activité anti-inflammatoire et renforce l'action réparatrice de l'ananas au niveau du foie [11].

CONCLUSION

De l'analyse de la présente étude il ressort que:

i) le paracétamol utilisé à raison de 2g/kg de poids vif s'est avéré hépatotoxique chez le rat Wistar

ii) Ananas *comosus* frais (ou variété "pain de sucre") distribué dans l'alimentation à raison de 26 mg/kg de poids vif a eu un effet réparateur des lésions hépatiques chez les rats intoxiqués au paracétamol.

Certes, d'autres travaux s'avèrent nécessaires pour extraire la bromélaïne, l'utiliser directement chez les rats Wistar intoxiqués au paracétamol et cerner ces mécanismes d'action dans le processus de réparation hépatocytaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Brandt K. (2003). Le paracétamol dans le traitement des douleurs arthrosiques . *Drugs*; **63**, N° spécial 2, 23-41.
2. Rosmorduc. O., (2005). Essai thérapeutique randomisé de traitement adjuvant du carcinome hépatocellulaire (CHC) par l'Iressa. Ouverture du colloque sur le cancer du foie, Hôpital Saint-Antoine. Journal du SIDA. N. 181-France.
3. Hou R. G., Chen Y. S., Huang J. R. Jeng K. C. (2006). Cross-linked bromelain inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production involving cellular signaling suppression in rats. *J Agric Food Chem*; **54** (6): 2193-8.
4. Knight T.R., Fariss M.W., Farhood A., Jaeschke H. (2003). Role of lipid peroxidation as a 5-mechanism of liver injury after acetaminophen overdose in mice. *Toxicol Sci*; **76** (1): 229-36.
5. Danel V. (2004). Intoxication aiguë par le paracétamol. In : Carli P. Protocoles - Urgences, plans et schémas thérapeutiques. *Editions Scientifiques L* ; **4** : 193-195
6. Beuth J., Braun J. M. (2005). Modulation of murine tumor growth and colonization by bromelain, an extract of the pineapple plant (*Ananas comosum* L.). *In Vivo*; **19** (2): 483-5
7. Prescott L.F. (2000). Paracetamol, alcohol and the liver. *Br J Clin Pharmacol*, **49**, 291-301.
8. Maurer H.R. (2001). Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell Mol Life sci*; **58** (9): 1234-45
9. Brien S., Lewith G., Walker A. F., Middleton R., Prescott P., Bundy R. (2006). Bromelain as an adjunctive treatment for moderate- to-severe osteoarthritis of the knee: a randomized placebo-controlled pilot study. *OJM*; **99** (12): 841-50.
10. Hale L. P., Fitzhugh D. J., Staats H. F. (2006). Oral immunogenicity of the plant proteinase bromelain. *Int Immunopharmacol*; **6** (13-14): 2038-46.
11. Orsini R. A. (2006). Bromelain. *Plast Reconstr Surg*; **118** (7): 1640-4.



ACTIVITES ANTIBACTERIENNES DE QUELQUES PLANTES DE LA PHARMACOPEE AFRICAINE SUR DES SOUCHES DE *Escherichia coli* PRODUCTRICES DE β LACTAMASES

ANAGO^a Eugénie, GBENOU^b Joachim, BANKOLE^c Honoré, ADJILE^a Aurelle, KOUSSEMOU^a Hugues, BIO NIGAN^a Safiath, YAROU MAYE^a Alexis, LOKO^a Frédéric *, MOUDACHIROU^b Mansourou

a = Laboratoire de Biochimie. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi (UAC). B.P. 2009 Cotonou, BÉNIN.

b = Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles. Faculté des Sciences et Techniques/ Faculté des Sciences de la Santé. Université d'Abomey-Calavi (UAC). BÉNIN.

c = Laboratoire de Microbiologie. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi (UAC). B.P. 2009. Cotonou BÉNIN.

* Correspondance : Professeur LOKO Frédéric. Laboratoire de Biochimie. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi. B.P. 2009 Cotonou. BÉNIN.

E-mail : lokofrederic@hotmail.com

RÉSUMÉ

38 extraits totaux éthanoliques de divers organes d'espèces végétales de la pharmacopée africaine ont été testés en vue de dépister des activités antibactériennes éventuelles sur des souches de *Escherichia coli* productrices de β lactamases. 5 extraits inhibent à 100% la croissance d'une souche de *E. coli* productrice de β lactamase à spectre élargi (BLSE).

Boswellia dalzielii et *Flacourcia flavescens willd* ont été sélectionnés parmi ces cinq espèces végétales pour déterminer leur action inhibitrice sur 35 souches de *E. coli* productrices de BLSE. *Boswellia dalzielii* présente le taux d'inhibition le plus élevé (94% des souches de *E. coli* productrices de BLSE sont inhibées à 100%).

Les CMI et CMB de l'extrait total de *Boswellia dalzielii* ont été déterminées sur 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE. Les rapports CMB/CMI correspondants se situent entre 1,0 et 1,70. Les écorces de *Boswellia dalzielii* pourraient donc receler des principes actifs à action bactéricide sur les souches de *E. coli* productrices de BLSE.

Mots-clés : Plantes médicinales, activité antibactérienne, *Escherichia coli*, résistance bactérienne, β lactamases, *Boswellia dalzielii*.

Antibacterial activity of a few traditional medicinal plants against beta-lactamase-producing *Escherichia coli*.

SUMMARY

To aim to detect their antimicrobial activity, 38 ethanolic plants extracts have been tested on β lactamases-producing *Escherichia coli* (*E. coli*) strains. An extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* strain was sensitive to 5 plants. Among these, 2 plants extracts were selected in aim to determine the susceptibility of 35 ESBL producing *E. coli* strains. *Boswellia dalzielii* exhibited the highest antimicrobial activity (94% of the tested strains were 100% inhibited).

The MICs and MBCs of *Boswellia dalzielii* were determined using 10 *E. coli* strains which are ESBL producers.

The average values MBC/MIC are between 1.0 and 1.70. The barks of *Boswellia dalzielii* might contain compounds with antibacterial activity.

Keywords: traditional medicinal plants, antibacterial activity, *Escherichia coli*, bacterial resistance, beta-lactamases, *Boswellia dalzielii*.

INTRODUCTION

Depuis l'introduction des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, le problème de l'augmentation régulière de la résistance des bactéries se pose de façon constante [1].

Parmi les mécanismes mis en jeu par les bactéries pour résister aux antibiotiques la production d'enzymes inactivatrices occupe une place prépondérante notamment chez les bacilles à Gram négatif (BGN)[2].

Parmi ces enzymes inactivatrices, les β lactamases qui entraînent la perte de l'activité anti-

bactérienne de la β lactamine occupent une place remarquable. L'émergence des souches d'entérobactéries productrices de BLSE constitue un problème préoccupant, puisque ces germes sont responsables d'infections nosocomiales de plus en plus fréquentes dans certains services hospitaliers [3,4].

Les β lactamines occupent une place importante parmi les différentes familles d'antibiotiques utilisées en infectiologie eu égard à leur toxicité relativement faible, notamment vis-à-vis des femmes enceintes et

des enfants. Cette diminution de la stabilité des β lactamines en présence des β lactamases limite donc leur efficacité dans le traitement des maladies infectieuses.

Les échecs thérapeutiques dus à l'émergence des germes multirésistants imposent le recours à de nouvelles sources moins onéreuses et plus accessibles à nos populations, pour le traitement des maladies infectieuses : les plantes utilisées en médecine traditionnelle pourraient répondre à ces exigences.

La production de β lactamases est le mécanisme de résistance le plus fréquent chez les BGN en général et *E. coli* en particulier [5]. Trois groupes de β lactamases sont connues : les pénicillinases qui hydrolysent les pénicillines, les céphalosporinases qui hydrolysent les céphalosporines et les BLSE qui hydrolysent les pénicillines et les céphalosporines. Les BLSE sont apparues à la suite de mutations de pénicillinases bien connues : SHV1, TEM1, etc. La première souche a été décrite à Francfort en 1983 et en France en 1985 [6,7]. Depuis lors, la résistance s'est répandue aux autres β lactamines et particulièrement de nos jours, aux céphalosporines de 3^{ème} génération (Céfotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone) et aux

monobactames (Aztréonam). Les BLSE peuvent être inhibées par des inhibiteurs de β lactamases tel que l'acide clavulanique. Elles se rencontrent fréquemment chez *E. coli*, mais aussi chez d'autres BGN [8,9].

Les plantes étudiées sont couramment utilisées dans la pharmacopée africaine, dans le traitement des maladies infectieuses ou parasitaires (infections digestives, urinaires, génitales, oropharyngées, ulcérations de la peau, états fébriles etc ...) [10]

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

35 souches de *E. coli* productrices de BLSE sont isolées d'infections du tractus urinaire. 39 espèces végétales de la pharmacopée africaine couramment utilisées dans le traitement de diverses maladies infectieuses sont récoltées. Les essais bactériologiques sont réalisés sur des organes (feuilles, fleurs, graines, écorces, racines, tiges etc .) de ces espèces végétales. Ces espèces ont été identifiées et authentifiées par le Laboratoire d'Ecologie Appliquée de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Méthodes

Préparation des extraits totaux éthanoliques

Les organes séchés sont réduits en poudre. A 20g de poudre on ajoute 100ml d'éthanol à 96°. Le mélange est soumis à une agitation continue pendant 72h puis filtré. Le filtrat est évaporé dans un évaporateur rotatif de type BÜCHI ROTAVAPORT R200. Le concentré est séché à l'étuve à 50°C pendant 72 heures. L'extrait éthanolique obtenu servira pour les essais bactériologiques.

Etudes bactériologiques

Les souches de *E. coli* ont été identifiées avec la galerie API 20E. La détection de β lactamases produites par *E. coli* a été faite en s'inspirant du test acidimétrique en tubes en milieu liquide de Syre [11].

Des solutions de pénicillines et de céphalosporines (Amoxicilline, Amoxicilline+acide clavulanique, Aztréonam, Ceftriaxone, Céfazoline) ont été utilisées en présence de rouge de phénol. La souche de référence de *E. coli* ATCC 25922 a servi comme témoin.

Des solutions (à 200 mg/ml dans l'eau distillée) de 39 extraits totaux de plantes sont stérilisées par filtration sur membrane (pores de 0,2 μ m de diamètre) et testées sur des souches productrices de β lactamases.

Les pourcentages d'inhibition sont déterminés :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{\text{Nombre de colonies (après action de l'E.T. sur la S.B.)}}{\text{Nombre de colonies (dans la S.B.)}} \times 100\%$$

E.T. = extrait total

S.B. = suspension bactérienne

Un extrait est retenu parmi les extraits ayant induit une inhibition à 100% d'une souche de *E. coli* productrice de BLSE. Il a servi pour la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) sur 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE.

La CMI est la concentration pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de germes [12,13]. La CMB est la plus faible concentration pour laquelle il y a 0,1% de bactéries survivantes [12,13].

La CMI et la CMB de *Boswellia dalzielii* ont été déterminées sur 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE suivant le protocole décrit par Courvallin *et coll.* [13].

Études phytochimiques

Des études phytochimiques qualitatives sont réalisées avec la poudre obtenue par broyage des organes séchés. Il s'agit de la mise en évidence des alcaloïdes, des composés polyphénoliques, des dérivés quinoniques, des saponosides, des triterpénoïdes et stéroïdes, des dérivés cyanogénétiques selon le protocole décrit par Houghton *et coll.* [14].

Études statistiques

La variable centrée réduite "Z" mesure la signification de la différence entre la moyenne des CMI et la moyenne des CMB obtenues pour l'activité antibactérienne de l'extrait total de plantes sur des souches de *E. coli* productrices de BLSE. "Z" est calculée selon la méthode de Murray [15].

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Activités antibactériennes de 10 espèces végétales sur une souche de *E. coli* productrice de BLSE

Sur 38 extraits totaux testés, 10 (26%) inhibent à 100% une souche de *E. coli* productrice de céphalosporinase. Des 10 espèces végétales qui inhibent à 100% la souche de *E. coli* productrice de céphalosporinase, 5 (50%) inhibent à 100% une souche de *E. coli* productrice de BLSE.

Tableau I: Activités antibactériennes de 10 espèces végétales sur une souche de *E. coli* productrice de BLSE.

Espèce végétale	Famille	Organe utilisé	Pourcentage d'inhibition
<i>Boswellia dalzielii</i>	Burseraceae	Ecorces	100%
<i>Carapa procera</i>	Meliaceae	Fruits	60%
<i>Ceiba pentadra</i>	Bombacaceae	Ecorces	40%
<i>Enantia chloranta</i>	Annonaceae	Ecorces	80%
<i>Ficus exasperata</i>	Moraceae	Feuilles, tiges, Ecorces	0%
<i>Flacourcia flavescens willd</i>	Flacourtiaceae	Feuilles	100%
<i>Piptadeniastrum africanum</i>	Mimosaceae	Ecorces	80%
<i>Terminalia superba</i>	Combretaceae	Ecorces	100%
<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Ecorces	100%
<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Graines	100%

La production d'une BLSE résulte d'une mutation et confère à l'espèce bactérienne en cause une résistance élargie à de nombreux principes actifs antibiotiques [4, 9, 16].

La différence entre le nombre d'espèces végétales inhibant à 100% la souche de *E. coli* productrice de céphalosporinase et la souche de *E. coli* productrice de BLSE suggère que les principes actifs responsables de ces effets exercent probablement une action directe sur une étape essentielle du métabolisme de ces souches. Il s'agirait alors d'une action réellement antibiotique et non d'un effet antiseptique non spécifique tel qu'il est défini dans la littérature [12].

En conséquence l'inhibition incomplète observée pour 45% des souches serait le reflet de l'existence d'un mécanisme de résistance à l'action antibiotique des extraits concernés. Ce mécanisme pourrait être la production de BLSE.

A cette étape nous ne pourrions affirmer avec certitude que certaines espèces végétales à action antibactérienne étudiées recèlent des β lactamines. Cependant, la présence de BLSE est susceptible d'étendre la résistance des germes en cause à des familles d'antibiotiques autres que les β lactamines (les aminosides par exemple) [17]. Ceci vient conforter la thèse de l'existence de principes actifs antibiotiques au sein de ces espèces végétales.

Deux extraits totaux ont été retenus à l'issue d'un choix aléatoire parmi les extraits totaux qui inhibent à 100% la croissance de la souche de *E. coli* productrice de BLSE. Il s'agit de *Flacourcia flavescens willd* et *Boswellia dalzielii*.

Activités antibactériennes des extraits totaux de *Flacourcia flavescens willd* et *Boswellia dalzielii* sur 35 souches de *E. coli* productrices de BLSE

35 souches productrices de BLSE ont été identifiées. Il s'agit de souches productrices de pénicillines et de céphalosporinase simultanément.

Le Tableau II présente les pourcentages d'inhibition de la croissance de 35 souches de *E. coli* productrices de BLSE. Cette action inhibitrice est observée avec les extraits totaux de feuilles de *Flacourcia flavescens willd* et d'écorces de *Boswellia dalzielii*.

Boswellia dalzielii inhibe à 100% la croissance de 33 souches (94%) de *E. coli* productrices de BLSE. Ce pourcentage de souches inhibées est de (85%) pour *Flacourcia flavescens willd*. *Boswellia dalzielii* a donc été retenu pour la détermination de la CMI et la CMB sur 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE.

Tableau II : Activités antibactériennes des extraits totaux de *Flacourcia flavescens willd* et *Boswellia dalzielii* sur 35 souches de *E. coli* productrices de BLSE

Pourcentage d'inhibition	<i>Flacourcia Flavescens willd</i>		<i>Boswellia dalzielii</i>	
	Nombre de souches	Pourcentage de souches	Nombre de souches	Pourcentage de souches
100%	30	85%	33	94%
80 – 100%	02	06%	00	00%
60 – 80%	01	03%	01	03%
< 60%	02	06%	01	03%

Détermination des CMI et CMB de l'extrait total de *Boswellia dalzielii* sur 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE

Les CMI de l'extrait total d'écorces de *Boswellia dalzielii* sur 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE varient entre 60 et 100 mg/mL.

La plupart des CMB s'inscrivent entre 70 et 100 mg/mL. Une seule CMB est de 170 mg/mL.

Les rapports $\frac{CMB}{CMI}$ correspondants se situent entre 1,0 et 1,70.

On note une grande dispersion des valeurs de CMI (CV =41%). Il en est de même pour les CMB (CV = 40%). La détermination de la valeur centrée réduite a permis de noter qu'il n'existe aucune différence significative entre la moyenne des CMI et celle des CMB. ($Z = + 2,22$; $p < 0,05$).

\bar{X} = moyenne ; CV= Coefficient de variation ; S = écart type.

Tableau III : Détermination de la variable centrée réduite "Z" relative aux CMI et CMB de l'extrait total de *Boswellia dalzielii*.

Nombre de souches	\bar{X}_{CMI}	S_{CMI}	CV_{CMI}	\bar{X}_{CMB}	S_{CMB}	CV_{CMB}	Z
10	6,7	2,7	41%	7,5	3	40%	+ 0,22

La grande dispersion observée pour les valeurs de CMI et de CMB pour 10 souches de *E. coli* productrices de BLSE traduit la grande variation des effets antibactériens de *Boswellia dalzielii* sur ces souches. Cette grande variation pourrait être corrélée avec l'hétérogénéité des caractères biochimiques des BLSE secrétées par différentes souches de *E. coli*, hétérogénéité décrite par ROY et coll. [7].

Les rapports CMB/CMI sont inférieurs à 2 ; on pourrait en déduire que l'extrait total de *Boswellia dalzielii* renferme un ou plusieurs principes actifs antibiotiques à effet bactéricide sur les souches de *E. coli* productrices de BLSE étudiées. L'absence de différence significative entre la moyenne des CMI et celle des CMB vient renforcer cette affirmation.

Etudes phytochimiques de *Flacourcia flavescens willd* et *Boswellia dalzielii*

Les études phytochimiques réalisées ont permis de mettre en évidence dans les extraits de feuilles de *Flacourcia flavescens* la présence de tanins galliques, de flavonoïdes et de mucilage. Les anthocyanes, les dérivés quinoniques et les huiles essentielles sont présents à l'état de traces. Les écorces

de *Boswellia dalzielii* recèlent des tanins catéchiques, des anthocyanes, du mucilage et de l'huile essentielle.

Les tanins, les flavonoïdes, les dérivés quinoniques et les huiles essentielles ont des propriétés antibactériennes, antifongiques, anti-infectieuses et antiseptiques [18]. Ces substances contenues dans les extraits de feuilles de *Flacourcia flavescens willd* et dans l'écorce de *Boswellia dalzielii* pourraient avoir des actions antibactériennes synergiques sur les souches de *E. coli* productrices de BLSE.

Remerciements : Nous remercions la CIUF (Coopération Institutionnelle Universitaire Francophone de Belgique).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BRISSON-NOEL A., TRIEU-CUOT P., SOUGAKOFF W., COURVALLIN P., (1989). Aspects actuels de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Ann. Biol. Clin.* **47**, 98-101.
2. POOLE K., (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**(17) Sep, 2200-2223. Review.
3. MOITIE D., (1988). Les entérobactéries productrices de β lactamases à spectre élargi ; détection, distribution, épidémiologie et attitudes thérapeutiques. Edition Option Bio, Paris ; 12 – 18
4. HYLE E. P., LIPWORTH A. D., ZAOUTIS T. E., NACHAMKIN I., FISHMAN N. O., BILKER W. B., MAO X., LAUTENBACH E., (2005). Risk factors for increasing multidrug resistance among extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Clin Infect. Dis.* **40** (9) 1317 – 1324
5. SEFTON A. M., (2000) The impact of resistance on the management of urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **4**, 489 – 491.
6. ROY O., (1988). Les β -Lactamases. Edition Option Bio, Paris.
7. BUVAL J., SOUSSY C., (1990). Antibiothérapie. Edition Masson, Paris.
8. BRADFORD P.A, (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21ST - Century: characterization, epidemiology and detection of the important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 933-951
9. TANKHIWALE S.S., JALGAONKAR S.V., AHAMAD S., HASSANI U., (2004). Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates. *Indian J Med Res.* **120** (6) Dec, 553 –556
10. NEUWINGER H. D., (2000). African Traditional Medicine : A Dictionary of Plant Use and Applications. Editions Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.
11. SYRE R. B., (1981). Methods for detecting β -Lactamases. Edition D. S. REEVES, Livingstone, 64- 89
12. COURVALLIN P., GOLDJSEIN P., PHILIPPON A., SIROT J., (1985) L'Antibiogramme. Edition MPC-VIDEON, Paris.
13. BERCHE P., GAILLARD J. L., SIMONET M., (1989). Bactéries des infections humaines, Edition Flammarion Médecine-Sciences, Paris .
14. HOUGHTON P. J., RAMAN A., (1998). Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts, Thomson Publishing first edition 154-162.
15. MURRAY R., (1972). Théorie et application de la statistique, Edition M. C. Gray-Hill-Inc. New-York, 73
16. DAOUD Z., HAKIME N., (2003). Prevalence and susceptibility patterns of extended-spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon. *Rev ESP Quimioter*, **16** (2), 233 – 238.
17. HANSEN D. S., SIROT D., KOLMOS H. G., (1998). Extended spectrum beta-lactamases in danish *Klebsiella* isolates. *Ugeskr Laeger*, **15** 2261 – 2262.
18. BRUNETON J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Editions Tec et Doc Paris ; Editions médicinales internationales, 3^e édition, 1120.



ETUDES PHYTOCHIMIQUES DES FEUILLES DE *RYTIGYNIA CANTHIOIDES* (BENTH.) ROBYNS (RUBIACEAE), UNE PLANTE MEDICINALE ET ALIMENTAIRE UTILISEE AU BENIN

AGASSOUNON DJIKPO TCHIBOZO¹ Micheline, TOUKOUROU¹ Fatiou, de SOUZA² Comlan, DICKO³ Mamoudou H., TRAORE³ Alfred S., GBEASSOR² Messanvi

¹Laboratoire de Microbiologie et des Technologies Alimentaires (LAMITA), Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, 01BP4521 Cotonou 01 (Bénin)

²Centre de Recherche et de Formation sur les Plantes Médicinales (CERFOPLAM), Université de Lomé, BP1515, ESTBA (Togo).

³Centre de Recherche des Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN), UFR-SVT, Université de Ouagadougou (Burkina-Faso), 03BP 7021 Ouagadougou, 03, Burkina-Faso.

*Auteur pour toutes correspondances, BP1515 Lomé, ESTBA (Togo), tél : (228) 221 39 60,

Fax : (228) 221 85 95, Email : csouza@tg.refer.org ou csouzaari@hotmail.com

RESUME

Les études phytochimiques réalisées sur les feuilles de *Rytigynia canthioides* (Benth.) Robyns par rapport aux teneurs en substances organiques et minérales et à la présence des principes actifs ont donné des résultats satisfaisants. Nos résultats ont révélé que *Rytigynia canthioides* contient des protéines, des lipides, des sucres et des polyphénols avec des teneurs qui varient de 0,09% à 20,75 %. Les teneurs en calcium, en magnésium, en phosphore et en sodium sont respectivement égales à 4,08 % ; 6,57 % ; 3,88 % ; 0,6 %. Le fer et le zinc se trouvent pratiquement sous la forme de traces. Le screening des principes actifs a révélé la présence des alcaloïdes, des anthocyanes, des flavonoïdes, des traces de saponosides, des tannins et polyphénols, des triterpènes et stéroïdes. Les anthraquinones et les coumarines sont absents de la plante.

Les résultats de cette étude phytochimique a permis de noter que les feuilles de *Rytigynia canthioides* sont riches en protéines, en magnésium et en phosphore et contiennent des molécules biologiques. Ces observations justifient en partie l'utilisation au Bénin des feuilles de *Rytigynia canthioides* en alimentaire et en médecine traditionnelle.

Mots Clés : *Rytigynia canthioides* (Benth.) Robyns – Etudes phytochimiques.

SUMMARY

Phytochemical studies carried out on the leaves of *Rytigynia canthioides* (Benth.) Robyns with regard to the content of organic and mineral substances and the presence of active principles have given satisfactory results. Our results revealed that *Rytigynia canthioides* contain proteins, lipids, sugar and polyphenols with the contents varying from 0.09 % to 20.75 %. The calcium, magnesium, phosphorus and sodium contents are respectively equal to 4.08 % ; 6.57 % ; 3.88 % ; 0.6%. Only traces of iron and zinc are identified. The active principles screening has shown the presence of alkaloids, anthocyanes, flavonoids, traces of saponosids, tannins and polyphenols, triterpenes and steroids. The anthraquinones and coumarines are absent from the plant.

The result of phytochemical study helped notice that the leaves of *Rytigynia canthioides* are very rich in proteins, calcium and phosphorus and contain biological molecules. These observations justify the use of the leaves of *Rytigynia canthioides* in dietary and in traditional medicine in Benin.

Keywords : *Rytigynia canthioides* (Benth.) Robyns – Phytochemical studies.

INTRODUCTION

Rytigynia canthioides (Benth.) Robyns est une plante dont les feuilles sont très utilisées au Bénin et dans la sous région dans le traitement traditionnel du paludisme, de diverses fièvres, de diabète, de la constipation, de l'insuffisances psychiques, contre les fatigues généralisées et le traitement des maladies obscures [1 ; 2 ; 3 ; 4]. Certains utilisent les décoctés des feuilles de la plante de même que les jeunes feuilles en sauce dans les cas

de déficits alimentaires [2]. Le présent travail étudie la composition biochimique et minérale et caractérise les principes actifs en vue de vérifier les propriétés alimentaires et pharmacologiques attribuées à la plante.

MATERIEL ET METHODES

Produits chimiques et réactifs

Le réactif Folin-ciocalteu est de Sigma chemical company ® et l'acide gallique (acide 3,4,5-

trihydroxybenzoïque) est de Aldrich®. Les autres produits sont de Merck®.

Matériel végétal

Les feuilles de *Rytigynia canthioides* ont été récoltées dans une zone endémique palustre au Bénin (Pahou/Ouidah) en mars 2002 avec prélèvement d'herbier pour l'identification et pour la conservation à l'herbarium. L'identification botanique a été effectuée au Département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey – Calavi (Bénin) et un échantillon a été déposé pour la conservation à l'herbarium au Laboratoire de Microbiologie et des Technologies Alimentaires (LAMITA) dudit Département.

Méthodes d'analyse

Traitement préliminaire

Le matériel végétal est transféré au laboratoire dans des sachets à usage unique adaptés aux collectes des plantes alimentaires et médicinales. Après triage, les feuilles ont été lavées à l'eau distillée stérile puis séchées sur du papier filtre au laboratoire à 26°C avant d'être réduites en poudre semi – fine et fine à l'aide d'un moulinex®. Les échantillons pulvérisés sont conservés dans des sachets pour être utilisés dans les différentes analyses.

Préparation des extraits alcooliques lyophilisés

150 g de poudre de *Rytigynia canthioides* ont été incubés avec 2 litres d'éthanol à 90° pendant 24 h. La suspension est agitée fréquemment avant d'être filtrée sur du papier filtre Whatman N°1, puis évaporée au rotavapor® à 60°C à une vitesse de 120 tours/min. Le concentré est congelé et lyophilisé.

Détermination des teneurs en protéines totales

Les protéines totales des feuilles pulvérisées ont été dosées par la méthode de KJELDALH Ba 4c-87 [5] et selon les techniques de la pharmacopée africaine [6]. Une minéralisation à chaud à 450°C pendant 5 h a été réalisée en présence d'acide sulfurique et d'un comprimé de catalyseur de digestion (Kjeltabs ck : 3,5 g de sulfates de potassium et 0,4 g de sulfates de cuivre CuSO₄, 5H₂O). Cette étape a été suivie d'un dosage acide – base de la solution de sulfate d'ammonium obtenue. Ensuite, après une distillation du mélange, un titrage avec une solution d'acide sulfurique a été effectué. Un témoin a été réalisé dans les mêmes conditions.

Les teneurs sont exprimées par la conversion de la teneur en azote total en teneurs de protéines totales par application du coefficient de conversion égale à 6,25.

Détermination des teneurs en matières grasses

Elle a été faite selon la méthode d'extraction par le SOXHLET Aa 4 – 38 [5] en utilisant l'éther de pétrole comme un solvant à reflux. L'analyse a porté sur 5 g de poudre végétale placée dans des cartouches de SOXHLET. Ensuite, le SOXHLET a été monté entre un ballon contenant 300 ml d'éther de pétrole et relié à un système de réfrigération. L'ensemble de ce système est connecté à un cryostat qui permet la condensation des vapeurs destinées à entraîner les lipides. Après 4 h d'extraction à 100°C, les matières grasses ont été obtenues par évaporation du solvant au rotavapor® dans les mêmes conditions que précédemment. Les teneurs en matières grasses sont exprimées en % g/g de matières sèches.

Détermination des teneurs en sucres totaux

L'étude a porté sur des décoctés et des extraits alcooliques. Ainsi, 5 g de poudre végétale ont été introduits dans 200 ml d'eau distillée, la suspension est maintenue à l'ébullition pendant 30 minutes. Après refroidissement, les décoctés ont été soumis à une centrifugation de 9000 tours/min à 4°C pendant 10 min. De même, 5 g de matériel végétal ont été incubés dans 200 ml d'éthanol à 90° pendant 18 h puis la suspension est centrifugée comme précédemment. Les sucres ont été dosés en appliquant les techniques de la méthode de dosage direct avec du phénol [7].

Ainsi, 1 ml de solution de phénol à 5 % a été ajouté à des concentrations croissantes de solution standard de glucose à 0,1 %. Ensuite, 2 ml d'acide sulfurique concentré ont été additionnés, puis les tubes ont été portés au bain – marie pendant 5 minutes avant d'être incubés 30 minutes à l'obscurité. Les mesures d'absorbance ont été effectuées à 492 nm. Les décoctés et les extraits alcooliques des feuilles de *Rytigynia canthioides* ont été soumis à l'analyse comme dans le cas de la réalisation de l'étalon.

L'expression des teneurs en sucres totaux est obtenue à partir de l'équivalence du standard par gramme de poudre végétale (g/g).

Détermination des teneurs en polyphénols

Les teneurs en phénols totaux des décoctés et des extraits alcooliques ont été déterminées en utilisant la méthode de FOLIN – CIOCALTEU [8] modifiée par DICKO et al.,

2002 [9]. Ainsi, 10 ou 25 µl de surnagent selon la nature des extraits (aqueux ou alcooliques) ont été dilués avec de l'eau distillée stérile et le volume est porté à 250 µl. Puis, à ce mélange a été ajouté 625 µl de réactif FOLIN – CIOCALTEU (50 %). Après 5 minutes d'incubation, 625 µl de carbonate de sodium à 20 % (p/v) ont été additionnés et le volume est porté à 5 ml. Un blanc a été préparé avec la poudre végétale en remplacement du réactif avec de l'eau. De même, un étalon a été réalisé avec des concentrations croissantes d'acide gallique à 0,1 mg/ml (standard). Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 760 nm contre le blanc. L'expression des résultats est obtenue à partir de l'équivalence du standard (acide gallique) par gramme de poudre (g/g).

Détermination de la composition minérale

La teneur en cendres a été déterminée par une procédure améliorée d'incinération au four à 450°C, 923, 03 AOAC [10]. Les techniques décrites par MULTON en 1991[11] et celles mentionnées dans la monographie de la pharmacopée africaine [6] ont servi de supports pour le dosage du calcium, du magnésium, du sodium, du phosphore, du fer et du zinc.

A l'exception du phosphore dont le dosage a été réalisé au spectrophotomètre à 882 nm (visible spectrophotometer M20), tous les cations majeurs et les métaux traces ont été dosés par spectrophotomètre de flamme (Atomic Absorption spectrometer, M201 PERKIN ELMER), après reprise de 0,5 g du résidu de calcination (105°C) par 5 ml du mélange de destruction composé de 65 % d'acide nitrique et d'acide sulfurique concentré. Un blanc a été réalisé dans chaque cas sans l'échantillon de *Rytigynia canthioides*. Les teneurs en cendres sont exprimées en g % ms. Celles des minéraux sont exprimées en mg/100 g ms.

Screening phytochimique

Cette partie a été réalisée en utilisant comme support les techniques rapportées par d'autres chercheurs [12 ; 13 ; 6]. Cette caractérisation est basée sur les propriétés qu'ont les composés organiques d'induire des changements visibles du milieu lorsqu'ils sont traités dans des conditions bien définies. Ainsi, à partir des extraits alcooliques (éthanol 90°) lyophilisés non hydrolysés et hydrolysés, nous avons effectué la caractérisation en utilisant des réactifs spécifiques.

Pour cette mise en évidence divers réactifs ont été préparés : pour les alcaloïdes (réactif de MAYER et de DRAGENDORFF), pour les anthraquinones ou anthracénosides (réactif de

BORNTRAGER), pour les anthocyanes (variation de pH), pour les flavonoïdes (réactif de SHIBATA), pour les saponosides (test de mousses), pour les tannins et polyphénols (test au FeCl₃ 1 %), pour les triterpènes et stéroïdes (réactif de LIEBERMANN-BURCHARD) et pour les coumarines (fluorescence à la lumière UV365).

Ce criblage chimique a été confirmé par chromatographie en couche mince sur gel de silice à partir des extraits lyophilisés en appliquant des conditions expérimentales par l'utilisation d'une phase stationnaire constituée d'une plaque silicagel, 20×20 cm/Polygram SILG) et d'une phase mobile composée de n-butanol/acétone/acide/acétique/eau (35 : 35 : 10 : 20) et des révélateurs : AlCl₃ 5 % et acide sulfurique/éthanol (80 : 20).

Ainsi, 10 µl des extraits dilués dans du méthanol-eau ont été déposés sur la plaque avec un microseringue. Les plaques sont examinées à la lumière ultraviolette à 254 et 365 nm après séchage à l'étuve à 100°.

Les R_f (rapports frontaux) sont déterminés à partir de l'expression du rapport de la distance parcourue par une molécule X sur l'adsorbant et celle parcourue par le front du solvant, toutes deux mesurées à partir du point de dépôt. Dans tous les cas les essais ont été répétés 3 fois.

RESULTATS ET DISCUSSION

Etude Biochimique

L'analyse des résultats du dosage biochimique des feuilles de *Rytigynia canthioides* (tableau I) a permis de noter que les teneurs en protéines totales représentent 17,92 % ; celles des lipides sont de 6,2 % ; les sucres totaux correspondent à 20,75 % et 12,26 % respectivement pour les extraits aqueux et alcooliques ; les phénols totaux sont dans les proportions de 0,2 % et 0,09 % dans les deux types d'extraits. La faible teneur des composés phénoliques de la plante dénote que leur influence sur la biodisponibilité des protéines sera moindre [14 ; 15]. Les valeurs des teneurs en protéines se rapprochent de celles obtenues par d'autres chercheurs sur des céréales [16 ; 17].

Sur le plan alimentaire les protéines constituent une source en azote et en acide aminé essentiel tel que : la lysine, la thréonine, la méthionine et la cystéine [13]. Par ailleurs, des études ont révélé les propriétés thérapeutiques antivirales des protéines issues de plantes médicinales [18].

Tableau I : Composition biochimique des feuilles de *Rytigynia canthioides* (Rubiaceae)

Nom scientifique	%	%	% Sucres	% Sucres	% Phénols	% Phénols
	Protéines	Lipides	(aqueux)	(éthanol)	(aqueux)	(éthanol)
<i>Rytigynia canthioides</i>	17,92± 0,91	6,2± 0,02	20,75±1,75	12,26±0,46	0,2±0,02	0,09±0,01

Tout ceci, nous amène à proposer qu'une étude plus approfondie des protéines contenues dans les feuilles de *Rytigynia canthioides* permettront de mieux se prononcer sur la nature de ces dernières. Cette étude qui renseigne sur la teneur en matières grasses des feuilles de *Rytigynia canthioides* donne une idée sur la durée de conservation des phyto-médicaments incluant la plante car certaines teneurs des matières grasses pourraient provoquer le rancissement. L'ensemble des résultats des dosages permet de déduire que les feuilles de *Rytigynia canthioides* peuvent servir de complément alimentaire. Cette étude de dosage biochimique sur la plante constitue la toute première.

Etude minérale

Le tableau II illustre les résultats de l'étude des teneurs en minéraux des feuilles de *Rytigynia canthioides*. Par rapport aux minéraux le taux de cendres totales est de 8,5 %. La teneur en calcium correspond à 4,08 % ; le magnésium représente 6,57 % ; la teneur en sodium est de 0,6 % ; le phosphore représente 3,88 %. Le fer et le zinc sont sous la forme de traces. Les teneurs des minéraux majeurs recherchés sont dans l'ensemble égales à 15,13 %. Cette teneur non négligeable en minéraux peut expliquer en grande partie l'engouement des phytothérapeutes béninois à utiliser les feuilles de *Rytigynia canthioides* dans les cas d'insuffisances psychiques [1].

Tableau II : Composition minérale des feuilles de *Rytigynia canthioides* (Rubiaceae)

Nom scientifique	%	%	%	%	%	%	%
	Cendres	Calcium	Magnésium	Sodium	Phosphore	Fer	Zinc
<i>Rytigynia canthioides</i>	8,5 ± 0,01	4,08 ± 0,04	6,57±0,07	0,6±0,02	3,88 ±0,09	≤0,2ppm	

Les groupes chimiques identifiés

Le tableau III regroupe les différents résultats de la caractérisation des feuilles de *Rytigynia canthioides*. L'analyse qualitative effectuée sur les feuilles de *Rytigynia canthioides* a montré la présence de divers composés. La plante contient des alcaloïdes, des anthocyanes, des flavonoïdes, des traces de saponosides, des tannins et polyphénols, des triterpènes et stéroïdes. Les anthracénosides (anthraquinones) et les coumarines sont absents. Nos observations corroborent ceux d'autres chercheurs [4] surtout en ce qui concerne la caractérisation des feuilles de *Rytigynia canthioides* par rapport aux alcaloïdes, aux anthraquinones et aux tannins. Mentionnons que ces auteurs [4] ont noté une absence des sa-

ponosides dans l'espèce nigériane contrairement à nos résultats. Les résultats du criblage phytochimique par la méthode de chromatographie sur gel de silice ont permis de noter 5 spots de différents Rf et couleurs.

Les résultats de cette étude chromatographique confirment l'existence de plusieurs composés chimiques précédemment mis en évidence lors des études de caractérisation chimique.

Les propriétés biologiques des principes actifs présents dans les feuilles de *Rytigynia canthioides* ont été rapportées par plusieurs auteurs [19 ; 20 ; 13 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24]. Tout ceci explique en partie l'utilisation des feuilles de *Rytigynia canthioides* à des fins thérapeutiques.

Tableau III : Screenig chimique des feuilles de *Rytigynia canthioides* (Rubiaceae)

Composés phytochimiques	Réactions mises en œuvre	Résultats	Remarques
Alcaloïdes	DRAGENDORFF	Précipité rouge	++
	MAYER	Précipité blanc crémeux	++
Anthocyanes	Variation de pH	Coloration légèrement jaune	+
Anthraquinones	BORINTRAGER	Pas de changement de couleur	-
Coumarine	Fluorescence à UV365	Pas de changement de couleur	-
Flavonoïdes	SHIBATA	Coloration légèrement orange	+
Saponosides	Test de mousse	Présence de mousse (~0,6 mm)	±
Tannins et polyphénols	Test au FeCl ₃ 1%	Coloration vert noirâtre	+
Triterpènes et stéroïdes	LIEBERMANN-BURCHARD	Apparition d'un anneau rouge brun	++

Notes : ++ = abondant ; + = faible quantité ; ± = traces ; - = absent.

CONCLUSION

Les résultats de nos études phytochimiques ont révélé que les feuilles de *Rytigynia canthioides* contiennent des protéines en fortes teneurs (17,92 %), des sucres (12,26% et 20,75 %) et une faible teneur en matières grasses (6,2 %) et des constituants de premières utilités tels que le calcium (4,08 %), le magnésium (6,57 %), le phosphore (3,88 %), le sodium (0,6 %) et des principes actifs dont les propriétés biologiques ont été prouvées par plusieurs auteurs. Tout ceci explique l'utilisation traditionnelle des feuilles de *Rytigynia canthioides* à des fins alimentaire et thérapeutique. Les teneurs en composés organiques et des minéraux retrouvés dans les feuilles de *Rytigynia canthioides* n'étant pas négligeables, elles peuvent contribuer à un apport en éléments nutritifs aussi bien chez les enfants que chez l'homme adulte, si ces derniers se trouvent à l'état libre.

REMERCIEMENTS

Nous remercions tous les professionnels de la médecine traditionnelle contactés, Monsieur Honoré KPAVODE, Chef du Département de la Biologie Végétale de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin) et ses collaborateurs pour l'identification de la plante et le Professeur Sita GUIINKO de l'Université de Ouagadougou et ses collaborateurs et le Dr Aly SAVADOGO du Centre de Recherche des Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN) de l'Université de Ouagadougou (Burkina-Faso) pour sa collaboration technique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] - AGASSOUNON DJIKPO TCHIBOZO M. Evaluation de la qualité hygiénique - Etudes phytochimique et pharmacologique de quelques plantes de la médecine traditionnelle béninoise. Thèse unique de l'Université de Lomé, Togo, N° 041ULR/DASS, (2004), 198 p.
- [2] - AGASSOUNON DJIKPO TCHIBOZO M. Evaluation de la qualité hygiénique et des activités cytotoxique, antivirale et antimicrobienne de six plantes médicinales. Mémoire de D.E.A., N° 115 UBR/DAAS, Université du Bénin, Lomé, (2000), 94 p.
- [3] - BRUNEL J.F., HIEKPO P., SCHOLZ H. Flore analytique du Togo. Phanérogames. GTZ. Ed. Eschborn, (1984), pp 243-431.
- [4] - ODEBIYI O.O., SOFOWORA E.A. Phytochemical screening of Nigerian medicinal plants II. Lloydia, (1978), 41 : 234-246.
- [5] - AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices, (1990), 4 th. Ed.
- [6] - PHARMACOPEE AFRICAINE. Méthodes générales d'analyses. Volumes 2, 1^{ère} édition, OUA/CSTR, Lagos, Nigeria, (1988), 264 p.
- [7] - DUBOIS M.M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., (1956), 28 : 350-356.
- [8] - SINGLETON V.L., ORTHOFER R., LAMUELA-RAVENTOS R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FOLIN - CIOCALTEU reagent. Methods Enzymol, (1999), 299 : 152-177.
- [9] - DICKO M.H., HILHORST R., GRUPPEN H., TRORE A.S., LAANE C., VAN BERKEL W.J.H., VORAGEN A.G.J. Comparison of content in phenolic compounds, polyphenol, oxidase and peroxidase in grains of fifty *Sorghum* varieties from Burkina Faso. Journal Agricultural Food Chemistry, (2002), 50 (13) : 3780-3788.

- [10] - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL Chemists, (AOAC). Officinal methods of analysis chemists, (1990), 15th, 2 AOAC Arlington, Virginia. USA.
- [11] - MULTON J.L. Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Analyse des constituants alimentaires. Volumes 4, 2^{ème} édition entièrement revue, Paris, Technique et documentation. Lavoisier, (1991), 450 p.
- [12] - PENGE ON'OKOKO J., MARINI D. Etude chimique, pharmacologique et toxicologique d'*Olax subscorpioidea oliver* (Olacaceae). Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines, (1996), 10 (1) : 25 –34.
- [13] - BRUNETON J. Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Ed. Et. Tech. Doc., 2^e éd., Paris, (1993), 915 p.
- [14] - MAKKAR H.P.S., SINGH B., DAWRA R.K. Tannin-nutrient interaction. A review. Int. J. Sci. Anim., (1987), 2 : 127-140.
- [15] - COUSSIN B.W., TANKSLEY T.D., KNABE D.A., ZEBROWSKA T. Nutrient digestibility and performance of pigs fed sorghums varying in tannin concentration. J. Anim. Sci., (1981), 53 : 1524-1527.
- [16] - ABDALLA A.A., EL TINAY A.H., MOHAMED B.E., ABDALLA A. H. Proxymate composition, starch, phytate and mineral contents of 10 pearl millet genotypes. Food Chemistry, (1998), 63 (3) : 243-246.
- [17] - SUBRAMANIAN V., JAMBUNATHAN R., RAMAIOH C.D. Physical and chemical characteristics of pearl millet grains and their relationship to roti quality. Journal of Food science, (1988), 51 (4) : 1005.
- [18] - ANDERSON L.A. , PHILLIPSON J.D. Mistletoe - The magic herb. Pharm. J., (1982), 229 : 437-439.
- [19] - BICKII J., NDJIFOTIE N. *In vitro* antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifolia* (Meliaceae). Journal of Ethnopharmacology, (2000), 69 : 27-33.
- [20] - ARVOUET– GRAND A., VENNAT B., POURRAT A., LEGRET P. Standardisation d'un extrait de *Propolis* et identification des principaux constituants. J. Pham. Belg, (1994), 49 (6) : 462-468.
- [21] – SCHÖPKE T., HILLER K. Triterpenoids saponins. IV. Pharmazie, (1990) 45 : 313-342.
- [22] - Barnabas C. G. G., Nagarajan S. Medicinal plants and traditional medicine in Africa. Fitoterapia, (1988), 59 : 508.
- [23] - BADER G., BINDER K., HILLER K., ZIEGLER-BOHME H. Medicinal plants and traditional medicine in Africa. Pharmazie, (1987), 42 : 140-141.
- [24] - UWAFO AO., OKORIE DA., BABABUMI EA. Mutagenicity of chamuvaritin : a benzylhydrochalcone isolated from a medicinal plant. Cancer letter, (1979), 8 (1) : 87-92.



**INHIBITION D'UNE BETA LACTAMASE A SPECTRE ELARGI EXTRAITE DE
ESCHERICHIA COLI PAR LES EXTRAITS TOTAUX D'ORGANES DE 15
ESPECES VEGETALES DE LA PHARMACOPEE AFRICAINE**

**ANAGO^a Eugénie, LOKO^a Frédéric, GBENOU^b Joachim, GBAGUIDI^c Achille,
KOUSSENOUDO Philomène^c, MOUDACHIROU^b Mansourou**

a = Laboratoire de Biochimie. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi(UAC). B.P. 2009 Cotonou, BENIN.

b= Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles. Faculté des Sciences et Techniques/Faculté des Sciences de la Santé. Université d'Abomey-Calavi(UAC). B.P. 2009 Cotonou, BENIN.

c = Centre d'Information et de Recherche en Santé de la Reproduction 03 BP 2343 Cotonou-Bénin.

* Correspondance: Professeur LOKO Frédéric. Laboratoire de Biochimie. Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi. Université d'Abomey-Calavi (UAC). B.P. 2009 Cotonou, BENIN.

E-mail : lokofrederic@hotmail.com

RESUME

La bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) a été extraite d'une souche de *Escherichia coli*. Son activité hydrolasique sur les β lactamines a été mise en évidence sur la benzylpénicilline par une méthode spectrophotométrique utilisant un indicateur de pH, le rouge de phénol (phénolsulfonephtaléine) dont le coefficient d'extinction molaire a été déterminé ($\epsilon_m = 5,88.10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

La moyenne des pourcentages d'inhibition de la BLSE par 11 extraits d'organes de 10 espèces végétales qui inhibent à 100% (groupe A) la croissance de la souche de *E. coli* productrice de BLSE est significativement plus élevée que la moyenne des pourcentages d'inhibition de la BLSE par 5 extraits d'organes végétaux n'ayant aucune action inhibitrice sur la croissance de la souche de *Escherichia coli* (groupe B) ; ($Z=4,05$; $p < 0,01$). Chez les espèces végétales du groupe A on pourrait évoquer la coexistence d'un antibiotique *stricto sensu* et d'un inhibiteur de la BLSE.

Mots clés : β lactamase à spectre élargi (BLSE), *Escherichia coli*, Antibiotique

ABSTRACT

Extended spectrum β -lactamase (ESBL) has been extracted from an isolate of *Escherichia coli*. A spectrophotometric method has been developed for the determination of ESBL activity on β -lactamins, based on the use of phenol red as pH indicator. The apparent molar absorptivity of the complex was $5,88.10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 578 nm.

11 extracts of 10 plants inhibiting the growth of ESBL *E. coli* (group A) and 5 extracts of plants without any effect on the growth of ESBL *E. coli* were identified. The average inhibition of ESBL by group A is significantly higher than the average inhibition by group B ($Z=4,05$; $p < 0,01$).

Group A plants seem to contain an antibiotic compound responsible for ESBL *E. coli* growth inhibition and another compound involved in ESBL inhibition.

Keywords: Extended spectrum β -lactamase (ESBL), β -lactamase inhibitors, *Escherichia coli*, Antibiotic.

INTRODUCTION

Escherichia coli (*E. coli*) est responsable de 60 à 80% des infections urinaires notamment des cystites, 20% des septicémies et 40% des méningites néonatales [1].

L'émergence de souches d'entérobactéries productrices de bêta lactamase à spectre élargi (BLSE) constitue un problème préoccupant. En effet, ces germes sont responsables d'infections nosocomiales assez fréquentes dans certains services hospitaliers [2,3,4,5]. Par ailleurs, elles sont isolées de plus en plus chez des patients en consultation externe [6,7]. Les échecs thérapeutiques dus à l'émergence des germes multirésistants imposent le recours à de nouvelles sources moins onéreuses

et plus accessibles à nos populations, pour le traitement des maladies infectieuses : les plantes utilisées en médecine traditionnelle pourraient répondre à ces exigences.

C'est dans cette optique que nous avons choisi 15 espèces végétales africaines à activité antimicrobienne identifiées antérieurement dans notre laboratoire pour la détermination de leur action inhibitrice sur la β -lactamase à spectre élargi de *Escherichia coli*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

La BLSE est extraite d'une souche de *Escherichia coli* productrice de BLSE. Au cours d'études antérieures dans notre laboratoire, 10

espèces végétales ont inhibé à 100 %, la croissance d'une souche de *Escherichia coli* productrice de BLSE (Tableau I). 5 autres es-

pèces végétales n'ont eu aucune action inhibitrice sur la croissance de cette souche de *Escherichia coli* (Tableau II).

Tableau I : 10 espèces végétales (groupe A) inhibant à 100% la croissance de la souche de *E. coli* productrice de BLSE

N°	Espèces végétales	Famille	Organe utilisé
1	<i>Baillonella toxisperma</i>	Sapotaceae	Ecorce
2	<i>Boswellia dalzielii</i>	Burceraceae	Ecorce
3	<i>Carapa procera</i>	Meliaceae	Fruit
4	<i>Ceiba pentadra</i>	Bombacaceae	Ecorce
5	<i>Enantia chloranta</i>	Annonaceae	Ecorce
6	<i>Ficus exasperata</i>	Moraceae	Feuille
7	<i>Flacourtia flavescens willd</i>	Flacourtiaceae	Feuille
8	<i>Piptadeniastrum africanum</i>	Mimosaceae	Ecorce
9	<i>Terminalia superba</i>	Combretaceae	Ecorce
10	<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Ecorce, graine

Tableau II : 5 espèces végétales (groupe B) qui n'inhibent pas la croissance de la souche de *E. coli*

N°	Espèces végétales	Famille	Organe utilisé
1	<i>Trema orientalis</i>	Ulmaceae	Feuille
2	<i>Aloe barteri</i>	Aloeaceae	Feuille
3	<i>Alstonia boonei</i>	Apocynaceae	Ecorce
4	<i>Caloncoba welwitschii</i>	Flacourtiaceae	Ecorce
5	<i>Annona senegalensis</i>	Annonaceae	Feuille

Les extraits totaux éthanoliques de ces 15 plantes de la pharmacopée africaine ont été testés sur la BLSE extraite de *Escherichia coli*. Ces espèces ont été identifiées et authentifiées par le Laboratoire d'Ecologie Appliquée de la Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin.

Méthodes

Extraction de la BLSE et action inhibitrice par les extraits végétaux

Des extraits totaux éthanoliques ont été préparés à partir d'organes séchés, réduits en poudre.

La souche de *Escherichia coli* a été lavée puis mise en suspension dans du tampon de lyse (Tampon phosphate 10 mmol/l EDTA 5 mmol/l Triton X 100 0,6% pH 8,0) et soumise à un traitement de lyse par un sonificateur. L'extrait brut obtenu est concentré sur cellule Amicon^R. Il servira pour la détermination de l'activité BLSE.

La détermination de l'Activité de BLSE a été faite en s'inspirant du test acidimétrique en tubes en milieu liquide de Syre [8] décrite par Courvallin[9]

Le substrat est la benzylpénicilline (1.000.000 U) dissoute dans une solution de rouge de phénol en tampon phosphate 10 mmol/l pH 7,0.

15 espèces végétales ont été étudiées : 10 espèces végétales (soient 11 extraits totaux) inhibent à 100 % la croissance d'une souche de *E. coli* productrice de BLSE. 5 espèces végétales (soient 5 extraits totaux) n'ont aucune action inhibitrice sur la souche de *E. coli* productrice de BLSE. Une solution aqueuse à 200 mg/mL de chaque extrait est préalable-

ment stérilisée par passage sur membrane de stérilisation (diamètre 0,2 µm).

La stérilité de l'extrait est confirmée par ensemencement et culture sur gélose trypticase soja et bouillon trypticase soja et coloration de Gram.

L'extrait brut de BLSE est incubé en présence de chaque solution aqueuse d'extrait végétal à une concentration de 6,15 mg/ml dans le milieu et le pourcentage d'inhibition de la BLSE par les extraits totaux d'organes est déterminé. La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée pour le contrôle de qualité.

Etudes statistiques

Les contrôles de qualité des méthodes sont effectués à l'aide du calcul de la moyenne, de l'écart-type et du coefficient de variation.

La variable centrée réduite "Z" mesure la signification de la différence entre les moyennes pour un paramètre évalué au sein de deux populations [10].

RÉSULTATS

Extraction de la BLSE de *E. coli*

Les contrôles de stérilité de l'extrait brut de BLSE avant et après concentration sur cellule Amicon® étaient satisfaisants. Par ailleurs, l'addition de l'azide de sodium pour la conservation de l'extrait n'a eu aucun effet inhibiteur ou activateur sur l'enzyme, de même que l'éthanol qui a servi de solvant pour le rouge de phénol.

Le passage sur cellule Amicon® a permis de concentrer 10 fois l'activité BLSE.

Détermination de l'activité enzymatique Détermination d'une valeur moyenne du coefficient d'extinction molaire (ϵ_m)

La droite d'étalonnage du substrat-réactif à 578 nm est obtenue avec des concentrations en rouge de phénol allant de 24,42 à 195,34 µmol/L.

Les pentes des droites d'étalonnage obtenues avec dix (10) séries successives conduisent à la détermination d'une valeur moyenne du coefficient d'extinction molaire (ϵ_m)

$$\epsilon_m = \frac{5,88}{5,88 \cdot 10^{-3}} \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1} = 5,88 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$$

L'écart type σ est égal à : $6,15 \cdot 10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Le coefficient de variation (CV) est égal à 10,46%.

Inhibition de la BLSE par 16 extraits d'organes de 15 espèces végétales de la pharmacopée africaine

Les résultats des tests d'inhibition de la BLSE par les 11 extraits d'organes de 10 plantes ayant inhibé à 100 % la croissance d'une souche de *E. coli* productrice de BLSE et les 5 extraits d'organes de plantes n'ayant aucune action inhibitrice sur cette souche sont indiqués dans le Tableau III et le Tableau IV respectivement.

Tableau III : Inhibition de la BLSE par 11 extraits d'organes de 10 plantes (groupe A) inhibant à 100% la croissance d'une souche de *E. coli* productrice de BLSE

N°	Espèces végétales	Famille	Organe utilisé	Pourcentage d'inhibition (%)
1	<i>Baillonella toxisperma</i>	Sapotaceae	Ecorce	85
2	<i>Boswellia dalzielii</i>	Burseraceae	Ecorce	78
3	<i>Carapa procera</i>	Meliaceae	Fruit	62
4	<i>Ceiba pentadra</i>	Bombacaceae	Ecorce	70
5	<i>Enantia chloranta</i>	Annonaceae	Ecorce	75
6	<i>Ficus exasperata</i>	Moraceae	Feuille	91
7	<i>Flacourtia flavescens willd</i>	Flacourtiaceae	Feuille	82
8	<i>Piptadeniastrum africanum</i>	Mimosaceae	Ecorce	67
9	<i>Terminalia superba</i>	Combretaceae	Ecorce	90
10	<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Ecorce	74
11	<i>Voacanga africana</i>	Apocynaceae	Graine	82

Tableau IV : Inhibition de la BLSE par 5 espèces végétales (groupe B) qui n'inhibent pas la croissance de la souche de *E. coli*

N°	Espèces végétales	Famille	Organe utilisé	Pourcentage d'inhibition (%)
1	<i>Trema orientalis</i>	Ulmaceae	Feuille	64
2	<i>Aloe barteri</i>	Aloeaceae	Feuille	66
3	<i>Alstonia boonei</i>	Apocynaceae	Ecorce	73
4	<i>Caloncoba welwitschii</i>	Flacourtiaceae	Ecorce	67
5	<i>Annona senegalensis</i>	Annonaceae	Feuille	61

DISCUSSION

Le coefficient d'extinction molaire obtenu au cours des différentes séries de déterminations présente un CV de 10,46 % qui traduit une dispersion relativement acceptable puisqu'elle est proche de 10 % [11]. Néanmoins dans un souci d'exactitude, nous nous sommes imposés de réaliser une droite d'étalonnage pour chaque série de dosages.

A la concentration de 6,15 mg/mL, les 11 extraits totaux d'organes de 10 espèces végétales qui inhibent à 100 % la croissance de la souche de *E. coli* productrice de BLSE exercent également une action inhibitrice importante sur la BLSE extraite de *E. coli*. Cette action correspond à des pourcentages d'inhibition allant de 62 % à 91 % (Tableau III). 5 espèces végétales sans action inhibitrice sur la croissance de la souche de *E. coli* exercent néanmoins une action inhibitrice non négligeable sur la BLSE extraite de *E. coli*. Cette action correspond à des pourcentages d'inhibition allant de 61 % à 73 % (Tableau IV). La moyenne du pourcentage d'inhibition exercée par les espèces végétales du groupe A est significativement plus élevée que la moyenne du pourcentage d'inhibition exercée par les espèces végétales du groupe B ($Z = 4,05$; $p < 0,01$).

Les 10 espèces végétales dont les extraits totaux inhibent à 100 % la croissance de la souche de *E. coli* productrice de BLSE semblent receler d'une part un principe actif qui inhibe un processus métabolique impliqué dans la croissance de la bactérie et d'autre part un principe actif inhibiteur de la BLSE secrétée par *E. coli*.

A la différence, les 5 espèces végétales dont les extraits totaux n'ont aucune action sur la croissance de la souche de *E. coli* n'expriment qu'une activité inhibitrice de la BLSE plus atténuée.

Chez les espèces végétales du groupe A, on pourrait évoquer la coexistence synergique d'un antibiotique *stricto sensu* et d'un inhibiteur, avec une potentialisation réciproque des effets de ces deux principes actifs. Ce type de synergie est retrouvé dans quelques associations médicamenteuses (Amoxicilline + acide clavulanique et Pipéracilline + tazobactam etc.) utilisées avec succès dans le traitement des infections à germes multirésistants aux antibiotiques [12]. Cette potentialisation des effets pourrait expliquer cette action inhibitrice sur la BLSE significativement plus élevée dans le groupe A que dans le groupe B ($Z = 4,05$ $p < 0,01$).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] BERCHE P., GAILLARD J. L., SIMMONET M. Bactéries des infections humaines. Edition Flammarion Médecine-Sciences ; Paris ; (1989)
- [2] MOITTIE D. Les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi ; détection, distribution, épidémiologie et attitudes thérapeutiques. Edition Option Bio; Paris ; (1988) ;12-18
- [3] HYLE E.P., LIPWORTH A. D., ZAOUTIS T.E., MACHAMKIN I., FISHMAN N.O., BILKER WB., MAO X., LAUTENBACH E. Risk factors for increasing multidrug resistance among extended-spectrum betalactamase. *Clin infect. Dis.* (2005) may 1, 40 (9):1317-24.
- [4] BRADFORD P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21ST-Century: Characterization epidemiology and detection of the important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*; (2001); 14; 933-951
- [5] PITOUT J.D.D., GREGSON D. B., CHURCH D. L., ELSAYED S., LAUPLAND K.B. Community-Wide Outbreaks of Clonally Related CTX-M-14 β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains in the Calgary Health Region . *J Clin Microbiol.* 2005 June; 43(6): 2844–2849.

- [6] **DAZA R., GUTIERREZ J., PIEDROLA J.** Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections. *Int. J; Antimicrob. Agents* (2001) 18: 211 – 215
- [7] **GOLDSTEIN F. W., and the Multicenter Study Group.** Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (2000) 19 :112-117.
- [8] **SYRE R. B.** Methods for detecting β -lactamases. Edition *D.S. REEVES* ; Linvingstone ; (1981) : 64-89
- [9] **COURVALLIN P., GOLDJSEIN F., PHILIPPON A., SIROT J.** L'antibiogramme. Edition *MPC-VIDEON* ; Paris ; (1985)
- [10] **MURRAY R.** Théorie et application de la statistique. Edition *MC. Gray-Hill-Inc* ; NewYork ; (1972)
- [11] **BERNARD S.** Biochimie clinique. Edition *Maloine* ; Paris ; (1985)
- [12] **CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G., VARGUES R.** Bactériologie Médicale ; techniques usuelles. Edition *SIMEP* ; Paris ; (1987).