



Le Journal de la **SOCIETE
DE BIOLOGIE
CLINIQUE-BENIN**

Organe Officiel d'Information de la Société de Biologie Clinique du Bénin - N° 014 – Année 2010

- ACTIVITE DES TRANSAMINASES : VALEURS DE REFERENCE CHEZ LES DONNEURS DE SANG SAINS A LOME (TOGO).**
- EFFET DE L'HYDROCHLOROTHIAZIDE SUR L'INDUCTION DE L'APOPTOSE ET LA NEPHROTOXICITE PAR LA GENTAMICINE DANS LE CORTEX RENAL DE RATS**
- PROFIL CLINIQUE ET BIOLOGIQUE DES NOUVEAUX CAS DE TUBERCULOSE PULMONAIRE BACILLIFERE AU CENTRE NATIONAL HOSPITALIER DE PNEUMOPHTISIOLOGIE DE COTONOU.**
- LES CELLULES RONDES DU SPERME ET INFERTILITE MASCULINE AU CHU TOKOIN DE LOME TOGO.**
- ASPECTS MORPHOLOGIQUES DES RESULTATS DE LA CYTOLOGIE URINAIRE CHEZ DES SUJETS D'ORIGINE AFRICAINE VIVANT EN FRANCE**



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 Réalisation de Matériels de Communication
Champ de Foire 01 BP 188 Cotonou
Tél : 229/21301236
E-mail : crmc.fss@gmail.com



SOMMAIRE

ACTIVITE DES TRANSAMINASES : VALEURS DE REFERENCE CHEZ LES DONNEURS DE SANG SAINS A LOME (TOGO). FETEKE L.¹, VOVOR A.², FOLLIGAN K.², KUEVIAKOE IM³, BALAKY H³, SEGBENA AY^{1,3}.
p 5-13

ANALYSE D'IMAGES DE MACROPHAGES ALVEOLAIRES (PAM) PAR CYTOMETRIE CHEZ DES PATIENTS SOUFFRANT DE PATHOLOGIES PULMONAIRES INTERSTITIELLES. MOUMOUNI H^{1§}, MONNIAUX D.², MAIZOUMBOU DA¹, LEMARIE E.⁴, ANTHONIOZ Ph³, DARBOUX R.⁵.
p 14-24

LEUCOSPERMIE ET INFERTILITE MASCULINE AU CHU TOKOIN DE LOME TOGO. FOLLIGAN K. (1), ANOUKOUM T. (2), ABOUBAKARI S. (3), FETEKE L (4), ADAMA-HONDEGLA A. B. (5), DAGNRA A. (6), BOUKARI B.S. (1)
p 25-29

EFFET DE L'HYDROCHLOROTHIAZIDE SUR L'INDUCTION DE L'APOPTOSE ET LA NEPHROTOXICITE PAR LA GENTAMICINE DANS LE CORTEX RENAL DE RATS. ALLABI Aurel Constant¹, LALEYE Anatole², VAN BAMBECKE Françoise³, MINGEOT-LECLERCQ Marie-Paule³, TULKENS Paul³
p-30-42

PROFIL CLINIQUE ET BIOLOGIQUE DES NOUVEAUX CAS DE TUBERCULOSE PULMONAIRE BACILLIFERE AU CENTRE NATIONAL HOSPITALIER DE PNEUMO-PHTISIOLOGIE DE COTONOU. AGODOKPESSI G*, ADE G*, ADE S*, ADJOBIMEY M*, AWANOU B*, AKPONA R*, GUENDEHOU B*, KASSA F*, AFFOLABI D*, ANAGONOU S*, GNINAFON M*
p-43-46

LES CELLULES RONDES DU SPERME ET INFERTILITE MASCULINE AU CHU TOKOIN DE LOME TOGO. FOLLIGAN K. (1), ANOUKOUM T. (2), ABOUBAKARI S. (3), FETEKE L (4), ADAMA-HONDEGLA A. B. (5), DAGNRA A. (6), BOUKARI B.S. (1)
p 47-50

ACCIDENTS D'EXPOSITION AU SANG (AES) EN MATERNITE AU SUD DU BENIN. FREQUENCE, PREVENTION ET CONNAISSANCES PRATIQUES. ADISSO S.*, HOUEDJISSIN S.*, HOUNDEFFO T.*, GNANSOUNOU F.*, ADISSO E. L.***, PERRIN R-X.***, ALIHONOU E.*
p- 51-56

ASPECTS MORPHOLOGIQUES DES RESULTATS DE LA CYTOLOGIE URINAIRE CHEZ DES SUJETS D'ORIGINE AFRICAINE VIVANT EN France Silou¹ J.F., Mpio² I., Boisson¹ R.C.
p-57-59

EDITORIAL



Les publications du N° 14 sont toujours aussi variées. Nous félicitons les uns et les autres pour le travail abattu et les collaborations scientifiques entre départements et universités. Bientôt votre journal aura une **version en ligne** qui progressivement prendra le pas sur cette version.

Bonne lecture

Le numéro 15 pour l'année 2011 est en cours et attend vos publications.

Dr S.A. AKPONA
Président de la 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.

**ACTIVITE DES TRANSAMINASES : VALEURS DE REFERENCE CHEZ LES
DONNEURS DE SANG SAINS A LOME (TOGO)**



FETEKE L.¹, VOVOR A², FOLLIGAN K.², KUEVIAKOE IM³, BALAKY H³,
SEGBENA AY^{1,3}.

1 : Centre National de Transfusion Sanguine de Lomé, Togo, 02 BP 20707 Lomé

2 : Laboratoires du Centre Hospitalier Universitaire Tokoin de Lomé, Togo, BP 57 Lomé

3 : Laboratoires du Centre Hospitalier Universitaire Campus de Lomé, Togo, BP 30824 Lomé

Adresse de correspondance : M. FETEKE Lochina, Assistant chef de clinique en Biochimie à la FMMP Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) 02 B.P. 20707 Lomé, TOGO.
Tel : (228) 916 29 99. (228) 221 64 30. E-mail : feteke@yahoo.fr, fetekeloch@hotmail.com

RESUME

OBJECTIFS :

- mesurer l'activité ALAT et ASAT selon L'âge, le sexe, le poids, la taille et l'IMC ;
- établir les valeurs de référence de l'activité des transaminases chez les donneurs de sang à Lomé ;
- comparer l'activité des ALAT et ASAT obtenue à celle établie par d'autres auteurs.

MATERIEL ET METHODES : Nous avons effectué notre étude sur 230 sujets « sains » à Lomé, sélectionnés parmi les donneurs qualifiés pour le don de sang après examens médicaux et biologiques. Les facteurs de variation physiologiques (âge, sexe, tailles, poids et Indice de Masse Corporel) ont fait l'objet de critères de partition. Les sujets en « état de référence » ont servi à l'établissement des valeurs de référence proprement dites. Nous avons mesuré l'activité ALAT et ASAT selon la méthode FICC à 37°C sur automate de biochimie Lisa 500 plus® des laboratoires Hycel Diagnostics. Les données obtenues sont analysées suivant une méthode statistique non paramétrique basée sur le calcul des percentiles.

RESULTATS : Les variations physiologiques de l'activité ALAT sont liées aux facteurs poids, âge, sexe et à l'IMC ; celles d'ASAT à l'âge et le sexe. Les valeurs de référence établies sur la base des percentiles [2.5% ... 97.5%] varient pour l'activité ALAT, entre 14,0 et 47,0 UI/ l chez les hommes contre 13,0 et 45,0 UI/l chez les femmes ; pour l'activité ASAT, entre 12,0 et 51,0 UI / l chez les hommes contre 12,0 et 39,0 UI / l chez les femmes.

CONCLUSION : Les valeurs de référence de l'activité des ALAT et ASAT obtenues chez les donneurs de sang de Lomé sont différentes de celles utilisées jusqu'alors par transposition dans nos centres de santé en absence de valeurs propres.

Mots clés : valeurs de référence, transaminase, donneurs de sang Lomé

SUMMARY

OBJECTIVES:

- to measure the ALAT and ASAT activity according to age, sex, weight, size and BMI;
- to establish the reference values of the activity of aminotransferases among the blood donors in Lome;
- to compare the activity of ALAT and ASAT to the one established by other authors.

MATERIAL AND METHODS: We did our survey on 230 "healthy" subjects in Lome, selected among the donors qualified for the blood donation after medical and biologic exams. The physiological factors of variation (age, sex, size, weight and Body Mass Indice) were the criterias for partition. The subjects in " state of reference" served to the establishment of the actual reference values. We measured the ALAT and ASAT activity according to the IFCC method at 37°C on biochemistry automate Lisa 500 plus® of the laboratories Hycel Diagnostics. The data obtained are analyzed according to a non parametric statistical method based on the calculation of the percentiles.

RESULTS: The physiological variations of the ALAT activity are bound to weight, age, sex and to the BMI; those of ASAT to age and the sex. The reference values established on the basis of the percentiles [2.5%... 97.5%] varied for the ALAT activity, between 14,0 and 47,0 IU/l in men against 13,0 and 45,0 IU/l in women; for the ASAT activity, between 12,0 and 51,0 UI/l in men against 12,0 and 39,0 UI/l in women.

CONCLUSION: The reference values of the activity of ALAT and ASAT obtained among the blood donors in Lome are different from those used by transposition for biological analysis interpretation in our hospitals in absence of our own reference values.

Key words: reference values, aminotransferases, blood donors, Lome

INTRODUCTION

Les mesures de l'activité de l'aspartate-aminotransférase (ASAT) et de l'alanine-aminotransférase (ALAT) sont deux examens de laboratoire habituellement demandés pour le diagnostic et la surveillance des affections hépatiques et cardiaques [1].

L'évolution de la médecine, du diagnostic à la protection de la santé demande que l'on puisse définir des informations biologiques qui soient représentatives : de l'état de santé, de la maladie, mais aussi de toute déviation même légère de l'équilibre de l'organisme [2]. Ainsi l'interprétation des résultats d'analyses de biologie médicale nécessite des valeurs de référence fiables, obtenues sur des individus sélectionnés à ce but. Lors de l'interprétation des résultats, de nombreux cliniciens ignorent que les valeurs de référence utilisées doivent provenir de la même population que celle dont sont issus leurs patients. Or, les valeurs des constituants biologiques sont souvent influencées par des facteurs entre autres environnementaux et nutritionnels [3]. Si on y ajoute la notion de variations biologiques intra et interindividuelles, on comprend alors que l'on ne peut pas transposer indifféremment les valeurs de référence d'un pays à un autre. Ceci se vérifie dans la littérature où la variabilité des intervalles de référence suscite une attention particulière [4 ; 5 ; 6 ; 7].

VINCENT-VIRY M. et al, lors d'une étude coopérative internationale en 1987 avaient conclu à la nécessité d'établir des limites de référence adaptées selon l'origine géographique et en prenant en compte le facteur ethnique en Afrique [8]. SIEST G. et al, en 1982 proposaient pour l'avenir, la création des valeurs de référence de l'individu, obtenues à une époque de bonne santé [9].

Nous conviendrons par conséquent que les valeurs de référence de l'activité des transaminases au Togo ne sont pas nécessairement similaires à celles des Européens qui servent cependant de repère à nos cliniciens. Les variations peuvent provenir de différences génétiques, environnementales entre les différentes populations mais également des variations d'ordre matériel et technique entre les méthodes de mesure.

Ainsi notre étude chez les donneurs de sang a pour objectif principal de contribuer à l'amélioration de l'interprétation des résultats d'examens de biologie médicale au Togo. Les objectifs spécifiques sont de :

- mesurer l'activité de l'ALAT et de l'ASAT selon l'âge, le sexe, le poids, la taille et l'indice de masse corporelle ;

- établir les valeurs de référence de l'activité des transaminases dans la population des donneurs de sang de Lomé ;
- comparer l'activité de l'ALAT et de l'ASAT obtenues aux activités établies par d'autres auteurs.

MATERIEL ET METHODES

• Cadre d'étude

Le Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) et le service des laboratoires du Centre Hospitalier Universitaire Campus (CHU Campus) de Lomé ont servi de cadres à cette étude, le premier pour la collecte et la qualification sérologique des échantillons et le second (unité de biochimie) pour les mesures de l'activité des transaminases (ALAT et ASAT).

• Matériel d'étude

Population cible, échantillon et période d'étude

L'étude a porté sur la population des donneurs de sang bénévoles du Centre National de Transfusion Sanguine de Lomé au cours de la période allant de Septembre à Décembre 2005. Notre échantillon était constitué de 230 (deux cent trente) donneurs de sang.

Critères d'inclusion

- être présent aux jours et heures de nos prélèvements : 7 heures à 10 heures les lundi, mercredi et vendredi ;
- être déclaré apte au don de sang après entretien médical et examen clinique ;
- être à jeun depuis au moins 10 heures ;
- être exempt de consommation d'alcool, de tabac, de médicament et ne pas avoir eu d'activités physiques intenses dans les 3 jours précédant le prélèvement ;
- avoir un profil sérologique négatif aux marqueurs viraux d'hépatites transfusionnelles (hépatites B et C) et au virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Critères de partition

Nous avons réparti notre population d'étude en sous échantillons suivant des facteurs de variation physiologiques et sociodémographiques susceptibles d'influencer l'activité des transaminases tels que l'âge, le sexe, la taille, le poids et l'indice de masse corporelle (IMC).

Prélèvement, conservation et méthode de dosage

Sur chaque donneur a été prélevé à la suite de la poche de sang, un échantillon de 5 ml de sang sur tube sec. Les sérums hémolysés après centrifugation sont exclus de l'étude. Les sérums sont transportés en conteneur isotherme à +4°C vers le laboratoire de biochimie du CHU Campus à 3 km et le dosage des transaminases est effectué à l'aide de la méthode recommandée par la FICC en présence

du phosphate de pyridoxal à 37°C sur automate Lisa 500 plus® des laboratoires Hycel diagnostics. Les échantillons sont conservés à 4°C chaque fois que les mesures étaient différées. Tous les échantillons sont analysés dans un délai de 48 heures.

Recueil des données

L'étude a rassemblé des données sociodémographiques et biologiques qui sont présentées sous forme de dossiers individuels. Un entretien préalable visant à expliquer l'objet de

l'étude, les résultats escomptés et leurs utilités éventuelle a été réalisé afin d'obtenir un consentement éclairé de chaque sujet.

Analyse des données

Nous avons calculé pour chaque constituant la médiane et les percentiles 2,5% et 97,5 % représentant les valeurs de référence. Le coefficient de corrélation non paramétrique de Spearman a permis d'évaluer le sens de variation des constituants biologiques couplés aux facteurs de variation retenus.

RESULTATS

Données démographiques.

Age et sexe

L'échantillon retenu était constitué de 230 sujets apparemment sains dont l'âge variait entre 18 et 60 ans avec un âge médian de 25 ans. Le tableau I présente leur répartition selon les tranches d'âge et le sexe. On observe une prédominance des donneurs du sexe masculin avec un sexe ratio (hommes / femmes) de 3,14.

Tableau I : Répartition des donneurs retenus selon les tranches d'âges et le sexe

Tranches d'âge (ans)	Hommes		femmes	
	N	%	N	%
18 – 20	09	3,91	04	1,74
20 – 30	126	54,78	40	17,39
30 et plus	40	17,39	11	4,78
Total	175	76,09	55	23,91

Poids

Le poids des donneurs variait entre 50 et 115 kg avec un poids médian de 64 kg. Le tableau II montre sa répartition en fonction du sexe.

Tableau II : Répartition des donneurs suivant le poids et le sexe

Tranches d'âge (ans)	Hommes		femmes	
	N	%	N	%
18 – 25	90	39,13	29	12,61
26 – 35	68	29,57	22	9,57
36 – 45	12	5,22	4	1,74
46 et plus	5	2,17	0	0,00
Total	175	76,09	55	23,91

Taille

La taille a varié entre 149 – 192 cm avec une taille médiane de 170 cm. Le tableau III présente la répartition des donneurs en fonction de la taille et du sexe.

Tableau III : Répartition des donneurs suivant la taille et le sexe.

Taille (cm)	Hommes		femmes	
	N	%	N	%
Moins de 159	01	0,43	13	5,65
160 – 169	47	20,43	37	16,09
170 – 179	94	40,87	5	2,17
180 et plus	33	14,35	0	0,0
Total	175	76,09	55	23,91

Indice de Masse Corporelle (IMC)

La grande majorité des donneurs (73,5% tous sexes confondus) sont normaux par rapport à l'IMC. Sont en surpoids 16,1% d'entre eux. Le tableau IV montre la répartition des donneurs en fonction de l'IMC.

Tableau IV. Répartition des donneurs suivant l'indice de masse corporelle (IMC)

IMC (Kg/m ²)	Hommes		femmes	
	N	%	N	%
Moins de 18,5	20	8,70	04	1,74
18,5 – 25	141	61,30	28	12,17
Plus de 25	14	6,09	23	10,0
Total	175	76,09	55	23,91

Fiabilité des méthodes d'analyse utilisées

Les méthodes utilisées (méthodes recommandées par FICC à 37°C) ont été évaluées dans les conditions de travail de notre laboratoire par l'utilisation d'un sérum de contrôle de valeurs connues. Nous avons effectué 10 dosages de ce sérum et toutes les valeurs se situent dans l'intervalle de confiance fixé par le fabricant. Par ailleurs, les transaminases chez les donneurs de sang ont été dosées dans 10 séries d'examen dans lesquelles le sérum de contrôle est inséré à chaque fois. La méthode s'est révélée aussi bien précise qu'exacte. Les résultats de ce contrôle figurent dans le tableau V.

Tableau V. Evaluation de la fiabilité des méthodes utilisées (méthodes recommandées par FICC à 37°C) à travers les résultats de dosage du sérum de contrôle.

Constituant analysé	Valeurs du fabricant en UI/L (cible, intervalle de confiance)	Exactitude (résultats du laboratoire)		Précision (résultats du laboratoire)	
		Valeur moyenne	t calculé	CV intrasériel (%)	CV intersériel (%)
ALAT	45 (37 – 53)	45,90	1,87	2,70	3,39
ASAT	38 (32 – 44)	37,30	-1,36	2,92	4,38

t critique = t (0,05 ; 9) = 2,262 ;

|t calculé| = 1,87 pour ALAT

|t calculé| = 1,36 pour ASAT

|t calculé| < t critique, la méthode est donc exacte.

Variations biologiques de l'activité des transaminases

Les facteurs de variation : âge, sexe, poids, taille, indice de masse corporelle ont été pris en compte.

Variations de l'activité des transaminases suivant l'âge et le sexe

ALAT et ASAT augmentent avec l'âge dans les deux sexes. Tableaux VIa et VIb

Tableau VIa – Activité ALAT (UI/L) suivant les tranches d'âges et le sexe

Age (ans)	Hommes		Femmes	
	N	M* (Percentiles [2,5-97,5])	N	M* (Percentiles [2,5-97,5])
18 – 25	90	24 (13 – 62)	29	17 (13 – 52)
26 – 35	68	27 (15 – 64)	22	20 (13 – 45)
36 – 45	12	29 (19 – 64)	4	21 (18 – 60)
≥ 46	05	28 (15 – 65)	0	NA**

* médiane

** non applicable

Corrélation ALAT – âge : r = + 0,125. (r : coefficient de corrélation de Spearman).

L'activité ALAT augmente avec l'âge dans les deux sexes.

Tableau VIb - Activité ASAT (UI/ l) suivant les tranches d'âges et le sexe

Age (ans)	Hommes		Femmes	
	N	M* (Percentiles [2,5-97,5])	N	M* (Percentiles [2,5-97,5])
18 – 25	90	26 (13 - 50)	29	24 (8 - 49)
26 – 35	68	27 (13 - 51)	22	26 (12 - 41)
36 – 45	12	30 (20 - 59)	4	29 (17 - 53)
≥ 46	05	30 (23 - 40)	0	NA**

* médiane

** non applicable

Corrélation ASAT –âge = $r = + 0,103$.

L'activité ASAT augmente avec l'âge dans les deux sexes.

Variations de l'activité des transaminases suivant le poids et le sexe

ALAT augmente avec le poids dans les deux sexes. Tableau VIIa

ASAT (UI/ l) indépendante du poids. Tableau VIIf.

Tableau VII a – Activité ALAT (UI/l) suivant le poids et le sexe.

Poids (kg)	Hommes	Femmes
	M* (Percentiles [2,5-97,5])	M* (Percentiles [2,5-97,5])
50 – 59	23 (13 - 55)	16 (13 - 39)
60 – 69	25 (15 - 64)	17 (13 - 45)
70 – 79	27 (15 - 64)	19 (14 - 41)
≥ 80	35 (19 - 71)	22 (18 - 60)

* médiane

$r = +0,138$ chez les hommes et $r = + 0,113$ chez les femmes.

L'activité ALAT augmente avec le poids dans les deux sexes.

Tableau VII b – Activité ASAT (UI/ l) suivant le poids et le sexe.

Poids (kg)	Hommes	Femmes
	M* (Percentiles [2,5-97,5])	M* (Percentiles [2,5-97,5])
50 – 59	25 (18 - 49)	29 (16 - 53)
60 – 69	27 (13 - 56)	23 (8 - 41)
70 – 79	27 (12 - 59)	22 (12 - 60)
≥ 80	35 (23 - 45)	28 (24 - 47)

* médiane

$r = + 0,037$ chez les hommes et $r = - 0,100$ chez les femmes.

→ L'activité ASAT (UI/ l) indépendante du poids.

Variations de l'activité des transaminases suivant la taille et le sexe

ALAT augmente avec la taille dans le sexe féminin et diminue avec la taille dans le sexe masculin (Tableau VIIIa et VIIf)

Tableau VIIIa – Activité ALAT (UI/ l) suivant la taille et le sexe

Taille (cm)	Hommes	Femmes
	M* (Percentiles [2,5-97,5])	M* (Percentiles [2,5-97,5])
≤159	18,0 (-)**	19,0 (13,0 - 43,0)
160 – 169	25,0 (16,0 - 65,0)	18,0 (13,0 - 45,0)
170 – 179	24,0 (13,0 - 62,0)	26,0 (19,0 - 52,0)
≥ 180	26,0 (16,0 - 47,0)	NA***

* médiane

** non calculable car N = 1

*** non applicable car N = 0

$r = - 0,116$ pour les hommes et $r = + 0,194$ pour les femmes.

L'activité ALAT diminue avec la taille dans le sexe masculin.

L'activité ALAT augmente avec la taille dans le sexe féminin et diminue avec la taille dans le sexe masculin.

Tableau VIIIb : Activité ASAT (UI / l) suivant la taille et le sexe

Taille (cm)	Hommes	Femmes
	M* (Percentiles [2,5-97,5])	M* (Percentiles [2,5-97,5])
≤159	15,0 (-)**	28,0 (16,0 - 41,0)
160 – 169	27,0 (16,0 - 69,0)	26,0 (8,0 - 60, 0)
170 – 179	26,0 (12,0 - 57,0)	24 ,0 (12,0 -58,0)
≥ 180	25,0 (13,0 - 50,0)	NA***

* médiane

** non calculable car N = 1

*** non applicable car N = 0

r = - 0,101 pour les hommes et r = - 0,115 pour les femmes.
L'activité ASAT diminue avec la taille dans les deux sexes.

Variations de l'activité des transaminases suivant l'Indice de Masse Corporelle et le sexe

L'activité ALAT augmente avec l'Indice de Masse Corporelle dans les deux sexes (Tableaux Ixa et IXb)

Tableau IXa : Activité ALAT (UI/l) suivant l' l'Indice de Masse Corporelle (IMC) et le sexe

IMC (kg/m2)	Hommes	Femmes
	M* (Percentiles [2,5-97,5])	M* (Percentiles [2,5-97,5])
< 18,5	20 (13 – 62)	17 (12 – 44)
18,5 – 25	24 (14 – 57)	20 (16 – 41)
> 25,0	29 (21 – 65)	23 (17 – 53)

* médiane

r = + 0,271 chez les hommes et + 0,198 chez les femmes

L'activité ALAT augmente avec l'Indice de Masse Corporelle dans les deux sexes.

Tableau IXb : Activité ASAT (UI/l) suivant l' l'Indice de Masse Corporelle (IMC) et le sexe

IMC (kg/m2)	Hommes	Femmes
	M* (Percentiles [2,5-97,5])	M* (Percentiles [2,5-97,5])
< 18,5	23 (15 – 47)	22 (12 – 49)
18,5 – 25	24 (13 – 69)	19 (8 – 60)
> 25,0	24 (19 – 52)	25 (16 – 53)

* médiane

r = + 0,043 chez les hommes et - 0,102 chez les femmes

→ L'activité ASAT semble indépendante de l'Indice de Masse Corporelle dans les deux sexes.

Variations de l'activité des transaminases dans la population d'étude

Les activités ALAT et ASAT sont relativement plus élevées dans le sexe masculin. L'intervalle des valeurs entre les percentiles 2,5 et 97,5 regroupant les 95% des sujets va de 13 à 65 UI/l chez l'homme et de 13 à 60 chez la femme pour les ALAT. Ces valeurs sont de 12 à 69 UI/l chez l'homme et de 8 à 59 chez la femme pour les ASAT (Tableaux Xa et Xb).

Tableau Xa : Activité ALAT dans la population d'étude

Percentiles (%)	Hommes (N = 175)	Femmes (N = 55)
2,5	13	13
50	25	19
95	61	45
97,5	65	60

L'activité ALAT est relativement plus élevée dans le sexe masculin.

Tableau Xb – Activité ASAT dans la population d'étude

Percentiles (%)	Hommes (N = 175)	Femmes (N = 55)
2,5	12	8
50	27	26
95	51	44
97,5	69	59

L'activité ASAT est relativement plus élevée dans le sexe masculin.

Valeurs de référence de l'activité des transaminases chez les donneurs de sang au Togo (âges : 20 – 30 ans).

L'intervalle des valeurs de référence entre les percentiles 2,5 et 97,5 regroupant les 95% des sujets en état de référence va de 14 à 47 UI/l chez l'homme et de 13 à 45 chez la femme pour les ALAT. Ces valeurs sont de 12 à 51 UI/l chez l'homme et de 12 à 39 chez la femme pour les ASAT (Tableaux Xla et Xlb).

Tableau Xla : Valeurs de référence de l'activité ALAT (UI / l).

Percentiles (%)	Hommes (N = 175)	Femmes (N = 55)
2,5	14	13
50	24	17
95	45	37
97,5	47	45

Tableau Xlb : Valeurs de référence de l'activité ASAT (UI / l).

Percentiles (%)	Hommes (N = 175)	Femmes (N = 55)
2,5	12	12
50	26	24
95	50	38
97,5	51	39

DISCUSSION

Limites et contraintes

Cette étude transversale réalisée au CNTS pour le recrutement de la population d'étude et au CHU-Campus de Lomé pour les dosages biochimiques des transaminases sur la période de septembre à Décembre 2005 a présenté des limites liées à :

- la taille de l'échantillon : si la taille de l'échantillon (230 individus) est suffisante pour étudier les transaminases dans la population des 7000 donneurs de sang de 2005, la stratification en fonction de l'âge, du poids, de l'IMC par exemple laisse apparaître des strates de petite taille (moins de 30 individus) ce qui réduit la validité des valeurs obtenues pour la strate correspondante.
- l'inexistence d'un protocole standard d'établissement des valeurs de référence en biologie clinique est source de difficultés dans la comparaison des résultats obtenus avec ceux d'autres auteurs.
- le choix des donneurs de sang comme population de référence : les dons de sang réguliers n'ont-ils pas d'influence sur les paramètres biologiques étudiés ?

Données sociodémographiques

La présente étude a porté sur un échantillon de 230 donneurs "sains" retenus après examens clinique et sérologique. Parmi eux 149 sujets d'âges variant entre 20 et 30 ans inclus avec un IMC inférieur à 25 ont servi à l'établissement des valeurs de référence.

Dans l'ensemble, nous avons obtenu plus de donneurs hommes (76,1%) que de donneurs femmes (23,9%) soit un ratio (♂/♀) de 3,14, reflétant la faible participation des femmes par rapport aux hommes au don de sang au Togo contrairement à ce qui se passe en France [10] où il y a un peu plus de femmes (50,1%) que d'hommes (49,9%).

Le poids des donneurs retenus a varié entre 50 et 115 kg avec une médiane de 64 kg. La taille, entre 149 et 192 cm avec une médiane de 170 cm. Les hommes ayant présenté des tailles plus grandes que les femmes.

Variations analytiques de l'activité des transaminases

Les résultats d'évaluation de l'exactitude et de la précision des méthodes de dosage montrent que ces méthodes sont fiables et nous permettent d'exclure les biais analytiques. Pour l'exactitude, la comparaison à l'aide du test t de Student ($t_{\text{calc}} < t_{\text{critiq}} = 2,262$) fait apparaître qu'il n'y a pas de différence significative entre la valeur cible du sérum et la moyenne obtenue au risque $\alpha = 5\%$. Quant à la précision, les coefficients de variation intra-sériels (répétabilité) et inter-sériels (reproductibilité) respectivement égales à 2,7% et 3,39% pour ALAT ; 2,92% et 4,38% pour ASAT permettent d'affirmer que les méthodes utilisées ont une bonne précision comparativement aux CV rapportés par VINCENT – VIRY et al [4 ; 5].

Variations biologiques de l'activité des transaminases

Les résultats obtenus montrent une corrélation positive entre l'activité des transaminases et le facteur âge. Cette augmentation de l'activité des transaminases quand on progresse en âge est plus significative pour ALAT ($r = + 0,125$) que pour ASAT ($r = + 0,103$). Nos résultats concordent avec les constatations de SIEST et al [1] sur la tranche d'âge de notre étude. VINCENT – VIRY et al [4; 5] ont tiré la même conclusion. Cette augmentation suivant l'âge pourrait s'expliquer par le couplage des facteurs de variation morphologiques et physiologiques avec l'âge.

D'autre part l'activité des transaminases obtenue dans une même tranche d'âge est nette-

ment plus élevée dans le sexe masculin que féminin. Ceci est en accord avec la littérature [1 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6] et confirme la nécessité d'interprétation de l'activité transaminase selon le sexe. Ces écarts selon le sexe seraient en partie liés aux décalages des variations morphologiques et physiologiques suivant l'âge entre les 2 sexes.

Les taux évalués des transaminases témoignent d'une corrélation positive entre ALAT et le poids : $r = + 0,138$ pour les hommes ; $r = + 0,113$ pour les femmes. L'activité ALAT augmente avec le poids dans les deux sexes. ASAT cependant semble indépendante du facteur poids ($r/$ hommes = $+0,037$; $r/$ femmes = $- 0,100$ et $r/$ mixte = $- 0, 011$).

SIEST et al [1] ont trouvé dans une population mixte une corrélation ALAT/ poids plus forte : $r = + 0,20$ et une corrélation ASAT / poids plus faible $r = - 0,14$ chez les hommes contre $r = - 0,19$ chez les femmes.

L'évaluation de l'activité des transaminases suivant la taille montre une diminution proportionnelle de l'activité ASAT avec la taille dans les deux sexes ($r = - 0,115$ chez les femmes et $r = - 0,101$ chez les hommes). L'activité ALAT au contraire présente des variations différentes suivant le sexe.

En effet, tandis qu'elle diminue avec la taille chez les hommes ($r = - 0,116$), chez les femmes ALAT augmente avec la taille ($r = +0,194$). Cette différence suivant le sexe nous amène à penser que la variation de l'activité ALAT serait indépendante du facteur taille. Nos résultats sont semblables à ceux de SIEST et al [1] pour l'activité ASAT ($r = - 0,148$ chez les hommes ; $r = - 0,371$ chez les femmes). Par contre, l'activité ALAT augmente avec la taille dans le sexe masculin ($r = + 0,014$) selon les résultats obtenus par SIEST.

Ces différences de variation s'expliqueraient par les dissemblances de nos populations mais aussi par l'existence d'autres facteurs sous-jacents conditionnant ces variations.

L'indice de masse corporelle permet d'apprécier le statut pondéral d'un sujet en croisant le poids et la taille.

Nos résultats révèlent que l'activité ALAT augmente avec l'IMC dans les 2 sexes ($r = + 0,271$ chez les hommes ; $r = + 0,198$ chez les femmes) tandis que l'ASAT semble indépendante de ce facteur ($r/$ hommes= $+ 0,043$; $r/$ femmes= $- 0,102$). VINCENT-VIRY a observé les mêmes sens variations [4 ; 5].

Comparaison de nos valeurs de référence avec celles d'autres auteurs

Nous avons établi les valeurs de référence de l'activité des transaminases (ALAT ; ASAT) à 37°C sur un échantillon de 149 donneurs de sang en état de référence. L'état de référence est défini par un âge compris entre 20 et 30 ans, l'absence de surcharge pondérale (IMC < 25), la non consommation d'alcool et de tabac, l'absence de prise médicamenteuse et de maladie apparente [9]. L'échantillon ainsi retenu est composé de 120 sujets masculins et 29 sujets féminins.

Nos valeurs de référence sont plus élevées que celles proposées avec les kits de réactifs utilisés, qui servent cependant de valeurs de référence à nos populations. Ces valeurs ne sont définies que par rapport à leurs limites supérieures qui s'évaluent à : 40,0 UI/l et 32,0 UI pour ALAT, respectivement chez les hommes et chez les femmes ; 38,0 UI/l chez les hommes et 31,0 UI/l chez les femmes pour ASAT [11 ; 12].

En Côte d'Ivoire, YAPO et al [6] ont obtenu des activités ALAT moins élevées avec celles ASAT superposables. Ces activités varient entre 8,3 et 36,1 UI/l chez les hommes contre 5,6 et 33,4 UI / l chez les femmes pour ALAT ; 10,8 à 49,3 UI / l chez les hommes contre 7,7 à 46,2 UI / l chez les femmes pour ASAT. En France, SIEST et al [1] ont obtenu à 37°C dans le sexe masculin, une variation de 12,7 à 40 UI / l pour ALAT et 13,0 à 31, 0 UI / l pour ASAT.

Ces valeurs relativement faibles pour certains seraient dues certes aux facteurs environnementaux et nutritionnels entre les différentes populations mais aussi à l'hétérogénéité des méthodes d'analyses et statistiques utilisées.

CONCLUSION

Les valeurs de référence obtenues sur l'activité des transaminases chez les donneurs de sang à Lomé au Togo sont différentes de celles qui, en l'absence de valeur propres à notre population, étaient utilisées jusqu'alors par transposition dans nos laboratoires de biochimie.

Ces valeurs devraient pouvoir servir de base à l'interprétation des résultats observés dans nos laboratoires. Toutefois, une question reste posée : les valeurs de référence obtenues chez les donneurs de sang de Lomé sont-elles représentatives du donneur de sang au Togo ? De la population générale au Togo ? Cette question ne trouvera sa véritable réponse qu'à la suite d'une enquête sur les populations dans leurs milieux. Il reste donc à élargir le champ d'étude aussi bien en terme de population que de paramètres biologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 – SIEST G. ; SCHIELE F. ; GALTEAU M- M. ; PANEK E. ; STEINMETZ I. ; FAGNANI F. and GUEGUEN R., Aspartate aminotransferase and Alanine aminotransferase activities in plasma : statistical distributions, individual variations, and reference values. Clin. Chem. 1975 ; 21 (8): 1077 – 87.
- 2 – SIEST G.; HENNY J.; STEINMETZ I. et al., Valeurs de référence en biologie : approche et critique de la notion de normalité. Vie médicale. 1974 ; 29 : 3423 – 11.
- 3 – LEVY S., Augmentation de l'activité sérique des transaminases de causes non élucidée par les tests biologiques habituels. Hépatogastro ; 1998; 2 (5): 133 – 41.
- 4 – VINCENT – VIRY M., Alanine aminotransférase. In: SIEST G. ; HENNY J. ; SCHELE S. référence en biologie clinique ; 1990 ; pp : 77 – 92.
- 5 - VINCENT – VIRY M., Aspartate aminotransférase. In: SIEST G. ; HENNY J. ; SCHELE S. référence en biologie clinique ; 1990 ; pp : 123 – 38.
- 6 – YAPO A.E. ; ASSAYI M. ; AKA N.B. ; BONETTO R. et al., Les valeurs de référence de 21 constituants biochimiques sanguins de l'Ivoirien adulte présumé sain. Pharmacien d'Afrique ; 1989 ; 12 / 89 (44) : 13 – 24.
- 7- DIEUSAERT P., Guide pratique des analyses médicales. Paris, maloine, col. Guides pratiques médicaux ; 2005 ; pp : 1177- 8.
- 8 – SAKANDE J. ; COULIBALY J – N. ; NJIKEUTCHI F- N. ; BOUABRE A. ; BOUKARY A. et GUISSOU I – P., Etablissement des valeurs de référence de 15 constituants biochimiques sanguins chez l'adulte Burkinabé à Ouagadougou (Burkina Faso). Ann. Biol. Clin. 2004 ; 62 (2) : 229 – 34.
- 9 – SIEST G. ; HENNY J. ; GUIZE L. et SACHS C., Utilisation des valeurs de référence. Document J, stade 3, version 1. Ann. Biol. Clin. 1982 ; 40 : 697 – 708.
- 10 – LEFRERE JJ., ROUGER P., Pratique nouvelle de la transfusion sanguine, 3^{ème} édition, Masson, Paris, 2009 : pp 145-154.
- 11 – BERMEYER et WAHELEFELD., GOT (AST) tests cinétique en UV selon l'IFCC. Clin. Chem. 1978 ; 24 : 58 – 73.
- 12 – BERMEYER et HORDER., GPT (ALT). Test cinétique en UV selon l'IFCC. Clin. Chem. Acta. 1980 ; 105 – 147.



ANALYSE D'IMAGES DE MACROPHAGES ALVEOLAIRES (PAM) PAR CYTOMETRIE CHEZ DES PATIENTS SOUFFRANT DE PATHOLOGIES PULMONAIRES INTERSTITIELLES

MOUMOUNI H^{1§}, MONNIAUX D², MAIZOUMBOU DA¹,
LEMARIE E⁴, ANTHONIOZ Ph³, DARBOUX R⁵.

CHARACTERIZATION OF HUMAN PULMONARY ALVEOLAR MACROPHAGES IN INTERSTITIAL LUNG DISEASES, USING IMAGE ANALYSIS CYTOMETRY

1. Laboratoire d'Histo-Embryologie et Pathologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Santé, Niamey, Niger.
 2. Station INRA de Physiologie de la Reproduction des Mammifères Domestiques, URA CNRS 1291, 37380 Nouzilly, France.
 3. Laboratoire de Pathologie Cellulaire, CHR Bretonneau, 37032, Tours, France
 4. Département des Maladies Respiratoires, CHR Bretonneau, 37032, Tours, France.
 5. Laboratoire de Biologie Humaine, Faculté des Sciences de la Santé, Cotonou, Bénin
- § Author for correspondence: BP 13218 Niamey, Niger

RESUME

Une cytométrie par analyse d'images des macrophages alvéolaires (PAM) a été réalisée sur des frottis de cellules recueillies par lavage broncho-alvéolaire (BAL) chez des volontaires (n = 6) et chez des patients souffrant de pathologies pulmonaires interstitielles (n = 24). La surface des cellules (SC), le facteur de forme (FF) et le rapport nucléo-cytoplasmique (RNP) ont été mesurés sur un échantillon moyen de 300 cellules choisies au hasard par patient. A partir de critères morphométriques multi variés utilisant ces paramètres, 6 sous-populations de PAM ont été définies et leur distribution a été étudiée dans l'échantillon de chaque patient.

Les résultats ont montré des différences dans le profil cytologique des PAM selon l'état physiopathologique du patient. En particulier, la répartition des monocytes-macrophages et celle des grands PAM ont été significativement différentes (p < .001) entre les groupes physiopathologiques. En revanche, le profil des sous populations macrophagiques a été similaire dans la plupart des patients au sein du même groupe pathologique.

Ces résultats suggèrent l'existence d'une relation significative entre la répartition des sous-types de PAM et l'état de l'interstitium pulmonaire. Une fréquence relative des types de monocytes-macrophages 1 + 2) atteignant 0,36 de cellules récupérées par BAL semble être de grande valeur prédictive de la sarcoïdose (> 90%). Ainsi, l'automatisation de la procédure peut devenir un outil utile dans le diagnostic et le suivi dans de nombreuses maladies du poumon.

Mots clés : Sous-types de Macrophage Alvéolaires / Cytométrie par Analyse d'Images / Sarcoïdose / sclérodémie / SIDA

SUMMARY

Image analysis cytometry of Pulmonary Alveolar Macrophages (PAM) was performed on smears of cells recovered by bronchoalveolar lavage (BAL) from volunteers (n = 6) and patients suffering lung interstitial derangements (n = 24). Cell area, form factor and nuclear to cytoplasmic ratio were measured on an average sample of 300 randomly chosen cells per patient. From morphometric multivariate criteria using these parameters, 6 subpopulations of PAM were defined and their distribution was studied in the sample from each patient.

Results showed differences in PAM cytology profile according to patient physiopathologic state. Particularly, the distribution of monocyte-macrophages and large PAM were significantly different (p < .001) between physiopathological groups. By contrast, the PAM subsets profile was similar in most of patients within the same pathology group.

These findings suggest the existence of a valuable relation between the distribution of PAM subtypes and the state of the lung interstitium. A relative frequency of monocyte-macrophage types achieving 0.36 of cells recovered by BAL appeared to be of high predictive value of sarcoïdosis (> 90%). Thus, as automated, the procedure can become a useful tool in diagnosis and survey in lung diseases.

Key words : Pulmonary Alveolar Macrophage subtypes/Image Analysis Cytometry/ Sarcoïdosis/ Scleroderma/ AIDS

INTRODUCTION

Identification and quantitative study of cell subpopulations remain the basis of bronchoalveolar lavage fluid (BAL) cytological examination. Assessed by total and differential cell counts, these samples provide a valuable means of evaluating inflammatory and immune processes of the human lung [1, 3, 9, 30, 31, 43]. BAL constituents have been shown to reflect inflammatory and immune processes occurring in the alveolar structures [18, 24, 38]. Thus, BAL cell characterization is the current method for classification of alveolitis, whose evaluation is of major interest during interstitial and infectious lung disorders [12, 26, 31, 35]. In this purpose, lymphocytosis and polymorphonuclear levels are the most investigated criteria, and the existence of correlations were established between lymphocytosis, lymphocyte subsets, polymorphonuclear levels and lung diseases i. e. sarcoïdosis, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), tuberculosis or connective systemic disorders [8, 12, 14, 16, 22, 23, 28, 34, 42]. Pulmonary alveolar macrophages (PAM) represent an average of 90% of cells recovered by BAL [20, 28, 38, 40]. Furthermore, they have been found to play a central role during interstitial lung diseases [4, 25, 27, 37]. However, changes in PAM morphology in these circumstances remain poorly investigated.

Recent data suggest that morphological characteristics of PAM might reflect their functional state. Indeed the existence of correlations between PAM morphological characteristics and lung state was recently proposed in human. First studies were performed mainly on histological specimens [10, 19, 20]. Then, authors described morphological aspects of PAM recovered in BAL during some interstitial lung derangements [6, 22, 39, 41]. In our experience of evaluating alveolitis, including assessment of PAM morphology in addition to

conventional cell count and differential count, we observed differences in PAM types present in samples obtained from patients with different lung disorders and similarities in samples from patients suffering from the same disorders. Since there may be questions of objectivity and reliability of such observations based on direct eye assessment on microscopical preparation [2, 5, 32, 33, 36], we undertook quantitative evaluation of morphometrical characteristics of PAM in BAL from patients with different lung pathologies by using image analysis cytometry. Our aim was first to test the existence of differences in distribution of PAM types in these circumstances. In addition, we attempted to determine if morphometric multivariate criteria applied to PAM subsets recovered by BAL might be of high predictive value in diagnosis and/or survey in lung diseases.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Thirty (30) bronchoalveolar lavage fluids (BAL), rated satisfactory according to criteria previously described [1, 11, 30, 43], were examined by image analysis cytometry. The samples were taken from patients of the same hospital, mainly the department of pneumology unit. The study population was divided into 4 groups: volunteers (A = 6) including two smokers; patients with sarcoïdosis (B = 9) with lung involvement in different stages of the disease course; patients with scleroderma (C = 8), with or without clinical or radiological evidence of lung involvement; immunocompromised patients (D = 7) investigated for infectious pneumonitis research.

These patients consisted of 15 males and 15 females, with a mean age of 38.8 (23-75). More detailed information concerning the subjects and the physiopathologic groups is summarized in table 1.

Table 1: Distribution of patients according to their physiopathological state.

State	Size (Male-Female)	Mean Age (range)	Clinical informations
Volunteers (A)	6 (5-1)	29.6 (24-38)	-1 of them had an abnormal cell differential count and might not represent a healthy volunteer.*
Sarcoidosis ** (B)	9 (4-5)	40 (26-50)	-5 in stage I or not specified, 3 in stage II and 1 in an outbreak evolutive state.
Scleroderma (C)	8 (1-7)	45.6 (23-62)	-3 of them had clinical and radiological evidence of lung involvement.
Immuno-compromised (D)	7 (5-2)	37.6 (27-75)	-5 of them were positive for VIH; 1 was a Hodgkin lymphoma patient being treated by chemotherapy; the last one was at the beginning of investigations for probable AIDS. -All the patients presented clinical symptoms of pneumonitis.
Total	30 (15-15)	38.8 (23-75)	

* This patient's BAL cell differential count was: **Lymphocyte** 12%, **Polymorphonuclear** 7%, **Macrophage** 81%

** In the sarcoidosis group, all differential counts except 1 (12%) revealed a lymphocyte level > 25%.

The last one presented lung interstitial abnormality revealed by X-ray at the time of BAL recovery.

Bronchoalveolar and cell processing

The BAL procedure was similar for all cases, as recommended elsewhere [7, 21, 29]. The lavaged area was the lingual. The mean fluid recovered was 85 ml. pooled fluid was transported in siliconized sterile glass flask to the laboratory within 30 minutes of recovery.

Before any filtration or centrifugation, a total cell count was performed in a hemocytometer, coupled with a viability test (trypan blue 1%). Lavage fluid was then divided in two conic tubes and centrifuged at 250g for 10mn. Monolayer smears were prepared manually from the cell pellets. The smears were air dried and stained by the May-Grunwald Giemsa method (MGG) and then submitted to microscopical image analysis.

Microscopical image analysis of PAM

Analysis was performed by using a microscope-linked, PC-based image analyser SAMBA TM 2005 (Alcatel, TITN Meylan, France). Each smear was analysed with a 40 X objective (X 400) by a stereotyped scanning method sufficient for accurate sampling in all slide areas. An average sample of 300 randomly chosen PAM was analysed for each smear. The image of each microscopical field was taken by a CCD camera. The video image was digitalized with 256 grey-value resolution in an image format of 512 X 512 pixel, and sent to a PC monitor. From a preliminary study, from each microscopical field, an automated selection of PAM, based on criteria of cell size was performed. Nevertheless, the decision to validate a cell as PAM was made by the operator (cytologist) who could observe the cell in the selected microscopical field before making the decision. For each selected cell, different parameters were measured: cell area (CA); cell perimeter (P); cell form factor ($FF = P^2/4\pi CA$); and the nuclear area (NA). The nuclear to cytoplasmic ration (NCR) was computed secondarily (as NA/CA).

From combinations of the measured parameters and by referring to PAM morphology as described by cytologists, different classes of PAM were defined, according to multivariate criteria (figure 1).

Cell area	NCR			Form
	> 0.30	0.25 –	< 0.25	Factor
< 300	Mono 1	Mono 2		≤ 1.8
				> 1.8
	Interm 1		Interm 2	
> 700	LPA			≤ 1.8
	LHA			> 1.8

Figure 1: Criteria used for determination PAM subpopulations *

Double stroke indicates that corresponding parameter was not used in the definition of the macrophage subtype.

* **Mono 1** = true monocyte-macrophage; **Mono 2** = monocyte-like macrophage

Interm 1 = Intermediate macrophage; **Interm 2** = Intermediate-like macrophage

LPA = Large poorly active macrophage; **LHA** = Large highly active macrophage.

One BAL was used for validation of the procedure. For this purpose, the BAL fluid was divided in 3 aliquots which underwent successive centrifugations in the same conditions. During management of one aliquot, the others are placed at + 4°C to prevent cell dying. From the cell pellet of each aliquot, two smears were prepared, air dried, and then stained by MGG. The resulting 6 smears were subjected to microscopical image analysis. Furthermore, to assess the repeatability of the measurements, three cells (a small PAM, a medium sized PAM and a large PAM were analysed 30 times. The procedure of data acquisition was newly initiated for each of the 30 measurements.

Data analysis

For the statistical analysis the data in all groups were tested for normality.

In descriptive statistics, data are expressed as mean ± SEM, or frequency distributions of classes of PAM within the groups.

Comparative analyses of the means of parameters within and between groups were carried out by variance analysis (ANOVA), using PLSD of Fischer and Dunn's tests.

Comparative analysis of the distribution of cell types within a group and between groups was carried out by using a contingency table (Chi² test).

RESULTS

Validation of morphometric analysis of PAM

To assess the reproducibility of measurements, 6 smears obtained from the same BAL were compared. Cell area, form factor and nuclear to cytoplasmic ratio were estimated for samples of PAM present in these smears (Table 2).

Table 2: Validation of the procedure of PAM image analysis cytometry: between smears variation.*
6 smears were performed from the same BAL. Morphological parameters were assessed by image analysis on PAM in the different smears.

Slide Number	Cell sample size	Cell area (μm^2) (mean \pm SEM)	Form Factor (mean \pm SEM)	NCR (mean \pm SEM)
1	325	266 (± 7)	1.67 (± 0.04)	0.368 (± 0.007)
2	223	257 (± 7)	1.58 (± 0.04)	0.368 (± 0.007)
3	274	272 (± 9)	1.67 (± 0.04)	0.369 (± 0.006)
4	262	262 (± 8)	1.65 (± 0.04)	0.370 (± 0.006)
5	227	254 (± 8)	1.59 (± 0.04)	0.364 (± 0.007)
6	221	253 (± 8)	1.61 (± 0.04)	0.366 (± 0.007)

* Between smears variation compared by variance analysis revealed not significant ($p > 0.05$) whatever the parameter and/or the compared smears.

Cell perimeter was used only for computing the cell form factor. Variance analysis revealed no differences ($P > 0.05$) among data obtained from the 6 stained smears from the same BAL. repeatability was also assessed on 3 selected cells. Thirty analysis of each cell yielded coefficient of variation of less than 5% for all parameters.

Morphological characteristics of PAM

In table 3 are summarized descriptive results of data from the study population as mean \pm SEM. PAM area ranged between 87 and 2040 μm^2 . More than 92% of the total PAM sample (9735 cells) were less than 700 μm^2 i.e. 30 μm diameter. The higher means of cell area were observed in scleroderma and AIDS, while lower mean was observed in sarcoïd patients (45% of PAM from sarcoïd patients measured less than 300 μm^2 i.e. 20 μm diameter vs only 22% of such cells in scleroderma patients). The mean PAM area was significantly different between all physiopathological groups (ANOVA: $P < 0.0001$).

Cell for factor (FF) ranged between 1.11 (in sarcoïd group) and 16.42 (observed in an immunocompromised patient). Form factor mean was lower in sarcoïd sample and higher in volunteers sample (72% vs 55% with $FF \leq 2$, sarcoïd vs volunteers respectively). The mean FF of PAM was not significantly different between sarcoïd and immunocompromised patients (ANOVA; $P = 0.24$).

Nuclear to cytoplasmic ratio ranged between 0.011 and 0.87 (both in sarcoïd group). 90% of the total PAM sample had a NCR > 0.20 , equally distributed between those ≥ 0.33 and those with $NCR > 0.20 < 0.33$. NCR mean was higher in sarcoïd group and lower in immunocompromised sample. The mean NCR of PAM was different between all physiopathological groups (ANOVA; $P < 0.0001$).

Table 3: Data from PAM measurements in physiopathological groups; as mean \pm SEM*

Group	Patients sample size	Cell sample size	Cell area (μm^2) (mean \pm SEM)	Form Factor (mean \pm SEM)	NCR (mean \pm SEM)
Volunteers	6	2011	359 (± 4) (a)	2.36 (± 0.03) (a)	0.337 (± 0.002) (a)
Sarcoidosis	9	2875	348 (± 3) (b)	1.98 (± 0.02) (b)	0.354 (± 0.002) (b)
Scleroderma	8	2639	448 (± 4) (c)	2.10 (± 0.02) (c)	0.321 (± 0.002) (c)
Immuno-compromised	7	2210	464 (± 5) (d)	2.02 (± 0.03) (d)	0.308 (± 0.002) (d)
Total	30	9735	404 (± 2)	2.10 (± 0.01)	0.331 (± 0.001)

* **(a, b, c, d)** indicate significantly different values of the parameter between the four groups, revealed by variance analysis. The use of the same letter for the same parameter in two or more groups means that there is not statistical difference for the parameter values in the corresponding groups, at least by one of the comparison tests of the variance analysis (PLSD test of Fischer and Duncan test).

Subpopulations of PAM from different physiopathological groups

Figure 2 summarizes frequency distributions of the PAM subtypes defined as described previously (Figure 1) in the physiopathological groups. The frequency of the Mono 1 cell type was significantly higher in the sarcoidosis group than in other groups, including volunteers (Chi²; P < 0.0001). All the patients of the sarcoidosis group exceeded 15% Mono 1 while less than 50% of the samples in the other groups achieved this proportion.

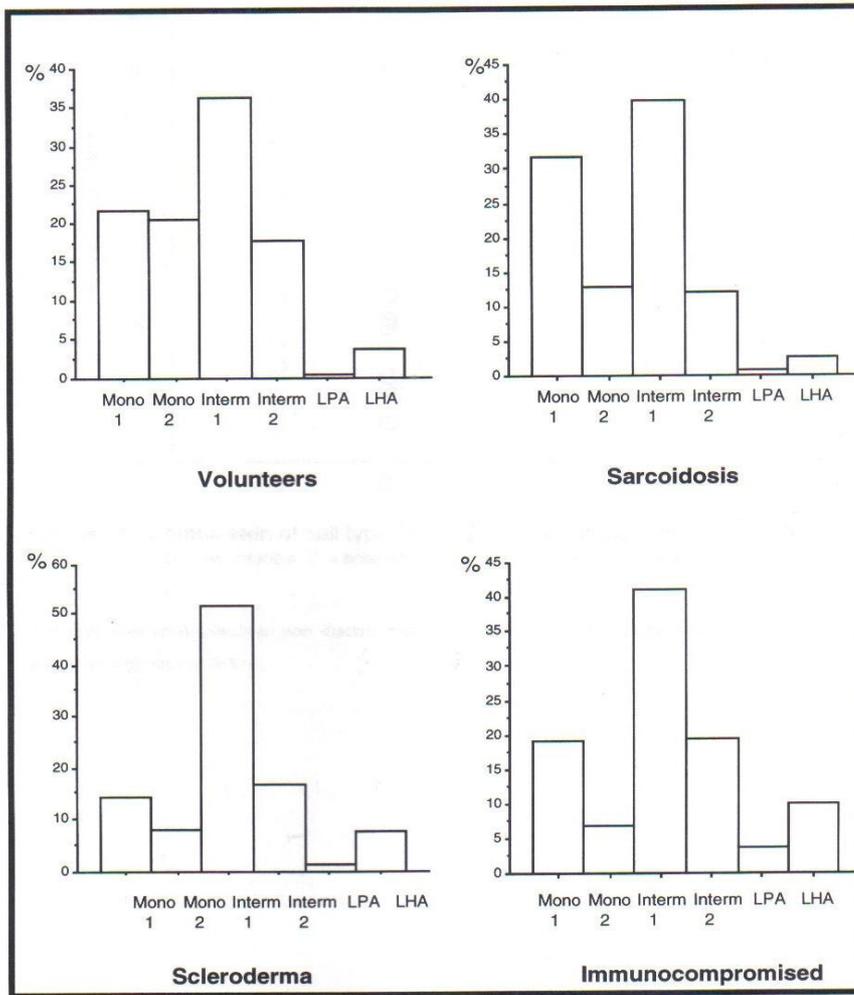


Figure 2: Distribution of multivariate PAM subtypes in physiopathological groups

The subtypes of PAM were defined according to the criteria described Figure 1.

The predictive value of sarcoidosis in pathological groups achieved 91% when the proportion of monocyte-macrophages (Mono 1 + Mono 2) achieved 36% (Figure 3).

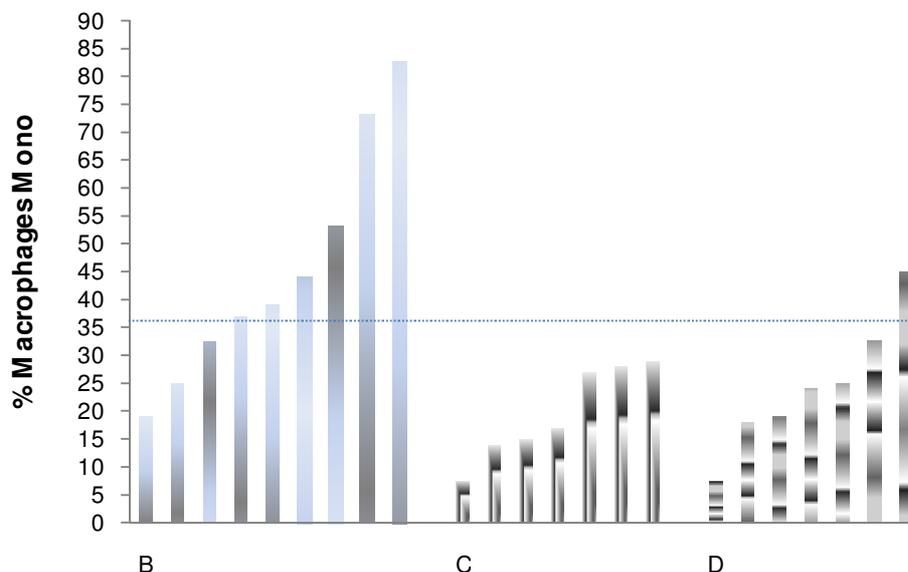


Figure 3: Comparison of cell type Mono distribution in patients:
B = sarcoidosis, **C** = scleroderma, **D** = immunocompromised

The area above the line (36%) corresponds to non discriminant values of Mono subtypes between pathological groups

The intermediate cell types (Interm 1 + Interm 2) were the most predominant PAM in BAL, with an average of 58.8% in the total study sample. The frequency of Interm PAM fluctuated from $56 \pm 4\%$ in groups A, B, and D, vs 68% in scleroderma group. The frequency of cell types LPA and LHA was too few in some groups to allow accurate statistical analysis. Consequently, we pooled them as larger macrophages (LM). Even though, their proportion was less than 5% in volunteers and sarcoid groups, their frequencies reached respectively 9% and 13.6% in scleroderma and immunocompromised groups. The cell type LM was inequally distributed within groups. Individual sample analysis revealed a significant predominance of large macrophages (LM) in four patients. The four patients with a significant predominance of LM correspond also to those in which lung interstitial abnormality detected by X-rays was the reason for BAL. one patient of the volunteers group, with a similar level of LM presented an abnormal cell differential count, evocative of a pulmonary fibrosis (Table 1). The finding suggests that the increase of LM might be related to pulmonary inflammation.

DISCUSSION

Characterization of changes in alveolar macrophage during lung diseases remains the major problem of BAL cytological examination. Despite the numerical predominance and the central role played by these cell in lung physiopathology [4, 25, 27, 37]. PAM cytology remains poorly informative in diagnosis. Reasons for this situation arise mainly from unsuitability of new technology methods i.e. immunology or flow cytometry to investigate PAM [11, 13, 15, 30, 43]. Some useful patterns provided by PAM cytology, result from visual morphology assessment. The subjectivity and failure in reproducibility of the procedure prompted us to investigate PAM characteristics

in various lung disorders by using image analysis cytometry.

The validation sample analysis suggests a reliability of the cytometrical method we used, from preparation of the slides to acquisition of data.

PAM morphological characteristics displayed by our series agree with those previously observed or assessed by authors in comparable staining conditions [17, 36, 39]. Studied parameters are those classically used for cell morphological classification by cytologists. By estimating the size, cytologist classifies cells as small, "normal" or large macrophages. Form factor is assumed to

reflect cell activity (i.e., production of pseudopods), traducing margin to the round form where FF = 1. We did not observe a difference between the sarcoïd and the immunocompromised groups as regards the form factor. However, reasons for this similarity are different. In sarcoïdosis, the phenomenon arose from a high number of small PAM (e.g. monocyte-macrophages), in which the FF is low. In the immunocompromised group, levels of this cell type were low (Figure 2); but the group contained the greatest percentage of large, presumably poorly active cells in which the form factor is low. Nuclear to cytoplasmic ratio (NCR) is recognized as a criterion of cell maturation. In the case of PAM, NCR values may decrease from the monocyte state to the mature macrophage stages [22, 36, 38, 41].

Visual assessment of morphology encountered three major problems: 1) values of cell parameter are continuous from the monocyte state to the macrophage stages. 2) Cell morphology assessment and classification require the evaluation of a combination of characteristics. 3) Assessment by eye is inherently subjective. In this model identification of a monocyte-macrophage was based on the following characteristics: 13-20µm diameter, NCR *around* 1/3 and a round shape. Multivariate criteria used to determine the cell subtypes followed the same approach. The main difference from other approaches is that the threshold determination for each parameter is not linked to subjective opinion. In this purpose Mono 1 cell type may correspond to a true monocyte-macrophage. Mono 2 which has some of these

characteristics, but not all may be recognized or not as this cell type, depending on the cytologist. The observation of higher rates of monocyte-macrophage in sarcoïdosis is in accordance with results from morphology assessment by other authors [6, 12, 15, 22, 41]. The high predictive value provided by monocyte-macrophages level (Figure 3) can be interesting in diagnosis and survey during lung sarcoïdosis. It is remarkable that intermediate cell types are homogeneously distributed in BAL whatever the physiopathological condition (50-70% in 26 of the 30 BAL).

The constancy of intermediate cell types and the differences observed in frequency of larger and smaller cells depending on the physiopathologic state suggest that the morphometric features on PAM may express the dynamic of subpopulations related to lung state.

Most prior studies in BAL utilizing computerized methods, mainly flow cytometry, focused on lymphocytes, as these methods appear unsuitable for PAM analysis [36, 43]. The image analysis method developed in this study allowed the identification of PAM subsets, determined by multivariate criteria from continuous data reproducibly measured. The analysis of the distribution of these subsets yielded valuable information about PAM changes during different lung diseases. As objective, reproducible, informative and automatable, image analysis cytometry of PAM may offer a new perspective in BAL cytological examination.

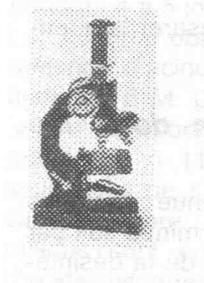
REFERENCES

1. Anthoine D, Cannet B et Vincent MA: Le lavage bronchoalvéolaire : Nouvelle technique d'investigation en pneumologie. **Med Interne** 3 :163-66, 1980.
2. Baak JPA, Oort J: **Manual of morphometry** in diagnostic pathology. Springer- verlag, Berlin Heidelberg, 1983.
3. Bernard JG and Fick RB Jr: Bronchoalveolar lavage. **Thorax** 35:1-8, 1980.
4. Bjermer L, Rust M, Heurlin N, Rennard S, Klech H: The clinical use of broncho-alveolar lavage in patients with pulmonary infections. **Eur Respir Rev** 8:106-13, 1992
5. Bradbury S: Microscopical image analysis: problems and approaches. **J Microsc** 115:137-50, 1979.
6. Burkhardt O, Lode H, Welte T, Merker HJ: Ultrastructural types of alveolar macrophages in bronchoalveolar lavage from patients with pulmonary sarcoidosis. **Semin Respir Crit Care Med** 28 (5):486-95, 2007.
7. Capron F, Perrot JY, Szekeres G, Caulet S: Technique du liquide de lavage broncho-alvéolaire dans un laboratoire central d'anatomie et cytologie pathologiques. **Ann Pathol** 10 :278-81, 1990.
8. Catherine R, Gerard JH, Annie A, Gisèle SL, Marsac JH, Jaques C: Bronchoalveolar cells in advanced sarcoidosis. **Am Rev Resp dis** 124:9-12, 1981.

9. Chollet S, Soler P, Bernaudin JF, Basset F: Le lavage bronchoalvéolaire d'exploration. **Presse Med** 24:1503-08, 1984.
10. Cohen AB, Cline MJ: The human alveolar macrophage: isolation, cultivation in vitro, and morphologic and functional characteristics. **J Clin Invest** 50:1390-8, 1971.
11. Crystal RG, Reynolds HY, Kalika A: International conference on BAL proceedings. **Chest** 89:122-31, 1986.
12. Daniele RP, Elias JA, Epstein PE, and Rossman MD: Bronchoalveolar lavage: Role in the pathogenesis, diagnosis, and management of interstitial lung disease. **Ann Intern Med** 102:93-108, 1985.
13. Dimitriu-Bona A, Gerd RB, Stanley JW, Robert JW: Human mononuclear phagocyte differentiation antigens: Patterns of antigenic expression on the surface of human monocyte and macrophages defined by mononuclear antibodies. **J Immunol** 130:45-52, 1983.
14. Drent M, Mansour K, Linssen C: Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. **Clin Rheumatol**. 1999, 18 (5):357-63.
15. Hance AJ, Douches S, Robert JW, Ferrans VJ, Crystal RG: Characterization of mononuclear phagocyte subpopulations in the human lung by using monoclonal antibodies: changes in alveolar macrophage phenotypes associated with pulmonary sarcoidosis. **J Immunol** 134:284-92, 1985.
16. Haslam PL, Bauer W, de Rose V, Eckert H, Olivieri D, Poulter LW, Rossini GA, Techler H: The clinical role of Bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis. **Eur Respir Rev** 8:58-63, 1992.
17. Hocking WG and Golde DW: The pulmonary alveolar macrophage. **The New Engl J Med** 301:639-45, 1979.
18. Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG: Inflammatory and immune processes in the human lung in health and diseases: Evaluation by Bronchoalveolar lavage. **Am J Pathol** 97:149-, 1979.
19. Klaus K, Olaf H: Stage related morphometry of sarcoid granulomas and inflammatory cell types in Bronchoalveolar lavage. **Anal Cell Pathol** 3:335-42, 1991.
20. Klaus G, Michael S: Automated cytology. **Arch Pathol Lab Med** 106:657-62, 1982.
21. Klech H, Pohl W: Technical recommendations and guidelines for BAL: Report of European Society of Pneumology. **Eur Respir J** 2:561-85, 1989.
22. Köhler Ch, Gérard H: Le lavage bronchiolo-alvéolaire (LBA): Etude cytologique et morphologique de 212 examens. **Arch Anat Cytol Path** 34 :230-36, 1984.
23. Maché Cl, Amoureux J, Turbie Ph, et Battesti JP : Données de la cytologie du liquide de lavage bronchoalvéolaire dans la sarcoïdose médiastino-pulmonaire. **Poumon** 35 :241-44, 1979.
24. Merrill WW: Bronchoalveolar lavage: Let's focus on clinical utility. **Chest** 102 (6):1794-9, 1992.
25. Moumouni H, Lamotte F, Anthonioz Ph: Sidérose des macrophages alvéolaires. Analyse d'une série continue de 360 lavages bronchoalvéolaires. **Path Biol** 41 (7) :604-9, 1993.
26. Moumouni H, Garaud P, Diot P, Lemarié E, Anthonioz Ph: Quantification of cell loss during bronchoalveolar lavage fluid processing. Effects of fixation and staining methods. **Am J Respir Crit Care Med** 149:636-40, 1994.
27. Pforte A, Gerth C, Voss A, Beer B, Haüssinger K, Jü Hing U, Burger G, Ziegler-Heitbrock HW: Proliferating alveolar macrophage in bronchoalveolar lavage and lung function changes in interstitial disease. **Eur Respir J** 6 (7):951-5, 1993.
28. Poulter LW, Rossini GA, Bjermer L, Costabel U, Israël-Biet D, Kleich H, Pohl W, Semenzato G: The value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis and prognosis of sarcoidosis. **Eur Respir Rev** 8:75-82, 1992.
29. Rankin J, Naegel FP, Reynolds HY: Use of a central laboratory for analysis of bronchoalveolar lavage fluid. **Am Rev Resp dis** 133:186-90, 1986.
30. Reynolds HY: Bronchoalveolar lavage. **Am Rev Resp dis** 135:250-63, 1987.
31. Saltini C, Hance AJ, Ferrans VJ, Basset F, Bitterman PB, and Crystal RG: Accurate quantification of cells recovered by BAL. **Am Rev Resp dis** 130:650-58, 1984.
32. Scharz WB, Hubert JW, Stephen GP: Pathology and probabilities. **The New Engl J Med** 305:917-24, 1981.
33. Seigneurin D, Lehodey PY, Rousseau M: Intérêt pronostic de la cytométrie par analyse d'images microscopiques dans le cancer du sein. **Bull Cancer** 77 (suppl 1) : 1555-605, 1990.
34. Silver RM, Miller SK, Kinsella MB, Smith EA, Schabel SI: Evaluation and management of scleroderma lung disease using bronchoalveolar lavage. **Am J Med** 88:470-76, 1990.

35. Taniuchi N, Ghazizadeh M, Enomoto T, Matsuda K, Sato M, Takizawa Y, Jin E, Egawa S, Azuma A, Gemma A, Kudoh S, Kawanami O: Evaluation of fractional analysis of bronchoalveolar lavage combined with cellular morphological features. **Micron** 2007; 38 (6):572-9. Epub 2006 Nov.
36. Thompson J, Van Furth R: The effect of glucocorticoids on the proliferation and kinetics of promonocytes and monocytes of the bone marrow. **J Exp Med** 137:10-21, 1973.
37. Uebelhoer M, Bewig B, Sternberg K, Rabe K, Nowak D, Magnussen H, Barth J: Alveolar macrophages from BAL of patients with pulmonary histiocytosis X: Determination of phenotypic and functional changes. **Lung** 173 (3):187-95, 1995.
38. Van Furth R, Martina MC, Diesselhoff-Den D, Herman M: Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during acute inflammatory reaction. **J Exper Med** 138:1314-29, 1973.
39. Van Meir F: Planimetry of bronchoalveolar macrophages: Importance of preparation and staining techniques. **Anal quant cytol histol** 3:335-42, 1991.
40. Van Oud Alblas BA, Van Furth R: Origin, kinetics and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state; **J Exp Med** 149:1504-18, 1979.
41. Velluti G, Capelli O, Lusuardi M, Braghiroli A, Azzolini L: Bronchoalveolar lavage in normal lung: cell distribution and cytomorphology. **Respiration** 46:1-7, 1984.
42. Wallaert B, Hoorelbeke A, Sibille Y, Rossini GA: The clinical role of bronchoalveolar lavage in collagen-vascular diseases. **Eur Respir Rev** 8:64-8, 1992.
43. Walters EH, Gardiner PV: Bronchoalveolar lavage as a research tool. **Thorax** 46:613-18, 1991.

**LEUCOSPERMIE ET INFERTILITE MASCULINE AU CHU TOKOIN
DE LOME TOGO**



FOLLIGAN K. (1), ANOUKOUM T. (2), ABOUBAKARI S. (3), FETEKE L (4),
ADAMA-HONDEGLA A. B. (5), DAGNRA A. (6), BOUKARI B.S. (1)

- (1) Service d'Histologie – Embryologie – Cytologie et Biologie de la Reproduction. CHU Tokoin – Lomé – Togo. B.P. 57
(2) Service d'Urologie. CHU Tokoin – Lomé – Togo. B.P. 57
(3) Clinique de Gynécologie et d'Obstétrique. CHU – Kara – Togo.
(4) Centre Nationale de transfusion sanguine de Lomé-Togo. BP 20707
(5) Clinique de Gynécologie et d'Obstétrique. CHU Tokoin – Lomé – Togo. B.P. 57
(6) Laboratoire de Bactériologie-Virologie. CHU Tokoin – Lomé – Togo. B.P. 57

Correspondance :

Dr Koué FOLLIGAN. Service d'Histologie-Embryologie, Cytologie et Biologie de la Reproduction. CHU Tokoin. B.P. 57 Lomé, Togo.
Téléphone : 00228 914 15 40 (portable) / 00228 221 29 65 (fixe). Email : folliganfrederic@yahoo.fr

RESUME

Introduction et objectifs

Au Togo, il n'existe pas d'études sur la présence des leucocytes dans le sperme. Ce travail a eu pour objectif de déterminer la prévalence de la leucospermie et d'évaluer la relation entre l'élévation de la concentration en leucocytes et les anomalies de certains paramètres du sperme

Résultats

Dans notre étude 18,33 % des patients avaient présenté une leucospermie. L'augmentation de la concentration en leucocytes était accompagnée d'une augmentation d'anomalies de volume. La numération des spermatozoïdes a diminué avec l'augmentation de la concentration des leucocytes. Les anomalies de mobilité des spermatozoïdes sont augmentées avec l'élévation de la concentration des leucocytes. Les anomalies de morphologie des spermatozoïdes ont diminué avec l'augmentation de la concentration des leucocytes.

Conclusion

L'augmentation de la concentration en leucocytes dans le sperme était accompagnée d'une augmentation d'anomalies des autres paramètres du sperme. Les facteurs qui induisent une leucospermie pourraient réduire le pouvoir fécondant du sperme.

Mots clés : Sperme, infertilité masculine, leucospermie, Lomé, Togo

SUMMARY

Introduction and objectives

In Togo, study doesn't exist on the presence of the leukocytes in the semen. This work had for objective to determine the prevalence of leukocytes elevation in the semen and to value the relation between the elevation of the concentration of leukocytes and the anomalies of some parameters of the semen.

Results

In our labour 18,33% of patients had presented an elevation of the concentration of leukocytes in semen. The increase of the concentration in leukocytes was accompanied by an increase of volume anomalies. The numeration of the spermatozoon decreased with the increase of the concentration of the leukocytes. The anomalies of mobility of the spermatozoids increased with the elevation of the concentration of the leukocytes. The anomalies of morphology of the spermatozoids decreased with the increase of the concentration of the leukocytes.

Conclusion

The increase of the concentration in leukocytes in the semen was accompanied by an increase of anomalies of the other parameters of the semen. The factors which induce an elevation of concentration of these cells could reduce the power of fecundity of the semen.

Keys words: Semen, masculine infertility, Leukocytes, Lomé, Togo

INTRODUCTION

Les leucocytes sont présents dans la plupart des spermés [1]. Selon l'OMS, le sperme normal devrait contenir moins d'un million par millilitre (10^6 /mL) de leucocytes [2]. La présence de plus de 10^6 / mL de leucocytes définit la leucospermie [2]. La prévalence mondiale de la leucospermie estimée est comprise

entre 10 et 20 %, chez les patients consultants pour infertilité [3]. Cependant, cette prévalence varie selon les régions [4-6]. La leucospermie a été accusée de réduire les capacités fécondantes du sperme [7]. Elle évoque une inflammation du tractus génital d'origine infectieuse ou non [1,8-9]. Selon Caskurlu, le rôle des leucocytes dans le sperme est discutable [10].

Au Togo, il n'existe pas d'études sur la présence des leucocytes dans le sperme. Ce travail eu pour objectif de déterminer la prévalence de la leucospermie et d'évaluer la relation entre l'élévation de la concentration en leucocytes et les anomalies de certains paramètres du sperme.

CADRE

Notre étude a eu pour cadre le service d'Histologie Embryologie Cytologie et Biologie de la Reproduction du CHU Tokoin de Lomé. Ce service de référence nationale reçoit des patients pour des problèmes andrologiques, des patientes pour des problèmes gynécologiques et des couples infertiles provenant de l'ensemble du territoire togolais et de la sous-région ouest-africaine.

MATERIEL

Le matériel de l'étude était constitué par les comptes rendus de spermogrammes de patients ayant consulté pour infertilité. Les spermogrammes étaient recueillis au laboratoire par masturbation et après trois jours d'abstinence sexuelle. Le recueil était fait dans un réceptacle gradué à ouverture large. Le sperme était gardé à la température ambiante. Son étude commençait 30 minutes après l'émission et

était réalisée par le même technicien. La numération des spermatozoïdes et des leucocytes était réalisée grâce à un hémocytomètre de Nageotte. L'étude de la morphologie des spermatozoïdes était faite après coloration de Shorr. Les anomalies de morphologie supérieures à 30 % ont été considérées.

METHODE

Cette étude a été rétrospective et analytique sur une période de 4 ans (janvier 1997 à décembre 2000). Les patients dont les spermogrammes renfermaient plus de 10^6 /mL de leucocytes ont été considérés. Les paramètres étudiés étaient :

- la concentration en leucocytes, le volume et la viscosité du sperme
- la numération, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes

La collecte de données était manuelle. Les données recueillies étaient enregistrées sur fiches préétablies. L'analyse des données était statistique et informatisée grâce au logiciel Excel. Nous avons utilisé le coefficient de corrélation (r) pour analyser les relations entre la concentration en leucocytes et les autres paramètres de l'étude. Le degré de signification (p) était fixé à 0,05. Les corrélations étaient significatives pour $p < 0,05$.

RESULTATS

Prévalence

Durant la période de l'étude, 1386 spermogrammes ont été analysés. La concentration des leucocytes variait de 1 à 8×10^6 /mL. Deux cent cinquante quatre (254) spermogrammes comportaient plus de 10^6 /mL de leucocytes, soit 18,33 % des cas. La leucospermie était isolée dans 40 cas (7,89 %) et associée aux anomalies de volume dans 47 cas (9,27 %), de viscosité dans 118 cas (23,27 %), de numération dans 156 cas (30,77 %), de mobilité dans 35 cas (6,90 %) et de morphologie dans 111 cas (21,90 %).

Relations entre concentrations de leucocytes et anomalies du sperme

Ces relations sont exprimées dans les tableaux suivants :

Tableau 1 : Répartition des cas d'anomalies de volume du sperme en fonction de la concentration de leucocytes

Concentration de leucocytes ($\times 10^6$ / mL)	Effectif des cas d'anomalies de volume
1	03
2	08
3	05
4	04
5	03
6	05
7	06
8	13

$r = + 0,5192$ $p < 0,0001$

Tableau 2 : Répartition des cas d'anomalies de viscosité du sperme en fonction de la concentration de leucocytes

Concentration de leucocytes ($\times 10^6$ / mL)	Effectif des cas d'anomalies de viscosité
1	09
2	04
3	09
4	14
5	05
6	09
7	28
8	40

$r = + 0,7550$ $p < 0,0001$

Tableau 3 : Répartition des cas d'anomalies de numération des spermatozoïdes en fonction de la concentration de leucocytes

Concentration de leucocytes ($\times 10^6 / \text{mL}$)	Effectif des cas d'anomalies de numération des spermatozoïdes
1	08
2	12
3	12
4	12
5	27
6	26
7	24
8	35

$r = + 0,9190$ $P < 0,0001$

Tableau 4 : Répartition des cas d'anomalies de mobilité des spermatozoïdes en fonction de la concentration de leucocytes

Concentration de leucocytes ($10^6 / \text{mL}$)	Effectif des cas d'anomalies de mobilité des spermatozoïdes
1	4
2	3
3	4
4	6
5	5
6	4
7	6
8	3

$r = + 0,1719$ $p < 0,0001$

Tableau 5 : Répartition des cas d'anomalies de morphologie des spermatozoïdes en fonction de la concentration de leucocytes

Concentration de leucocytes ($\times 10^6 / \text{mL}$)	Effectif des cas d'anomalies de morphologie des spermatozoïdes
1	20
2	19
3	08
4	06
5	14
6	20
7	11
8	13

$r = - 0,2414$

$p < 0,0001$

DISCUSSION

Cette étude a été une étude rétrospective hospitalière, réalisée dans un laboratoire. Elle ne peut conduire à des résultats exhaustifs et extrapolables à l'échelle nationale même si ce cadre d'étude constitue le centre de référence nationale. Seuls les patients ayant réalisé de spermogramme et chez qui les spermatozoïdes renferment plus d'un million de leucocytes par millilitre de sperme ont été concernés.

Durant la période de l'étude, les spermatozoïdes ont été manipulés par le même technicien, réduisant ainsi les erreurs d'estimations des paramètres d'un technicien à un autre. Les 254 cas de leucospermie, dans cette étude, pourrait permettre de se faire une idée de la prévalence de la leucospermie et de l'impact des leucocytes sur les autres paramètres du sperme des patients infertiles.

Dans cette étude, 18,33 % des patients avaient présenté une leucospermie. Arata [6] et Omu [11] ont trouvé un taux plus élevé de leucospermie, respectivement 32 % et 44 %. Par contre, Kung [4] a rapporté un taux plus bas (2%). La prévalence de la leucospermie varie donc d'une région à une autre. La raison de cette différence, pour Arata [6], est inconnue. Cette différence de prévalence, pour notre part, serait due aux infections sexuellement transmises, au tabac, à l'abus de l'alcool qui sont endémiques dans certaines régions par rapport à d'autres, et à la durée de l'abstinence sexuelle. Ces facteurs sont reconnus être à l'origine de leucospermie [6]

La concentration en leucocytes est corrélée avec les anomalies de volume. Cette corrélation est positive et significative ($r = + 0,52$, $p < 0,0001$). L'augmentation de la

concentration en leucocytes s'accompagne alors d'une augmentation d'anomalies de volume. Nos résultats corroborent ceux trouvés par Hamamah [12]. La migration des leucocytes est liée à l'inflammatoire des glandes annexes du tractus génital masculin, siège principal de production du plasma séminal [1, 7]. Une altération fonctionnelle de ces glandes, liée à l'inflammation, explique la corrélation positive entre leucospermie et anomalies de volume du sperme.

Notre étude a montré une corrélation positive significative entre la concentration en leucocytes et l'hyperviscosité du sperme ($r = + 0,75$; $p < 0,0001$). Hamamah a aussi noté cette corrélation [12]. La liquéfaction du sperme est due à des protéases secrétées par les glandes annexes [13, 14-15]. L'insuffisance de sécrétion des enzymes par atteinte de ces glandes explique l'augmentation des anomalies de la viscosité.

Dans notre étude 57,79 % des patients avaient présenté des anomalies de numération des spermatozoïdes. Il existait une corrélation positive significative ($r = + 0,9189$; $p < 0,0001$) entre la concentration de leucocytes et les anomalies de numération des spermatozoïdes. La numération des spermatozoïdes diminue avec l'augmentation de la concentration des leucocytes. Caskurlu [10] et al ont trouvé une corrélation négative significative ($r = - 0,031$; $p < 0,0001$).

Plus de 20,08 % des patients avaient présenté des anomalies de mobilité des spermatozoïdes. La corrélation positive significative

($r = + 0,1718$; $p < 0,0001$) entre la concentration de leucocytes et les anomalies de mobilité des spermatozoïdes. Les anomalies de mobilité des spermatozoïdes augmentent avec l'élévation de la concentration des leucocytes. Nos résultats corroborent ceux des études de Caskurlu ($r = + 0,53$; $p < 0,0001$) [10] et Fedder [8].

Ces auteurs pensent que les produits solubles des leucocytes peuvent affecter la fertilité par détérioration de la mobilité de spermatozoïdes. Arata [6] a, par contre, trouvé une corrélation négative et significative ($r = - 0,356$; $p < 0,006$) entre la concentration élevée de leucocytes et la mobilité des spermatozoïdes.

Dans notre étude 43,70 % des patients avaient présenté des anomalies de morphologie des spermatozoïdes supérieures à 30 %. La corrélation était négative significative ($r = - 0,2414$; $p < 0,0001$) entre la concentration de leucocytes et les anomalies de morphologie des spermatozoïdes.

Les anomalies de morphologie des spermatozoïdes diminuent avec l'augmentation de la concentration des leucocytes. Arata [6] a aussi trouvé une corrélation négative significative ($r = - 0,31$, $p < 0,01$) entre l'élévation de la concentration des leucocytes et les anomalies de morphologie des spermatozoïdes. Un rôle physiologique des leucocytes du sperme est l'enlèvement des spermatozoïdes morts ou anormaux [8]. Nous pensons plutôt que cette corrélation négative confirme le rôle d'éboueur des leucocytes vis-à-vis des formes anormales de spermatozoïdes.

CONCLUSION

L'augmentation de la concentration en leucocytes dans le sperme était accompagnée d'une augmentation d'anomalies des autres paramètres du sperme. Les facteurs qui induisent une leucospermie pourraient réduire le pouvoir fécondant du sperme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 – Chocat A. La leucospermie en routine. *Androl.* 2000 ; (10)4: 379-83.
- 2 – World Health Organisation (WHO). WHO Laboratory : anuel for Examination of Humain Sperm and semen cervical mucus interaction. Cambridge, UK 1992 Cambridge University Press.
- 3 – Lucas H. Inflammation de l'appareil génital masculin et la reproduction : Traitement in vitro. *Androl* 1998 ; 8 : 269-79
- 4 – Kung AWC., Ho PC., Wang C. Seminal leucocyte subpopulations and sperm function in fertile and infertile Chinese men. *Int J Androl* 1993 ; 16 : 189-94
- 5 – Sambini T., Umopathy. E. , Jacobus E., Tendaupenyu G., Mbizvomt. study on the origin of seminal leucocytes using split ejaculate technique and the effect of leucospermia on sperm characteristics. *Urol Int.* 1998 : 61(2) : 95-100.
- 6 – Arata de Bellabarba G., Tortolero I., Zoraida Molina C., Bellarba C. Nonsperm cells in Human semen and their relationship with semen parameters. *Arch Androl* 2000 ; 45 : 131-6.
- 7 – Saad A., Ben Alih, Rhimiz, Khairi H., Bouzakoura C. La leucospermie a-t-elle une influence sur l'état épидидymaire apprécié par le dosage de l'alpha 1-4 glucosidase ? *Fertil contracept Sexual*, 1990 ; 18 (12) : 1107-10.

- 8 – Fedder J. Monsperm cells in human semen : with special reference to seminal leukocytes and their possible influence on fertility. Arch. Androl. 1996 ; 36 (1) : 41-65.
- 9 – Trum JW., Mol B., Pannekoek Y., Spanjaard L., Werthein P., Bleker OP, van der Veen F. Value of detecting leukocytospermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. Fertil Steril 1998 ; 70 : 319-25.
- 10 – Caskurlu T., Tasci A.I., Samasti M., Bayraktar Z., Çek M., Sevin G. Immature Germ Cells in Semen and their Correlations with Other Semen Parameters. Internat Urol Nephrol 1999 ; 31 (3) : 389-93.
- 11 – Omu AE., Al-Quattan F., Al-Abdul Hadi FM., Fatinikum MT., Fernandes S. Seminal immune response in fertile men with leukocytospermia: effect on antioxidant activity Eur. J. Obstet. Gynecol. Biol. 1999 ; 86 : 195-202.
- 12 – Hamamah S., Barthélémy C., Lecomte P. Exploration de sperme pathologique et de son pouvoir fécondant. Rev Prat. 1994 ; 43 (8) : 948-55.
- 13 – Mauvais J-P., Médecine de la reproduction masculine. 1986, Paris, 2è ed ; Flammarion. 454 p.
- 14 – HuaiJin C., Junyan Z., Naiguan C. Prosthetic fluid and sperm examination: 106 cases preliminary study on infertility. Acta. Urol. Belg. 1998 ; 66 : 19-21.
- 15 – Dubé Y. J., Tremblay R. Rôle des enzymes protéolytiques du sperme dans la fertilité masculin. Médecine/Sciences. 1988 ; 4 : 96-100.

EFFET DE L'HYDROCHLOROTHIAZIDE SUR L'INDUCTION DE L'APOPTOSE ET LA NEPHROTOXICITE PAR LA GENTAMICINE DANS LE CORTEX RENAL DE RATS

[Effect of Hydrochlorothiazide on Gentamicin-induced nephrotoxicity and apoptosis in renal cortex of rats]



ALLABI Aurel Constant ¹, LALEYE Anatole ², VAN BAMBECKE Françoise ³, MINGEOT-LECLERCQ Marie-Paule ³, TULKENS Paul ³

1. Unité de Pharmacologie de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou, Université d'Abomey-Calavi, BENIN.

2. Unité d'Histologie, d'Embryologie et de Cytogénétique de la Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou, Université d'Abomey-Calavi, BENIN.

3. Unité de Pharmacologie cellulaire et moléculaire, Faculté de Médecine, Université Catholique de Louvain, Belgique.

Corresponding author contacts: Dr Aurel Constant ALLABI 01 BP 188 Cotonou Campus du champ de Foire-FSS Cotonou- BENIN
Email : acallabi@hotmail.com Tel: +229 95 73 49 00/ 90 08 35 09

RESUME

L'induction de l'apoptose au niveau du cortex rénal a été étudiée chez des rats Wistar de sexe masculin traités pendant 4 jours avec de la Gentamicine (GM) et/ou de l'Hydrochlorothiazide (HCTZ).

La GM a été administrée par voie intrapéritonéale à des doses (10 ou 20 mg/kg/jour pendant 4 jours) connues pour induire l'apoptose et des modifications fonctionnelles au niveau des reins.

L'HCTZ a été administré par gavage à des doses de 20 ou 40 mg/kg/jour pendant 4 jours.

La détection et la quantification de l'apoptose ont été faites en utilisant des techniques cytologiques (colorations Hématoxyline-éosine et Brachet) et immunohistochimiques (TUNEL).

L'induction de l'apoptose et la diminution de l'osmolarité urinaire sont significativement remarquables pour le traitement combiné GM+HCTZ comparé au traitement non combiné à base de GM. Par contre, la GM et les phospholipides corticaux ne sont pas différents entre les deux types de traitement (GM+HCTZ vs GM).

Une tendance à l'augmentation de la créatinine sérique est observée durant le traitement GM+HCTZ comparée au traitement à base uniquement de GM ; ceci probablement comme le résultat d'une augmentation significative de la réponse apoptotique en cas de GM+HCTZ.

Nos résultats montrent que la toxicité rénale de la GM peut être notablement augmentée par une coadministration de l'HCTZ.

Mots clés : Gentamicine, Hydrochlorothiazide, Apoptose rénale, Néphrotoxicité des médicaments

ABSTRACT

Kidney cortex apoptosis was studied in male Wistar rats treated for 4 days with GM and/or hydrochlorothiazide.

Each rat was given GM intraperitoneally at doses that induce apoptosis and functional modifications in the kidneys (10 or 20 mg/kg/day for 4 days). Hydrochlorothiazide was given at a daily dosage of 20 or 40 mg/kg by gavage, for 4 days.

Apoptosis was detected and quantified using cytological (hematoxylin eosin and Brachet) and immunohistochemically (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling) staining, in parallel with a measurement of drug-induced phospholipidosis (cortical phospholipids), kidney dysfunction (serum creatinine and urinary osmolality) and GM accumulation in the renal cortex.

As compared to rats given GM alone, alteration induced combined hydrochlorothiazide and GM treatments were significantly different for the following criteria: apoptotic response, urinary osmolality while no significant differences were found for these criteria: renal cortical accumulation of GM and phospholipids.

A tendency of increased serum creatinine was observed when HCTZ was associated with GM than with GM alone, probably as a result of the significant increase of apoptosis during the combined treatment.

Our results show that the renal toxicity of GM can be noticeably increased by concomitant administration of hydrochlorothiazide

Key Words : Gentamicin, Hydrochlorothiazide, Apoptosis, Nephrotoxicity

INTRODUCTION

Aminoglycosides have long been an essential component of our armamentarium against severe, life-threatening infections caused by gram-negative bacilli. However, their clinical usefulness is tempered by the associated nephrotoxicity which occurs in 10-15% of patients undergoing treatment (Bennett, 1989). Aminoglycosides, and gentamicin (GM) in particular, are the drugs most frequently associated with adverse drug reactions (ADRs). The frequency of ADRs caused by GM is related to age, initial impairment of renal function and association with multiple-drug administration, hospital stay length and duration of therapy. Moreover, GM is frequently used in patients with severe clinical status, who are most at risk for side effects (Bertino JS *et al.*, 1993).

The major clinical manifestation of nephrotoxicity is a fall in glomerular filtration rate (GFR) and this usually brings patients to medical attention. The pathogenesis of aminoglycoside-induced nephrotoxicity is well documented (Tulkens, 1989). A disturbance of electrolyte homeostasis is a second, potentially serious but less well-documented side-effect of aminoglycoside therapy. A syndrome associating hypomagnesaemia, hypocalcaemia and hypokalaemia in patients on aminoglycoside therapy has been described (Kelner *et al.*, 1978; Watson A *et al.*, 1983; Zaloga GP *et al.*, 1984). A common finding in these studies is that the levels of urinary electrolyte excretion are inappropriately high for their low plasma concentration, indicating a failure of the kidneys to conserve cations adequately.

However, it is very difficult to establish a relationship between aminoglycoside treatment and renal electrolyte disturbances because of the concomitant use of other drugs and the presence of underlying disease processes. Animal studies have therefore proved useful. Early animal studies focused on the renal effects of chronic aminoglycoside administration on rats or dogs were performed. Hyperkaliuria (Brinker *et al.*, 1981), hypercalciuria and hypermagnesiuria (Chahwala and Harpur, 1983; Harpur *et al.*, 1985) have all been shown to accompany long term GM treatment.

Elliot *et al.* (1995, 2000) showed that GM caused isolated calciuria by an unknown mechanism. They also found that the calciuric effects of GM and furosemide were additive, whereas the noncalciuric diuretic chlorothiazide had no effect

on GM calciuria. These previous work indicate that GM and diuretic impact on calcium homeostasis using different mechanisms. Recently Parsons *et al.* (2000) concluded that acute GM-induced hypercalciuria is mediated by a decrease in calcium reabsorption in the early distal tubule. But they think that there is no relationship between GM-induced hypercalciuria and renal tubular injury.

The aims of the present study were to investigate the effect of hydrochlorothiazide administration on GM-induced apoptosis in renal proximal tubules and on acute renal failure in rats and secondly to evaluate the relationship between apoptosis and serum creatinine.

MATERIALS AND METHODS

Animals and treatments

All studies were performed with male Wistar rats (180 to 200g body weight) purchased from a commercial breeding farm (Iffa-Credo, l'Arbresle, France). Before and during treatment, animals were housed in a central facility submitted to a 12-h light-dark cycle, provided with regular rat chow and tap water *ad libitum*, and handled and treated according to the guidelines of the Belgian Ministry of Agriculture (agreement no. LA 12303116). Twenty-four hours before the end of the treatment, rats were transferred to metabolic cages designed for urine collection.

Before performing the definitive experiment, a pilot study was carried out. We applied five different doses of HCTZ (0.00 mg/kg body wt/24h = polyethylene glycol 300 1ml/200g body wt/24 h; 1mg/kg body wt/24h, 10 mg/kg body wt/24h; 20 mg/kg body wt/24h; 40 mg/kg body wt/24h), each given to three animals for 96 hours. The doses of 20 and 40 mg/kg body wt/24h had a statistically significant effect on diuresis, urinary osmolality, urinary excretion rates of Na and K and apoptosis compared to 0.00, 1 and 10 mg/kg body wt/24h HCTZ treatment. Therefore, 20 and 40 mg/kg body wt/24h HCTZ were used in the definitive experiment of co-administration. For the definitive study, we selected two dosages of GM (10 and 20 mg/kg body wt/24h) based on previous experience (El Mouedden M, 2000).

For GM (Schering-Plough Labo, Heist-op-den-Berg, Belgium), the daily doses of 10 or 20 mg/kg were split into halves given as two separate administrations at around 9 a.m. and 5 P.M., respectively. GM was injected intraperitoneal by after appropriate dilution in 0.9% NaCl in order to deliver a volume about 0.5

ml per 200 g of animal and per injection. The actual volume injected into each rat was adjusted according to the body weight which was recorded immediately before each drug administration.

Hydrochlorothiazide (HCTZ; Sigma, St. Louis, MO, USA) 20 or 40 mg/kg was given by gastric gavages in a single administration at around 9 A.M. HCTZ was dissolved in polyethylene glycol 300 (Fluka Chemies Buchs) after appropriate dilution.

For control animals, 0.9% NaCl (0.5 ml per 200g of animal) and/or polyethylene glycol (1ml per 200g of animal) were administered. Each experimental group, including controls, contained six animals. Treated and control rats were killed approximately 16h after the last drug injection.

Sacrifice and sampling of renal tissue

Animals were killed by decapitation, and blood samples were collected from the stump for the measurement of serum creatinine. Both kidneys were exposed by laparotomy and excised. After longitudinal bisection, the renal cortex was removed by sharp dissection. For light microscopy studies, two necropsy specimens (each equivalent to approximately a quarter of each kidney) were fixed separately in Carnoy's mixture and in 10% neutral buffered formalin (4.2% formaldehyde) at room temperature for 24 and 48h, respectively. The remaining renal cortex tissue was snap-frozen in dry ice and stored at -80°C for future biochemical analysis.

Morphological studies. Histological demonstration of apoptotic cells

Kidney specimens, fixed in formalin or Carnoy's mixture, were dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in paraffin. Sections (approximately $7\mu\text{m}$ thick) of formalin-fixed tissue were used for hematoxylin-eosine staining or terminal deoxynucleotidyl TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL), whereas other sections (also approximately $7\mu\text{m}$ thick) from tissue fixed in Carnoy's mixture were stained with methyl green-pyronine to the method of Brachet (Brachet J, 1953).

Immunohistochemical demonstration of apoptosis

Apoptotic cells were detected by TdT-mediated extension of 3'OH ends of fragmented DNA using either digoxigenin- or fluorescein-labeled dUTP as a precursor (TUNEL) (method adapted from the original work of Gavrieli et al., who used

biotin-labeled dUTP). DNA-bound digoxigenin or fluorescein was revealed by reaction with antidigoxigenin or anti fluorescein antibodies with peroxidase. Reagents were purchased as commercial kits (Apoptag; Oncor, Gaithersburg, Md.; in situ cell death detection kit POD; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany (presently Roche Diagnostics).

The immunohistochemical staining procedure was carried out in accordance with the suppliers' recommendations. Briefly, sections of formalin-fixed and paraffin-embedded specimens were dewaxed, rehydrated, and pre-treated with $20\mu\text{g}$ of protéinase K per ml for 15mn at room temperature. After rinsing, the sections were incubated for 2h in a reaction buffer containing TdT, dATP, and digoxigenin-11-dUTP or fluorescein-11-dUTP. At the end of the incubation, the sections were rinsed with a stop-wash buffer for 30 min at 37°C , and the mixture was replaced by peroxidase-conjugated antidigoxigenin or anti fluorescein antibody.

Immunocomplexes were visualized by exposure to H_2O_2 and diaminobenzidine. Finally, sections were counterstained with methyl-green prior to mounting for light microscopy examination. Two positive controls were made to check that the immunostaining performed under our experimental conditions specifically revealed nuclei containing fragmented DNA. For the first one, DNA nicking was produced by exposing sections of control kidneys to micrococcal nuclease ($10\mu\text{g}/\text{ml}$, 10min, 37°C). In the second one, apoptosis was induced in cultured thymocytes by exposure to dexamethasone. In both cases, the appearance of a large number of immunostained nuclei was observed. Negative controls were also run by omitting the addition of TdT in the reaction mixture. No labelling was seen in this case in both kidney sections and smears of dexamethasone-treated thymocytes. However, in practice, this technique requires great expertise, as false-positive and false-negative results are common, and therefore simultaneous identification of the typical morphologic features is recommended.

Quantitative analyses

Enumeration of labelled nuclei (TUNEL histological) was performed for slides picked at random for each experimental animal (three slides for Brachet staining; two slides for apoptosis immunolabelling). These slides were assigned an arbitrary code which was disclosed to the observer (M.E.***) only after final pooling of

the results. Examination was made on a Zeiss light microscopy at 40 or s63 magnification for apoptotic nuclei. For calibration purposes, a square grid was mounted in on eyepiece, determining a square field of 0.04 or 0.016mm², depending on the magnification. The number of fields examined per slide was 20 for the methyl green-pyronine-stained sections and the immunostained sections.

For the histological assessment of apoptosis, we counted all cells with a pyknotic and karyorrhectic nucleus (typically, the total numbers of nuclei actually counted per animal were ~3 for controls and ~60 and 100 for rats treated for 4 days with 10 and 20 mg of GM per kg, respectively). For the assessment of apoptosis by TUNEL, we counted all nuclei exhibiting a frank brown labelling. These nuclei most often displayed typical alterations such as pyknosis, crescent-like condensation of the chromatin, or formation of apoptotic bodies.

Biochemical and microbiological studies

Cortical tissue samples were thawed and homogenized at 0°C in distilled water for measurement of their contents in total lipid phosphorus and protein, using well established procedures (Bartlett GR, 1959; Bligh EG, 1959; Lowry OH, 1951), which were fully validated in the previous study [variation coefficient of 1.5% and 1.8% for the assays of tissue phospholipids, and tissue proteins, respectively (n=20 in each case)].

The urine collected during the 24h period preceding the sacrifice was carefully mixed and stored at -20°C until analysis. Urine were thawed, mixed thoroughly and centrifuged at 25.000 rpm for 1h. The resulting pellets were

resuspended in 1ml of distilled water and used for the determination of total lipid phosphorus, as detailed previously (Ibrahim S et al, 1991; Ibrahim S et al, 1989; Kishore BK et al, 1992). The coefficient of variation of this determination was 4.7% (n=20).

Urinary osmolality was measured by an automatic analyser. The variation of coefficient of this determination was 1%.

Serum creatinine was determined by the routine procedures (Bartels H et al, 1972; Digiorgio J, 1974; Jaffé M, 1886) used for human clinical samples in our University Hospital (Cliniques universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium), with intrarun and interrun variations of coefficients of 0.6 and 1.2 and 3 and 2.5%, respectively (Hitachi 717 autoanalyzer; Hitachi Ltd., Chiyoda-Ku, Tokyo, Japan).

GM content in renal cortex tissue was assayed by a plate diffusion bioassay, using *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) as the test organism, using the technique developed earlier for cultured cell extracts (Tulkens P and Trouet A, 1978). All samples were assayed in triplicate against a series of known standards (extracts from control animals spiked with the corresponding antibiotic after homogenisation; no interference of homogenate protein was noted) over a 2.5-to 20-µg/ml range (typical r=0.987) and covering the range of drug concentrations found in the samples from treated animals.

Statistical analysis

The data are given as means ± SEM. Statistical differences between groups were evaluated by analysis of variance (ANOVA), using standard computer software. Differences were considered to be significant when P < 0.05.

RESULTS

The morphological appearance of the renal cortex of the animals treated at the different dosages of GM and /or HCTZ was studied by light microscopy.

The onset of apoptotic cell death in the kidney cortex of animals treated with GM and/or HCTZ was then quantified. Data are shown in **Figure 1**.

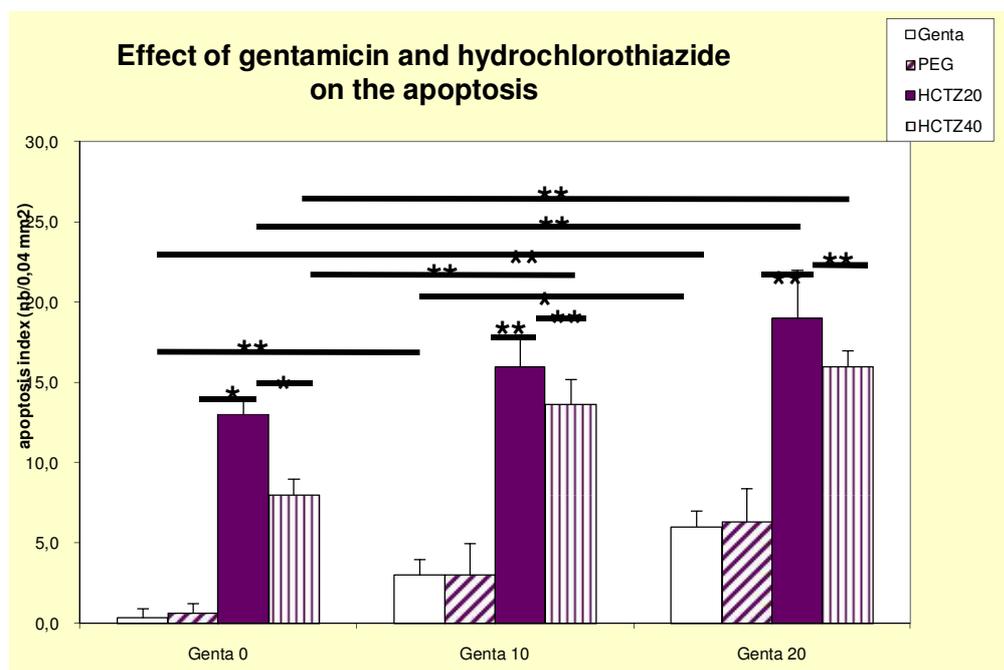


Figure 1: Enumeration of apoptotic nuclei observed in paraffin sections by the TUNEL method, in control animals (genta 0 and/or PEG) and in animals treated with gentamicin (10 or 20 mg/kg.day) and/or hydrochlorothiazide (20 or 40 mg/kg. day). Each histogram represents an animal group treatment and enumeration apoptotic variation standard. N=6 per group.

When the daily doses of GM and/or HCTZ were increased, apoptotic process became more frequent. But when the dose of HCTZ was raised to 40 mg/kg.day, we observed apoptotic process markdown and at the same time the necrotic cells became more frequent and were found in several parts of the cortex (**Table 1; Fig 1**). Concomitant administration of HCTZ at 20 mg/kg body wt/day and GM at 20 mg/kg body wt/day resulted in more apoptotic cells than were caused by other combination therapies (**Fig 1**).

Table 1: Morphology characteristics of renal cortex of rats treated by GM and/or HCTZ : Hematoxylin-eosin coloration

Treatment	Rats G10	Rats PG10	Rats H20G10	Rats H40G10	Rats G20
Necrotic cells ^a	--	--	+	+	+++
Suspected apoptosis cells ^b	--	--	+	++	+

+: means presence of necrotic or apoptosis cells

- : means absence of necrotic or apoptosis cells

G10 : Gentamicin at 10 mg/kg body wt/day

G20: Gentamicin at 20 mg/kg body wt/day

PG10: Polyethylene glycolle at 10 mg/kg body wt/day

H20: Hydrochlorothiazide at 20 mg/kg body wt/day

H40: Hydrochlorothiazide at 20 mg/kg body wt/day

Finally, the occurrence of the apoptotic process was additive in case of GM and HCTZ co-administration therapy. Apoptotic cells distribution in the renal cortex was clearly drug and dose dependant. HCTZ induced more apoptosis in distal convoluted tubule than in proximal tubule while GM nearly affected the

proximal tubule. Maximal apoptotic cells induce by GM were seen in proximal tubule or lumen. Distributions of apoptotic cells are shown in **Figure 2**.

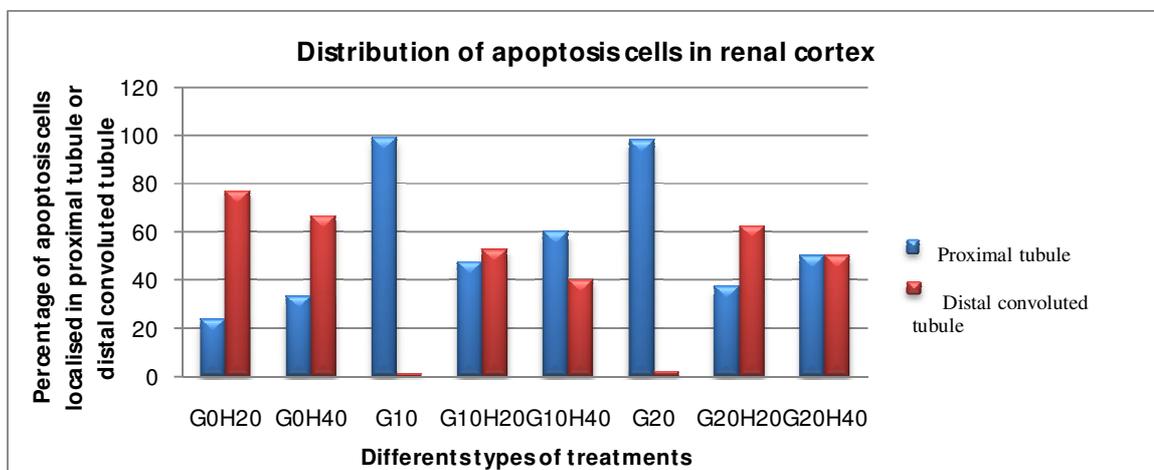


Figure 2: Distribution of apoptosis cells in renal cortex.

Four days of treatment with HCTZ and/or GM altered the structure of the tubular epithelium. Apoptosis cells within the epithelial lining were often seen. Occasionally, apoptotic cells and desquamated cells were seen within the tubular lumen. Mitotic cells were rarely seen. Sometimes, the tubular brush border was lost. In other respects, we observed the presence of many red blood cell casts in glomeruli.

Biochemical analysis

Results are shown in **Figure 3**. In our experiment, the level of serum creatinine increased after co-administration in a dose dependant manner. An increase of the doses of HCTZ and/or GM resulted in a rise of serum creatinine. Serum creatinine in the different groups was not significantly different. Nevertheless, we observed a global trend towards a potentialisation of renal toxicity when HCTZ was co-administered with GM.

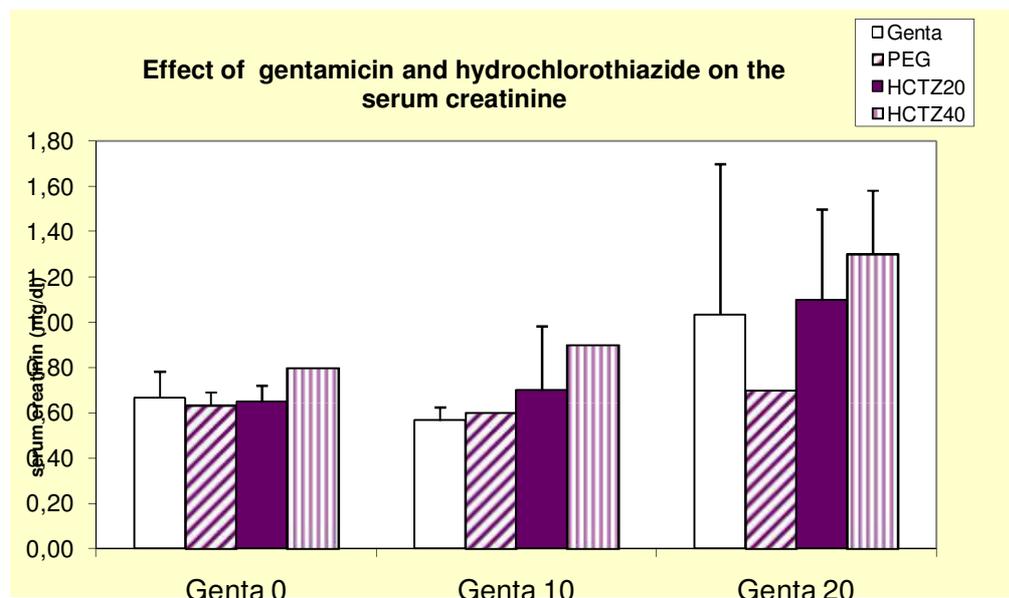


Figure 3: Serum creatinine in rats treated receiving gentamicin (0.10 or 20 mg/kg.day) and/or hydrochlorothiazide (0.20 or 40 mg/kg.day) for 4 days. Values are means \pm SD (n=6 per group).

As previously described, the administration of GM caused the intralysosomal accumulation of phospholipids (phospholipidosis) which can be directly assessed by the measurement of total cortical phospholipids (Laurent et al, 1982). As shown in **Figure 4**, the overall comparison did not show a significant difference of phospholipidosis related to treatment.

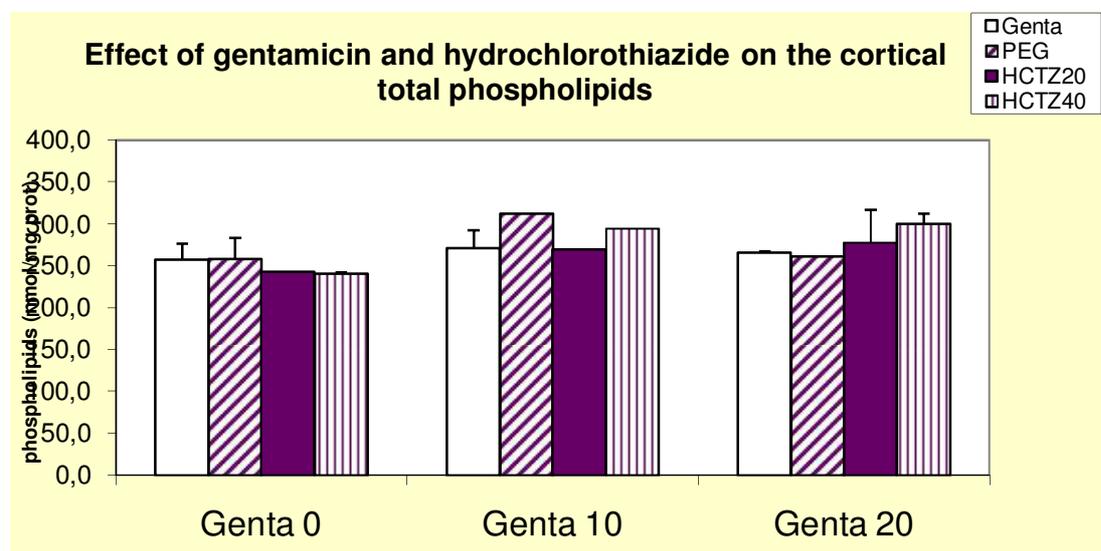


Figure 4: Cortical total phospholipids in rats treated receiving gentamicin (0.10 or 20 mg/kg. day) and/or hydrochlorothiazide (0.20 or 40 mg/kg.day) for 4 days. Values are means \pm SD (n=6 in each group).

Table 2: Cortical gentamicin content in rats treated

Treatment	Rats G10	Rats PG10	Rats H20G10	Rats H40G10	Rats G20	Rats PG20	Rats H20G20	Rats H40G20
Gentamicin Concentration in renal cortex ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	1,35 \pm 0,07	1,80 \pm 0,40	1,20 \pm 0,01	1,42 \pm 0,03	3,60 \pm 0,03	3,41 \pm 0,00	3,15 \pm 0,60	3,40 \pm 0,05

The rats were treated with gentamicin (10 or 20 mg/kg.day) and/or hydrochlorothiazide (20 or 40 mg/kg.day) for 4 days. Values are means \pm SD (n=6 in each group).

Examination of sections at high magnification revealed the presence of cells with typical alterations of apoptosis (cell shrinking eosinophilic cytoplasm and presence of a small and shrunken nucleus with chromatin condensation) (**Figure n°5**). The chromatin condensation characteristic of apoptosis is obvious in this cells as "pyknosis," i.e., very dense staining of chromatin by hematoxylin. However, nuclei of quiescent cells (e.g., small lymphocytes) might be mistaken for pyknotic cells. Therefore, other histological techniques have been necessary to confirm apoptosis on equivalent slide.

The use of the periodic acid-Schiff reaction confirmed these cells localisation (data not shown).

Animals were treated with hydrochlorothiazide (20mg/kg.day) and GM (20mg/kg.day) for 4 days. Arrows point to cells showing clear evidence of nuclear alterations (chromatin condensation or pyknosis) related to apoptosis. There are many cells which are suggestive of apoptosis.

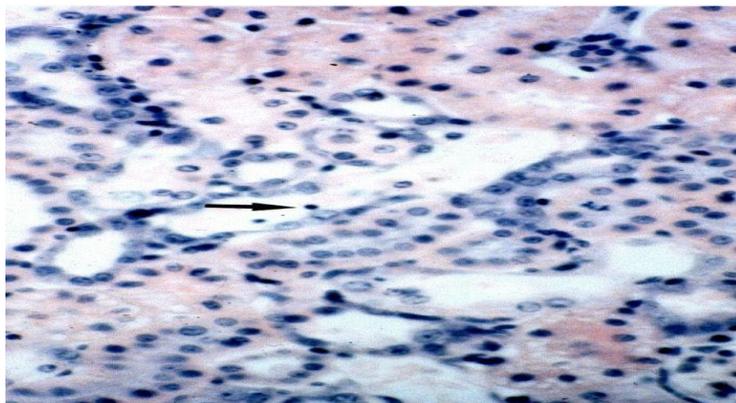


Figure 5: Light microscopy appearance of paraffin sections of kidney cortical specimens stained with hematoxylin eosin. Specimen kidney cortex of rats treated for 4 days with HCTZ (20 mg/kg.day) and GM (20 mg/kg.day): there are many cells which are suspected of apoptosis. Hematoxylin-eosin's staining (x 500)

The nuclear alterations characteristics of apoptosis were more clearly visible after using the Brachet technique (**Figure n°6**).

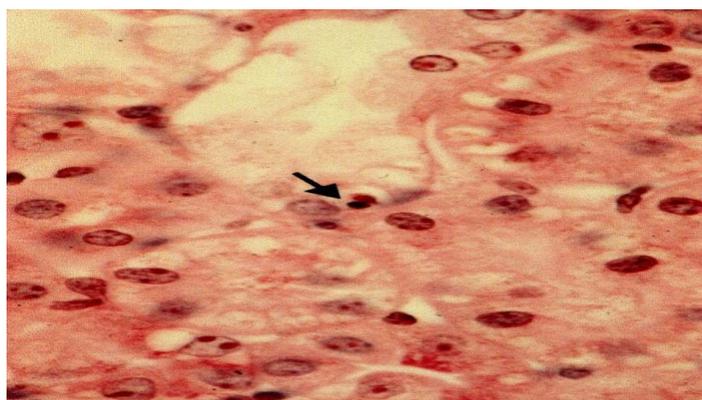
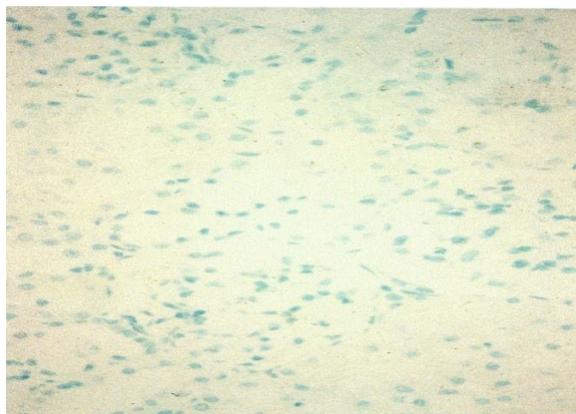


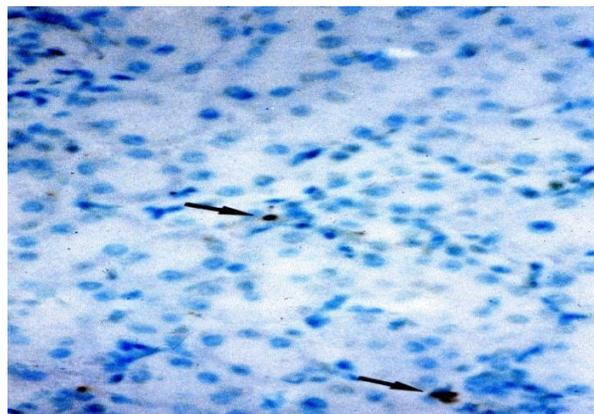
Figure 6: Light microscopy appearance of paraffin sections of kidney cortical specimens stained with methyl green-pyronin (Brachet's staining). Single arrow point to cell showing clear chromatin condensation suggestive to apoptosis. Animals were treated with GM (20 mg/kg.day) for 4 days. Brachet's staining (x 1250)
Specimen kidney cortex of rats treated for 4 days with GM (20 mg/kg.day).

In parallel with these conventional staining techniques, we examined kidney sections after in situ immunohistochemical demonstration of DNA fragmentation (TUNEL technique) (**Figure n°7/A; Figure n°7/B**).

Scattered peroxidase-labeled nuclei were easily recognized be detected over the entire cortex from all treated animals, due to their brownish appearance contrasting with the light background. In practice, TUNEL was used to confirm the nuclear alterations seen by the histological techniques. Sections from control animals showed only a very few labeled nuclei, sometimes even no labeled nuclei (**Figure n°7/A**).



A: Negative TUNEL (x 125)
Specimen kidney cortex of rats treated with 0.9% NaCl and PEG 300.



B: Positive TUNEL (x 500)
Specimen kidney cortex of rats treated for 4 days with HCTZ (20 mg/kg.day) and GM (20 mg/kg.day).

Figure 7: Immunohistochemical demonstration of apoptotic nuclei in sections of kidney cortical specimens of controls (Animals treated with 0.9% NaCl and PEG 300) (**A**) and animals treated for 4 days with hydrochlorothiazide 20 mg/kg.day and GM 20 mg/kg.day (**B**), performed by TdT-mediated labeling of fragmented DNA (TUNEL). Positive nuclei were identified as shrunken, dark stained bodies with either a condensed or a fragmented appearance.

DISCUSSION

Mechanisms involved in cellular damage and apoptosis

After glomerular filtration, aminoglycosides are taken up at proximal tubule level by a process of adsorptive endocytosis binding the apical membranes by interacting with anionic phospholipids (Sastrasinh M *et al.*, 1982). Aminoglycosides inhibit the enzymatic breakdown of phosphatidylinositol. Miao *et al.*, have shown that inhibition of phosphatidylinositol-specific phospholipase C can per se cause apoptosis.

It is well-recognized that aminoglycosides cause an irreversible inhibition of lysosomal sphingomyelinase in cultured cells as well as *in vivo* (Laurent *et al.*, 1982). It can therefore be hypothesised that the resulting change in ceramide production from sphingomyelin could play a critical role in cell apoptosis occurrence.

It has also been established that some cysteine proteases contained in lysosomes are capable of activating caspase-3 (Ishiaka R *et al.*, 1998), a key effector in the execution phase of apoptosis since it activates CAD (Enari M *et al.*, 1998). According to this scheme, aminoglycosides could thus trigger apoptosis by acting not at the commitment phase, but at the execution phase. Free radicals derived from oxygen products during the treatment with aminoglycosides could be involved in the apoptotic process. These

could explain why vitamin E and probucol, by their antioxidant activity have a protective effect against nephrotoxicity induced by GM (Abdel-Naim AB *et al.*, 1999).

About cortical phospholipids, the observations reported here differ from those by El Mouedden M *et al.*, 2000 who noticed a correlation between the degree of the lysosomal phospholipidosis and the occurrence of apoptosis in renal cortex. We think that 96 hours of treatments isn't sufficient for the development of conspicuous lysosomal alterations. Most probably HCTZ induced the subtoxic alteration of the renal cortex but this has yet to be proved, the induction of lysosomal phospholipidosis by HCTZ. However, we observe that GM induced lysosomal phospholipidosis. All these observations allow us to conclude that the occurrence of phospholipidosis is posterior to the apoptosis.

Angiotensin II promotes apoptosis in a variety of cultured cell types, including cardiomyocytes, endothelial cells, and fibroblasts (Solary E *et al.*, 1993; Thomas SE *et al.*, 1998). Both AT-1 and AT-2 receptors have been implicated in Angiotensin II-induced apoptosis (Kajstura J *et al.*, 1997; Yamada T *et al.*, 1996). Ortiz A *et al.* (2000), recently observed that therapy with either quinapril or the AT-1 receptor antagonist such as losartan reduced the rate of tubular

epithelial cell apoptosis in spontaneously hypertensive rats with renal mass reduction. Losartan also decreased apoptosis of tubular and interstitial cells that was associated with cyclosporine A nephrotoxicity in rats (Thomas SE *et al.*, 1998). In fact, high dose of HCTZ provokes a relatively high loss of sodium and as a result a decrease of blood volume. In response, we observed aldosteronism up regulation and angiotensin II increase. By this mechanism, HCTZ can induce apoptosis. However, another mechanism can explain the induction of apoptosis by HCTZ. Loffing J *et al.* (1998) have shown that thiazide diuretics provoked similar lesions in the distal convoluted tubule (DCT). They favour the explanation that the primary cause for the injury of DCT cells during treatment with thiazide diuretics might be related with their pharmacological effect, that is, inhibition of apical NaCl entry and increase of apical Ca²⁺ entry.

In our study, we observed that HCTZ induces more apoptosis in DCT than proximal tubule, while HCTZ are secreted by proximal tubule cells (Velazquez H, 1995). Most importantly, apoptosis induction in the renal cortex by HCTZ is dependant on HCTZ applied doses. These data confirm that apoptosis induced by HCTZ is due to pharmacological effects.

Strange (1989) showed that inhibition by amiloride of apical Na entry in isolated rabbit CCD cells is followed by immediate cell shrinkage. Cell shrinkage seems to induce catabolic processes that ultimately might lead to apoptotic cell death.

In the present study, we used HCTZ in order to block the apical NaCl entry into the renal cortex cells in rats with possible renal injury (GM treatment). Our experiments can be compared with through Finn WF and Luc J (1995) study: they showed that dietary sodium restriction promotes apoptosis after renal ischemia, and on the contrary, high Na⁺ intake reduces the incidence of apoptosis after ischemia.

Duc C *et al.* (1994) have shown the presence of EnaC (amiloride-sensitive sodium channels) in the distal segments of renal cortex. This receptor can assure Na entry into the cells during a blockade of the rTSC1-mediated transports. Moreover, it is possible that a different Na⁺ transport protein increases by on up regulation process after HCTZ administration. These data argue against an implication of the Na⁺ entry mechanism in the introduction of apoptosis.

HCTZ have a hypocalciuric effect which is thought to be promoted by increasing Ca²⁺ entry

through the apical membrane of distal cells (Lajeunesse D and Brunette MG, 1991; Gesek FA and Friedman PA, 1992). It can be speculated that the structural degradation and apoptotic cell death of distal convoluted tubule cells might not solely be caused by the reduction of apical NaCl⁻ entry into the cells, but also (or alternatively) by an abrupt and transient rise in intracellular Ca²⁺ associated with HCTZ treatment. Data derived from cell culture suggest that an increase in free intracellular Ca²⁺ might trigger apoptosis and that inhibition of Ca²⁺ entry into cells might prevent apoptosis (Tsukidate K *et al.*, 1993; Nicotera P *et al.*, 1994).

Under our experimental conditions, probably, the hypercalcemia effect of HCTZ alters the acute hypercalciuric response to GM. But HCTZ doesn't interfere with GM accumulation in the renal cortex (Table 2) in contrast to furosemide (Nakahama H *et al.*, 1989_b). This may suggest that the acute effects of GM on renal calcium handling do not contribute to the subsequent nephrotoxicity and GM-induced apoptosis.

Recently, mitochondrial permeability transition has been linked to the induction of apoptosis. It may be possible that GM induced apoptosis via this mechanism. Rustenbeck I *et al.* (1998) have demonstrated that ability of GM to inhibit Ca²⁺ mitochondrial accumulation may contribute to the mitochondrial lesions which are known to occur early in the course of aminoglycoside-induced nephrotoxicity. It is important to investigate the relationship between GM effect on mitochondrial function (energetic, ion transport) and GM-induced apoptosis. It is possible that GM interferes with HCTZ on mitochondrial function.

Apoptosis: beneficial or deleterious role in renal injury?

The role of apoptosis in renal injury and its role in specific acute renal failure were not obvious. The presence of apoptotic cells have been described in many renal diseases: diabetic nephropathy, proteinuria, HIV nephropathy, proliferative glomerulonephritis (Ortiz A *et al.*, 2000).

It is clear that apoptosis maintains cellular homeostasis. Most tissues depend on well-ordered apoptosis and cell replacement for normal functioning. Indeed, approximately 100, 000 cells are produced every second in a human, and a similar number die through apoptosis. One advantage of apoptosis for the tissue is the absence of inflammation generation.

Evidence from experimental models of renal injury suggests that apoptosis co-exists with renal cell proliferation (El Mouedden M *et al.*, 2000). In this case, apoptosis represents a physiologic process to eliminate redundant cells and resolve an exaggerated proliferative response to injury. In this setting, apoptosis can restore cell number to pre-injury levels, but also can contribute to delayed recovery from acute renal failure. This might be especially true in the clinical setting. Contrary to the experimental situation, in which a single insult causes enough damage for the model to be reproducible, the clinical setting is often characterized by repeated low-grade renal damage leading to tubular epithelial cell apoptosis, even in the absence of clinical deterioration of renal function (Jaffe R *et al.*, 1997) and can hamper recovery in previously damaged tubules.

An excess rate of apoptosis of tubular epithelial cells has been observed in experimental models of chronic tubular atrophy and human HIV nephropathy (Vaux DL and Korsmeyer SJ, 1999; Schelling JR *et al.*, 1998; Thomas GL *et al.*, 1998). These cases can lead to think that apoptosis has a deleterious role in some renal diseases. Indeed, the precise relative contribution of both mechanisms (apoptosis and necrosis) to the renal injury is uncertain and might depend on the severity of the insult.

In the present study, apoptosis occurs before necrosis. When the insult increases, necrosis becomes more important than apoptosis (Table 1).

Kidney dysfunction

Experiments carried out in our laboratories have shown that GM given at high doses results in polyuria and of a minor decrease of the urinary osmolality. This effect is potentialised in case of co-administration of two drugs. If the mechanism by which HCTZ induces a reduction of the urinary osmolality is well known, the GM mechanism is less well known. If there is a

relationship between urinary hypoosmolality induced by aminoglycosides and their toxicity, it seems logical to think of a potentialisation of nephrotoxicity in the case of administration of the two drugs. Medical supervision of urinary osmolality in patients taking a multiple drugs would then become important in order to prevent renal toxicity.

Globally, the level of serum creatinine increases after co-administration and it is dose dependent. When the doses of HCTZ and/or GM were increased, the level of serum creatinine seemed to increase as a result. However, serum creatinine levels of the different groups are not statistically different. Nevertheless, we can conclude in a global tendency of potentialisation of renal toxicity when coadministration of HCTZ and GM is done. In the present study, we observed that HCTZ can't modify GM accumulation in renal tissues (see Table 2) but potentiate GM nephrotoxicity.

Then HCTZ potentiate GM nephrotoxicity by another mechanism. Aminoglycoside nephrotoxicity could be aggravated by diuretics due to a fall in plasmatic volume (Nakahama *et al.*, 1989). Thiazides, when administered acutely, reduce glomerular filtration, mostly by a direct vascular effect and a rise in the intraluminal hydrostatic pressure. This could explain the potentiation of renal toxicity of the drug in the case of acute administration. It is very probable that this effect considerably is reduced in the case of chronic administration due to the diminution of pharmacological effects of thiazides.

We clearly observe that co-administration greatly improve the induced apoptosis. The incidence of apoptosis obtained in combination therapy is additive. It appears that apoptosis is an earlier and more sensitive phenomenon than rise in serum creatinine. Can apoptosis be considered as a for-runner of nephrotoxicity?

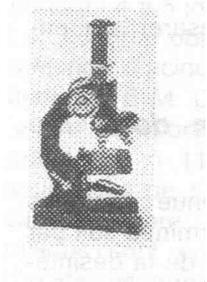
REFERENCES

- 1- Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Attia FF. Protective effects of vitamin E and probucol against GM-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 1999; 40:183-187.
- 2- Bartels H, Böhmer M, Heierli C. Serum kreatininbestimmung ohne Enteiweissen. *Clin Chim Acta* 1972; 37:193-197.
- 3- Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959; 234:466-468.
- 4- Bennett WM. Mechanisms of aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1989; 16:1-6.
- 5- Bertino JS, Booker LA, Franck PA, Jenkins PL, Franck KR, Natziger AN. Incidence of and significant risk factors for aminoglycosides-associated nephrotoxicity in patients dosed by using individualised pharmacokinetic monitoring. *J Infect Dis* 1993; 167:173-179.
- 6- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37:911-917.
- 7- Bodi I, Abraham AA, Kimmel PL. Apoptosis in human immunodeficiency virus-associated nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1995; 26:286-291.

- 8- Brachet J. The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acid. *Q J Microsc Sci* 1953; 94:1-10.
- 9- Brinker KR, Bulger RE, Dobyan DC, Stacey TR, Southern PM, Henrich WL, Cronin RE. Effect of potassium depletion on gentamicin nephrotoxicity. *J Lab Clin Med* 1981; 98:292-301.
- 10- Chahwala SB, Harpur ES. Gentamicin induced hypercalciuria in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol* 1983; 53:358-362.
- 11- Digiorgio J. Nonprotein nitrogenous constituents, p. 503-564. In Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW (ed), *Clinical chemistry: principles and techniques*, 2nd ed. Harper and Row Publishers, inc., New York, N.Y. 1974
- 12- Duc C, Farman N, Canessa CM, Bonvalet J-P, Rossier BC. Cell-specific expression of epithelial sodium channel, and subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localisation by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 1994; 127:907-921.
- 13- El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Taper HS, Cumps J, Tulkens P. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low doses of aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:665-675.
- 14- El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens P. GM-induced apoptosis in renal cell lines and Embryonic Rat Fibroblasts. *Tox Sciences* 2000; 56:229-239.
- 15- Elliott WC, Patchin DS. Effects and interactions of GM, polyaspartic acid and diuretics on urine calcium concentration. *J Pharm Exper Ther* 1995; 273:280-284.
- 16- Elliott C, Newman N, Madan A. GM effects on urinary electrolyte excretion in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67:16-21.
- 17- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A Caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391:43-50.
- 18- Finn WF, Luc J. Sodium restriction promotes apoptosis after renal ischemia in the rat. (abstract) *J Am Soc Nephrol* 1995; 6:978.
- 19- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119:493-501.
- 20- Gesek FA, Friedman PA. Mechanism of calcium transport stimulated by chlorothiazide in mouse distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 1992; 90:429-438.
- 21- Harpur ES, Fathalla SAK, Phipps DJ. Increased urinary excretion of calcium and magnesium is an early manifestation of gentamicin-induced nephrotoxicity in the rat. In *Renal Heterogeneity and Target Cell Toxicity*. ed. Bach, P.H. pp. 1985; 349-352. Chichester: John Wiley & Sons.
- 22- Ibrahim S, Clerckx-Braun F, Jacqmin P, Donnez J, Brulein V, Tulkens PM. Effect of the schedule of administration of two aminoglycosides, netilmicin and amikacin on urinary phospholipid excretion in humans, p. 93-97. In Bach PH, Gregg NJ, Wilks MF, Delacruz L (ed), *Nephrotoxicity: mechanisms, early diagnosis and therapeutic management*. Marcel Dekker, New York, N.Y. 1991.
- 23- Ibrahim S, Van der Auwera P, Meunier F, Tulkens PM. Effect of netilmicin and amikacin on urinary phospholipid excretion in humans. *Arch Toxicol* 1989; 13(Suppl.): 413-416.
- 24- Ishiaka R, Utsumi T, Yabuki M, Kanno T, Furuno T, Inoue M, Utsumi K. Activation of caspase-3-like protease by digitonin-treated lysosomes. *FEBS Lett*. 1998; 435:233-236.
- 25- Jaffé M. Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Z Physiol Chem* 1886; 10:391-400.
- 26- Jaffe R, Ariel I, Berri R, Paltiel O, Hiss Y, Rosen S, Brezis M. Frequent apoptosis in human kidneys after acute renal hypoperfusion. *Exp Nephrol* 1997; 5:399-403.
- 27- Kajstura J, Gigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Moll Cell Cardiol* 1997; 29: 859-870.
- 28- Kelnar CJH, Taor WS, Reynolds DJ, Smith DR, Slavin BM, Brook CGD. Hypomagnesaemic hypocalcaemia with hypokalaemia caused by treatment with high dose gentamicin. *Arch Dis Child* 1978; 53:817-820.
- 29- Kishore BK, Ibrahim S, Lambrecht P, Laurent G, Maldague P, Tulkens PM. Comparative assessment of poly-L-aspartic and poly-L-glutamic acids against GM- induced renal lysosomal phospholipidosis, phospholipiduria and cell proliferation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 262 : 424-432.
- 30- Lajeunesse D, Brunette MG. The hypocalciuric effect of thiazides: subcellular localization of the action. *Pflugers Arch* 1991; 417:454-462.
- 31- Laurent G, Carlier MB, Rollman B, Van Hoof F, Tulkens P. Mechanism of aminoglycoside-induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with GM and amikacin. *Biochem Pharmacol* 1982; 31:861-870.
- 32- Laurent G, Maldague P, Carlier MB, Tulkens P. Increased renal DNA synthesis in vivo after administration of low doses of gentamicin to rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24:586-593.
- 33- Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM. Aminoglycoside-induced phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1990; 40:383-392.
- 34- Loffing J, Loffing-Cueni D, Hegyi I, Kaplan MR, Herbert SC, Le Hir M, Kaissling B. Thiazide treatment of rats provokes apoptosis in distal tubule cells. *Kidney Int* 1997; 50: 180-190.
- 35- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
- 36- Luft FC, Kleit SA. Renal parenchymal accumulation of aminoglycoside antibiotics in rats. *J Infect Dis* 1974; 130:656-659.

- 37- Miao JY, Kaji K, Hayashi H, Araki S. Inhibitors of phospholipase promote apoptosis of human endothelial cells. *J Biochem* 1997; 121: 612-618.
- 38- Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:003-012.
- 39- Nakahama H, Shin S, Moriyama T, Kakihara M, Fukuhara Y, Orita Y, Kamada T. Enhancement of GM-induced inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rabbit renal proximal tubular brush-border membrane by furosemide. *Ren-Fail* 1989; 11:105-109.
- 40- Nakahama H, Fukuhara Y, Orita Y, Yamauchi A, Takama T, Kamada T. Furosemide accelerates GM accumulation in cultured renal cells (LLC-PK1 cells). *Nephron* 1989; 53:138-141.
- 41- Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S. Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 1994; 16:279-288.
- 42- Ortiz A, Lorz C, Catalán MP, Danoff TM, Yamasaki Y, Egido J, Neilson EG. Apoptotic regulatory proteins in renal injury. *Nephrology forum. Kidney Int* 2000; 58:467-485.
- 43- Parsons PP, Garland HO, Harpur ES, Old S. Acute GM-induced hypercalciuria and hypermagnesuria in the rat: dose-response relationship and role of renal tubular injury. *Br J Pharmacol* 1997; 122:570-576.
- 44- Parsons PP, Garland HO, Harpur ES. Localization of the nephron site of GM-induced hypercalciuria in the rat: a micropuncture study. *Br J Pharmacol* 2000; 130:441-449.
- 45- Rustenbeck I, Loipten D, Fricke K, Lenzen S, Reiter H. Polyamine modulation of mitochondrial calcium transport. II. Inhibition of mitochondrial permeability transition by aliphatic polyamines but not by aminoglycosides. *Biochem-Pharmacol* 1998; 56:977-995.
- 46- Sastrasinh M, Weinberg JM, Humes HD. The effect of gentamicin on calcium uptake by renal mitochondria. *Life Sci.* 1982; 30:309-315.
- 47- Schelling JR, Nkemere N, Kopp JB, Cleveland RP. Fas dependent fratricidal apoptosis is a mechanism of tubular epithelial cell deletion in chronic renal failure. *Lab Invest* 1998; 78: 813-824.
- 48- Solary E, Bertrand R, Kohn KW, Pommier Y. Differential induction of apoptosis in indifferent and differential HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood* 1993; 81:359-368.
- 49- Strange K. Ouabain-induced cell swelling in rabbit cortical collection tubule. NaCl transport by principal cells. *J Membr Biol* 1989; 107:249-261.
- 50- Thomas GL, Yang B, Wagner BE, Savill J, El Nahas AM. Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:216-226.
- 51- Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM, Johnson RJ. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney-International* 1998; 53:897-908.
- 52- Tsukidate K, Ymamoto K, Snyder JW, Farber JL. Microtubule antagonists activate programmed cell death (apoptosis) in cultured rat hepatocytes. *Am J Pathol* 1993; 143:918-925.
- 53- Tulkens P, Trouet A. The uptake and intracellular accumulation of aminoglycoside antibiotics in lysosomes of cultured rat fibroblasts. *Biochem Pharmacol* 1978; 27:415-424.
- 54- Tulkens PM. Nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics. *Toxicol. Lett.* 1989; 46:107-123.
- 55- Velazquez H, Knauf H, Mutschler E. Thiazide diuretics, in *Diuretics*, edited by Greger RF, Knauf H, Mutschler E, Berlin, Springer-Verlag, 1995; p275.
- 56- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96:245-249.
- 57- Watson A, Holohan PD, Ross CR. Severe hypomagnesaemia and hypocalcaemia following gentamicin therapy. *Ir Med J* 1983; 76: 381-383.
- 58- Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:156-160.
- 59- Zaloga GP, Chernow B, Pock A, Wood B, Zaritsky A. Hypomagnesaemia is a common complication of aminoglycoside therapy. *Surg. Gynaecol Obstet* 1984; 158:561-565.

**PROFIL CLINIQUE ET BIOLOGIQUE DES NOUVEAUX CAS DE
TUBERCULOSE PULMONAIRE BACILLIFERE AU CENTRE NATIONAL
HOSPITALIER DE PNEUMO-PHTISIOLOGIE DE COTONOU**



AGODOKPESSI G*, ADE G*, ADE S*, ADJOBIMEY M*, AWANOU B*, AKPONA R*, GUENDEHOUB*, KASSA F*, AFFOLABI D*, ANAGONOU S*, GNINAFON M*

*Centre National Hospitalier de Pneumo-Phtisiologie, Faculté des Sciences de la santé, Cotonou, République du Bénin.

Auteur correspondant : Dr Gildas AGODOKPESSI, Pneumo-Phtisiologue-
Assistant.01 BP 321, +229 21 33 15 33; +229 97 58 21 23; aggildas@yahoo.fr

RESUME

Une analyse rétrospective et descriptive des dossiers de 776 patients enregistrés entre le 1^{er} janvier et le 31 décembre 2008 a permis de dégager le profil clinique et biologique des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire.

Le délai moyen de consultation rapporté était de 3 mois avec des extrêmes de 15 jours et 4 ans ; la symptomatologie clinique était très expressive. La charge bacillaire était forte de 10 à 99 BAAR/champ microscopique en moyenne. La séroprévalence au VIH était de 18%. Dans 97% des cas, le sérotype VIH1 est retrouvé.

L'accent devra être mis sur la sensibilisation pour un diagnostic précoce, qui permettra la rupture de la chaîne de contamination.

Mots-clés : tuberculose-nouveaux cas- délai de consultation-charge bacillaire-Cotonou

ABSTRACT

A retrospective and descriptive records of 776 patients registered between 1 January and 31 December 2008 has identified the clinical and biological profile of new cases of pulmonary tuberculosis. The mean time from reported is 3 months with extremes of 15 days and 4 years, the clinical symptoms was very expressive. The bacillary load is strongly positive at 10-99 AFB / microscopic field. The HIV seroprevalence is 18%. In 97% of cases, HIV-1 serotype was found.

Emphasis should be placed on awareness for early diagnosis, which will break the chain of infection.

Keywords : Tuberculosis-new case consultation period-bacillary load-Cotonou.

INTRODUCTION

L'endémie tuberculeuse reste un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne [9]. Au Bénin, pour l'année 2008, 5499 cas toutes formes confondues ont été diagnostiqués, ce qui représente un taux de détection toutes formes confondues de 46 pour 100.000 habitants. [7].

Le Centre National Hospitalier de Pneumo-Phtisiologie (CNHPP) de Cotonou est le centre national de référence de prise en charge de la tuberculose au Bénin. Sur les 3977 cas toutes formes enregistrées en 2008, au Bénin, près de 30% (1118 cas) y ont été diagnostiqués [7]. Le contrôle de l'endémie passe par la maîtrise de la forme bacillifère qui est responsable de la transmission de la maladie dans la communauté. Une meilleure connaissance du profil clinique et biologique de la tuberculose pulmonaire bacillifère nous paraît capitale, ce d'autant plus que à notre connaissance en dehors des rapports du

Programme National contre la tuberculose, aucun travail scientifique n'a été consacré à ce sujet. C'est donc pour ces raisons que nous avons cherché à évaluer le profil clinique et biologique des nouveaux cas bacillifères au CNHPP.

MATERIEL ET METHODES

Type et cadre de l'étude

Nous avons mené une étude descriptive rétrospective portant sur tous les patients présentant un premier épisode de tuberculose pulmonaire bacillifère et enregistrés dans le registre de la tuberculose au CNHP-P. Il s'agissait de patients enregistrés entre le 1^{er} janvier 2008 et le 31 Décembre 2008.

Critère d'inclusion

Étaient inclus dans l'étude tous les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire prouvée par la présence des bacilles acido-alcoolo-résistants à l'examen direct des expectorations.

Critères d'exclusion

Étaient exclus de l'étude : les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire bacillifère d'âge inférieur à 15ans, les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire non bacillifère, les cas de tuberculose extra pulmonaire et les patients ayant un antécédent de traitement antituberculeux.

Procédure de collecte de données

À partir du registre de la tuberculose et des dossiers des patients, nous avons relevé les données sociodémographiques, le délai diagnostique, les symptômes cliniques.

La bacilloscopie au diagnostic est affirmée sur la positivité de 2 au moins des 3 échantillons d'expectorations recueillies en 2 jours. Le résultat retenu est celui de la positivité la plus forte qui est présentée de la façon suivante :

+/- : moins de 1 BAAR/champ microscopique mais plus de 5 BAAR sur la lame

+ : 1 à 9 BAAR/champ microscopique

++ : 10 à 99 BAAR/champ microscopique

+++ : Plus de 100 BAAR/champ microscopique.

Le délai diagnostique est la durée écoulée entre le début de la toux et le moment où le diagnostic était établi.

Analyse statistique

Les données ont été analysées grâce au logiciel EPI DATA, version 2; la comparaison des variables qualitatives a été faite grâce au test de chi², la différence était significative lorsque $p < 5\%$.

RESULTATS

Des 1118 cas de tuberculose toutes formes confondues enregistrés, 776 nouveaux cas bacillifère ont été diagnostiqués. Ils représentaient 69% des cas de tuberculose toutes formes confondues.

2.1. Caractéristiques sociodémographiques

Age et Sexe:

La tranche d'âge la plus atteinte était celle des 25 à 34 ans (38,3 %) L'âge moyen des patients était de 33 ans (les extrêmes étaient 15ans et 80ans). Les hommes étaient deux fois plus atteints que les femmes (518 contre 238). Le sex ratio était de 2, 18.

2.2. Données cliniques

2.2.1. Délai de consultation rapporté :

Sur les 612 dossiers qui étaient correctement remplis pour cet item, la répartition des délais de consultation est représentée dans la figure N°1.



Figure N°1 : Répartition des patients suivant le délai de consultation rapporté.

Le délai moyen de consultation était de 3 mois avec des extrêmes de 15 jours et 4 ans. On n'a pas noté de différence ni entre les sexes, ni pour le statut VIH pour ce délai.

2.2.2. Symptomatologie :

La toux était la principale symptomatologie (87% des cas). Un contexte d'altération de l'état général avec amaigrissement était retrouvé dans 83 %. La fièvre était présente dans 71 % des cas. Les différents signes retrouvés sont mentionnées dans la figure N°2.

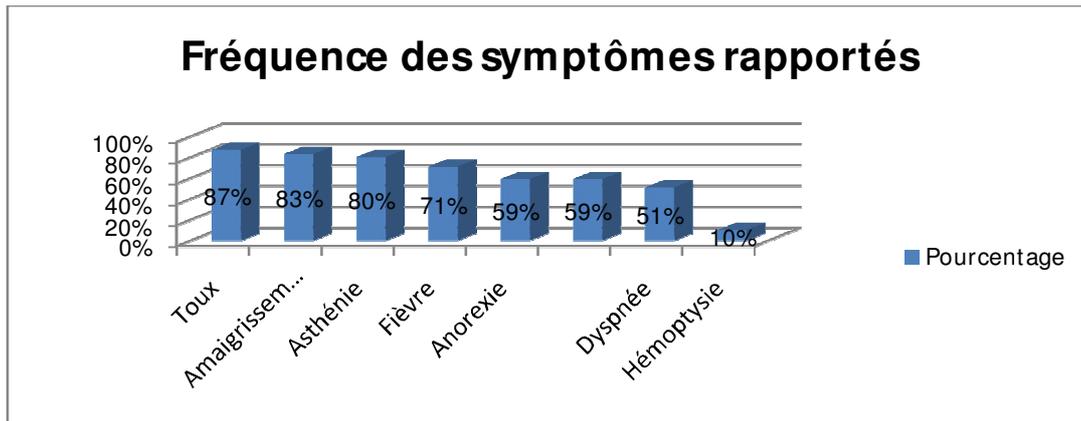


Figure N°2 : Répartition des patients suivant la fréquence des symptômes.

2.3. Données biologiques

2.3.1. Charge bacillaire et sérologie VIH:

766 patients ont été pris en compte pour l'analyse de la bacilloscopie et de la sérologie. Dans près de la moitié des cas (48%), la charge bacillaire était comprise entre 10 et 99 BAAR/champ microscopique.

Le nombre de co-infectés était de 137, la séroprévalence au VIH était de 18% (14% chez les hommes et 26% chez les femmes $p=0,0002$).

2.3.2. Type de Virus : Le VIH1 était le sérotype le plus retrouvé : 97% (133/137) des patients ; seulement trois (03) patients étaient infectés au VIH2, et 1 cas qui était infecté par les deux sérotypes à la fois.

La charge bacillaire en fonction du statut VIH est indiquée sur la figure N°3.

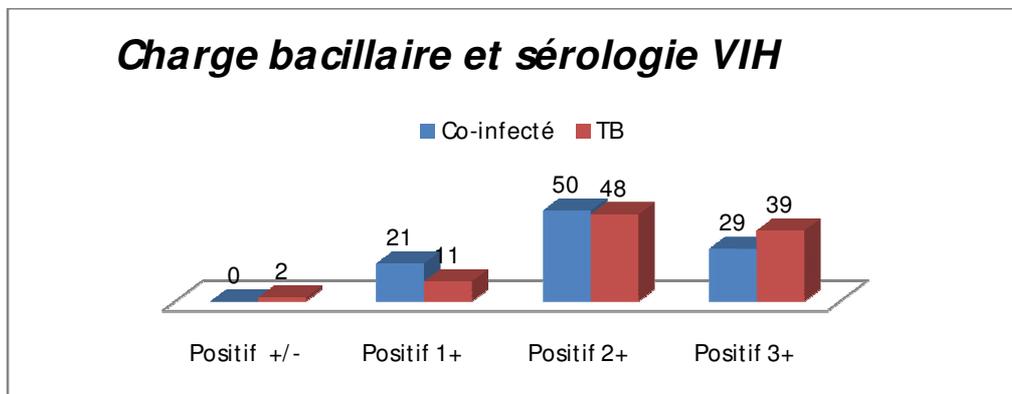


Figure N°3 : Charge bacillaire en fonction du statut VIH

La charge bacillaire chez les co-infectés ne diffère pas de celle des tuberculeux. ($p=0,0025$).

DISCUSSION

Ce travail a permis d'établir le profil clinique et biologique des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire bacillifère admis au CNHPP qui à lui seul concentre près du tiers des patients du pays.

Le caractère rétrospectif de l'étude n'a pas permis d'avoir la totalité des données des patients inclus pour certaines variables recherchées. Mais il faut préciser que pour toutes ces variables, dans tous les cas au moins 80% les données ont été disponibles et exploitées.

Néanmoins notre étude a le mérite de prendre en compte un nombre important de patients, tout au moins au regard de ceux de la littérature disponible ; Ceci permet, d'une part à nos résultats de gagner en puissance statistique et de pouvoir être généralisés à l'ensemble du pays puis dans un second temps d'être comparés à ceux retrouvés ailleurs.

Le délai rapporté entre l'apparition de la toux et le diagnostic est de 3 mois en moyenne avec

des extrêmes de 15 jours et 4ans. Ce délai pourrait être sous estimé vu que les patients n'avaient consulté que lorsqu'il y avait une altération de l'état général : 83% avaient un amaigrissement et 80%, une asthénie physique.

Ce retard au diagnostic a été souligné dans la plupart des travaux en Afrique subsaharienne ; 3,9 mois au Sénégal [5] et 7,7 mois au Ghana [4] et au Malawi [6].

Près de la moitié de nos patients (48%) au moment du diagnostic étaient hautement contagieux et avaient une charge bacillaire comprise entre 10 et 99 BAAR/champ microscopique. Ce long délai est associé à une forte transmission de la maladie [2]; La réduction de ce délai devra être la priorité pour la réduction de la transmission dans la communauté. Une étude ultérieure pourrait être initiée pour établir la part des patients et celle du système de santé.

La classique prédominance masculine de la tuberculose a été retrouvée dans notre travail. Les hommes étaient deux fois plus atteints que les femmes (518 contre 238), soit un sex ratio de 2, 18. Ce constat a été retrouvé dans d'autres pays d'Afrique subsaharienne [4, 5,6].

CONCLUSION

Les délais de consultation observés sont longs, la symptomatologie clinique est expressive, la charge bacillaire est forte. Plus du quart (18%) des nouveaux cas de tuberculose sont co-infectés au VIH. Eu égard à tout ce qui précède, l'accent doit être mis sur la sensibilisation pour un diagnostic précoce, qui permettra la rupture de la chaîne de contamination.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1-DEWAN P.K, GUPTA D, WILLIAMS B.G, THAKUR R, BACHANI D, KHERA A, WARES D.F, SAHU S, REDDY D.C.S, RAIZADA N, CHAUHAN L.S. National estimate of HIV seroprevalence among tuberculosis patients in India. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14(2): 247-249
- 2-GOLUB JE, BUR S, CRONIN WA, GANGE S, BARUCH N, COMSTOCK W CHAISSON RE. Delayed tuberculosis diagnosis and tuberculosis transmission. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006 ; 10 : 24-30.
- 3- HARGREAVES N.J., KADZAKKUMANJA O., PHIRI S., NYANGULU D.S., SALANIPONI F.M.L.,* HARRIES A.D., SQUIRE S.B. What causes smear-negative pulmonary tuberculosis in Malawi, an area of high HIV seroprevalence ?" *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(2) : 113-122.
- 4-LAWN SD, AFFUL B, ACHEAMPONG JW. Pulmonary tuberculosis: diagnosis delay in Ghanaian adults. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998 ; 2 : 635-40.
- 5-MBATCHOU NGAHANE B.H., DIATTA A., TOURE N.O., DIA KANE Y., BA DIOP S., NDIAYE E.H.M., NIAN A. SAH BELINGA G, A., AGODOKPESSI G, NGAKOUTOU R., THIAM K., HANE A.A. Profil clinique, biologique et radiologique des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire au Centre Hospitalier Universitaire de Fann-Dakar. *Rev Mal Respir* 2008 ; 25 : 22-6
- 6-NKHOMA WA, HARRIES AD, WIRIAMA JJ. Pulmonary tuberculosis in Malawian adults: why the delay in diagnosis ? *J Med Assoc Malawi* 1988 ; 5 : 22-3.
- 7-PROGRAMME NATIONAL CONTRE LA TUBERCULOSE, DNPS, MSP, BENIN. RAPPORT ANNUEL 2008. Mars 2009, 34p.
- 8- SAMB B.,* SOW P.S., KONY S., MAYNART-BADIANE M., DIOUF G, CISSOKHO S, BA D., SANE M., KLOTZ F, FAYE-NIANG M.A., MBOUP S, NDOYE I, DELAPORTE E, HANE A.A., SAMB A., COULAUD J.-P., COLL-SECK A.M., LAROUZE B.,* MURRAY J.F. "Risk factors for negative sputum acid-fast bacilli smears in pulmonary tuberculosis: results from Dakar, Senegal, a city with low HIV seroprevalence" *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3(4) : 330-336.]
- 9-WHO. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2009: Global Tuberculosis Control: epidemiology, strategy, financing. Geneva, World health Organization, 2009 WHO/HTM/TB/2009.411. ISBN 978 92 4 156380 2: 314p.

La charge bacillaire chez les co-infectés ne diffère pas celle des tuberculeux, alors qu'il est d'usage de constater qu'elle soit faible voire négative chez les co-infectés [2, 8]. Une corrélation de la charge bacillaire avec le dosage des lymphocytes CD4 circulant aurait permis de mieux expliquer cet état de choses.

Néanmoins, il convient de mentionner que le CNHP-P en tant que structure nationale de référence, concentre les meilleurs microscopistes et les plus entraînés dans la réalisation de la bacilloscopie. Cet état chose pourrait expliquer cette différence de nos résultats avec ceux retrouvés ailleurs.

La prévalence de la co-infection dans notre série (18%) était plus basse que celles retrouvées dans d'autres capitales d'Afrique subsaharienne qui sont respectivement de 22%, 23% et 40% pour Accra au Ghana, Ouagadougou au Burkina Faso et Douala au Cameroun [9]. Des prévalences plus élevées ont été retrouvées au Botswana (68%) [9].

Cette prévalence dans notre travail est supérieure à celui de DEWAN à New Delhi en inde qui est de 4,85% [1].

**LES CELLULES RONDLES DU SPERME ET INFERTILITE MASCULINE AU
CHU TOKOIN DE LOME TOGO**



FOLLIGAN K. (1), ANOUKOUM T. (2), ABOUBAKARI S. (3), FETEKE L (4),
ADAMA-HONDEGLA A. B. (5), DAGNRA A. (6), BOUKARI B.S. (1)

- (1) Service d'Histologie – Embryologie – Cytologie et Biologie de la Reproduction. CHU Tokoin – Lomé – Togo. B.P. 57
(2) Service d'Urologie. CHU Tokoin – Lomé – Togo. B.P. 57
(3) Clinique de Gynécologie et d'Obstétrique. CHU – Kara – Togo.
(4) Centre Nationale de transfusion sanguine de Lomé-Togo, BP 20707
(5) Clinique de Gynécologie et d'Obstétrique. CHU Tokoin – Lomé – Togo. B.P. 57
(6) Laboratoire de Bactériologie-Virologie. CHU Tokoin – Lomé – Togo. B.P. 57

Correspondance :

Dr Koué FOLLIGAN. Service d'Histologie-Embryologie, Cytologie et Biologie de la Reproduction. CHU Tokoin. B.P. 57 Lomé, Togo.
Téléphone : 00228 914 15 40 (portable) / 00228 221 29 65 (fixe). Email : folliganfrederic@yahoo.fr

RESUME

Introduction et objectifs

Le présent travail est une évaluation de la concentration élevée de cellules rondes et sa relation avec les autres paramètres du sperme au CHU Tokoin de Lomé Togo. Ce travail a eu pour objectifs

- de recenser les différentes anomalies du sperme en présence d'une concentration de cellules rondes supérieure à 3×10^6 / mL de sperme
- et d'analyser la relation entre ces anomalies et les cellules rondes.

Résultats

La concentration de cellules rondes supérieure à 3×10^6 / mL de sperme était de 26,03 %. Cette élévation de la concentration de cellules rondes était corrélée avec les anomalies des différents paramètres du sperme. La corrélation est partout négative et significative. L'élévation de la concentration des cellules rondes est associée donc à une diminution du volume du sperme et de la numération, de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes.

Conclusion

L'élévation de la concentration des cellules rondes du sperme est associée à une diminution du volume du sperme, de la numération, de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes. Les facteurs qui induisent une élévation de concentration de ces cellules pourraient réduire le pouvoir fécondant du sperme.

Mots clés: Sperme, infertilité masculine, cellules rondes, Lomé, Togo

SUMMARY

Introduction and objectives

The present labour is an evaluation of the concentration raised of round cells and its relation with the other parameters of the semen in CHU Tokoin of Lomé Togo. This labour had for objectives

- to count the different anomalies of the semen in presence of a concentration of cells round superior to 3×10^6 / mL of semen;
- and to analyse the relation between these anomalies and the round cells.

Results

The concentration of cells round superior to 3×10^6 / mL of semen was 26,03%. This elevation of the concentration of round cells was correlated with the anomalies of the different parameters of the semen. The correlation is everywhere negative and meaningful. The elevation of the concentration of the round cells is therefore associated to a reduction of the volume of the semen and the numeration, the mobility and the morphology of the spermatozoons.

Conclusion

The elevation of the concentration of the round cells of the semen is associated to a reduction of the volume of the semen, the numeration, the mobility and the morphology of the spermatozoons. The factors which induce an elevation of concentration of these cells could reduce the power of fecundity of the semen.

Keys words: Semen, masculine infertility, round cells, Lomé, Togo

INTRODUCTION

Toute investigation de la fertilité masculine commence par l'étude des caractéristiques fonctionnelles du sperme [1]. Dans les comptes rendus de spermogrammes, on mentionne la présence de cellules rondes. Ces cellules rondes comprennent les cellules germinales immatures, les leucocytes et les cellules épithéliales desquamées des voies génitales [1].

La prévalence et la signification des cellules rondes dans le sperme sont sujet de controverses en raison des différences entre les populations étudiées [2-3]. Des études ont montré les effets des leucocytes et des cellules germinales immatures sur les paramètres du sperme [4-6]. Belmekki, en France, a montré qu'une concentration élevée de cellules rondes réduit le pouvoir fécondant du sperme [7]. Certains auteurs [8-9] ont trouvé que la présence des leucocytes avait une influence négative sur les paramètres du sperme alors que d'autres [10-11] ne trouvent aucune relation entre leucocytes et infertilité masculine. Les cellules germinales immatures, par contre, en nombre élevé, joueraient un rôle fondamental dans la genèse des anomalies des spermatozoïdes [12].

Les données en rapport avec l'étude des cellules rondes du sperme sont absentes au Togo. Nous avons entrepris la présente étude destinée à évaluer la prévalence d'une concentration élevée de cellules rondes et sa relation avec les autres paramètres du sperme.

CADRE

Notre étude a eu pour cadre le service d'Histologie Embryologie Cytologie et Biologie de la Reproduction du CHU Tokoin de Lomé. Ce service de référence nationale reçoit des patients pour des problèmes andrologiques, des patientes pour des problèmes gynécologiques et des couples infertiles provenant de l'ensemble du territoire togolais et de la sous-région ouest-africaine.

RESULTATS

Prévalence

Durant la période de l'étude, 1563 patients ont réalisé le spermogramme. Les cellules rondes avaient une concentration supérieure à 3×10^6 / mL de sperme dans 407 cas, soit 26,03 %. La concentration de cellules rondes variait de 4×10^6 / mL à 30×10^6 / mL de sperme. La concentration moyenne était de $7,5 \times 10^6$ / mL.

MATERIEL

Le matériel de l'étude était constitué par des comptes rendus d'étude de sperme de patients ayant consulté pour infertilité. Ces spermes étaient recueillis au laboratoire par masturbation et après trois jours d'abstinence sexuelle. Le sperme était recueilli dans un réceptacle en polystyrène gradué et gardé à la température ambiante. L'analyse du sperme était débutée 30 minutes après l'émission et était réalisée par le même technicien. La numération des spermatozoïdes était faite grâce à un hémocytomètre de Nageotte. L'étude de la morphologie des spermatozoïdes était réalisée après coloration par le colorant de Shorr. Aucune coloration spéciale n'a été réalisée dans le but d'analyser les types de cellules rondes.

METHODE

Cette étude a été rétrospective et analytique sur une période de 5 ans (janvier 1997 à décembre 2001). Les comptes rendus de spermogrammes qui indiquaient plus de 3 millions de spermatozoïdes ont été considérés. La collecte des données a été manuelle. Les données recueillies ont été consignées sur fiches préétablies.

Les paramètres étudiés ont été :

- le volume et les cellules rondes du sperme,
- la numération, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes.

L'analyse des données a été statistique et informatisée. L'exploitation des données a été faite sur les logiciels EPI INFO et SPSS (Statistical Parckage for Social Sciences) au centre de Statistiques de Lomé.

Le coefficient de corrélation (r) a été utilisé pour analyser les relations entre l'élévation de la concentration des cellules rondes et les paramètres étudiés. Le degré de confiance (p) était fixé à 5 %. La signification des corrélations était acceptée pour $p < 0,05$.

Corrélations entre cellules rondes, sperme et spermatozoïdes

Elles sont retrouvées dans les différents tableaux ci-après :

Tableau 1 : Répartition des anomalies de volume du sperme selon les concentrations de cellules rondes

Concentration de cellules rondes ($\times 10^6 / \text{mL}$)	Nombre de cas	Fréquences (%)
[04 – 06 [24	45,28
[06 – 08 [15	28,30
[08 – 10 [06	11,32
[10 – 12 [02	03,78
[12 – 30 [06	11,32

$r = - 0,5997$ $p < 0,0001$

Tableau 2 : Répartition des anomalies de numération des spermatozoïdes selon les concentrations de cellules rondes

Concentration de cellules rondes ($\times 10^6 / \text{mL}$)	Nombre de cas	Fréquences (%)
[04 – 06 [18	60,00
[06 – 08 [02	06,67
[08 – 10 [02	06,67
[10 – 12 [01	03,33
[12 – 30 [07	23,33

$r = - 0,2049$ $p < 0,0001$

Tableau 3 : Répartition des anomalies de mobilité des spermatozoïdes selon les concentrations de cellules rondes

Concentration de cellules rondes ($\times 10^6 / \text{mL}$)	Nombre de cas	Fréquences (%)
[04 – 06 [17	58,62
[06 – 08 [09	31,10
[08 – 10 [01	3,44
[10 – 12 [01	3,44
[12 – 30 [01	3,44

$r = - 0,6555$ $p < 0,0001$

Tableau 4 : Répartition des anomalies de morphologie des spermatozoïdes selon les concentrations de cellules rondes

Concentration de cellules rondes ($\times 10^6 / \text{mL}$)	Nombre de cas	Fréquences (%)
[04 – 06 [168	48,13
[06 – 08 [115	33
[08 – 10 [026	7,44
[10 – 12 [019	5,44
[12 – 30 [021	6,01

$r = - 0,6809$ $p < 0,000$

DISCUSSION

Notre étude, rétrospective et hospitalière portant sur des patients infertiles, ne peut être exhaustive et représentative du milieu togolais. Elle ignore les personnes fertiles ou infertiles qui n'ont pas réalisé de spermogramme dans le cadre de l'étude. Elle permet cependant d'avoir une approche de la prévalence et de l'impacte de l'élévation des cellules rondes dans les spermatozoïdes de personnes infertiles.

Le seuil d'élévation des cellules rondes varie d'une étude à une autre. Ce seuil est de $2,5 \times 10^6 / \text{mL}$ dans l'étude de Belmeki [2] et de $3 \times 10^6 / \text{mL}$ pour l'OMS [13]. L'absence de colorations spéciales n'a pas permis une

analyse des corrélations avec les différents types de cellules rondes.

Dans notre étude la prévalence d'une concentration de cellules rondes supérieure à $3 \times 10^6 / \text{mL}$ de sperme était de 26,03 %. Cette élévation de la concentration de cellules rondes était corrélée avec le volume du sperme, la numération, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes. La corrélation était partout négative et significative. L'élévation de la concentration des cellules rondes était associée donc à une diminution du volume du sperme de la numération, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes. Arata [12] est parvenu aux

mêmes résultats concernant la mobilité ($r = - 0,205$) et la morphologie des spermatozoïdes ($r = - 0,231$). Caldamone [14], étudiant la relation avec les leucocytes, a noté une corrélation, comme dans notre étude, négative avec la numération, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes. Caskurlu [5], avec les cellules germinales immatures, a trouvé une corrélation significative ($p < 0,0001$) positive avec la numération ($r = + 0,56$), et négative avec la mobilité ($r = - 0,60$) et la morphologie ($r = - 0,71$) des spermatozoïdes. Zbell [15], dans une étude similaire, a trouvé une corrélation négative significative ($r = - 0,07$; $p < 0,05$) avec le volume du sperme et une

corrélation positive ($r = + 0,048$; $p < 0,05$) avec la numération des spermatozoïdes.

La cause de ces variations pourrait être liée à la subjectivité de l'appréciation des paramètres du sperme. La quantification des paramètres dépend du technicien, de la durée d'abstinence sexuelle et des conditions de prélèvement du sperme [1].

Les variations des corrélations peuvent résulter aussi de l'action de l'âge et de certains facteurs tels que le tabac, l'alcool, les infections génitales et l'abstinence sexuelle prolongée. Ces facteurs induiraient un afflux leucocytaire dans le sperme [12].

CONCLUSION

L'élévation de la concentration des cellules rondes du sperme est associée à une diminution du volume du sperme, de la numération, de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes. Les facteurs qui induisent une élévation de concentration de ces cellules pourraient réduire le pouvoir fécondant du sperme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - Guerin J.F. Le sperme normal. *Rev. Prat* 1993 ; 43 (8) : 932-5
- 2 - Kung AWC., Aitken RJ., West K. ; Buckinham D. Leukocytic infiltration in the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. *J. Androl* 1994 ; 15 : 343 – 52.
- 3 - Politch JA., Wolff H. Hill JA., Anderson DJ. Comparision of méthodes to enumerate white blood cells in semen. *Fertil steril* 1993; 60 : 372 - 5.
- 4 - Fedder J. Nonsperm cells in human semen : with special reference to seminal leukocytes and their possible influence of fertility. *Arch Andro.l* 1996 ; 36 : 41 - 65.
- 5 - Caskurlu T., Tasci AI., Bayraktar Z., Cek M., Sevin G. Immature germ cells in the semen and their correlation with other semen parameters. *Int urol Nephrol* 1999 ; 31 (3) : 389 – 93.
- 6 - Aitken RJ., Buckingham D., West K., Wu FC., Zikopoulos K., Richarson DW . Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygene species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors *J. Reprod. Fertil* 1992 ; 94 : 451 – 61.
- 7 - Belmekki M., Cranz C., Clavert A. Mise en évidence des cellules inflammatoires dans le sperme *Androl* 1995 ; 5 (4) : 548-54
- 8 - Thomas J., Fishel SB., Hall JA., Green S., Newton TA., Thornton ST. Polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology *Hum Reprod.* 1997 ; 12 : 2418 – 21.
- 9 - Wolff H., Politch JA., Martinez A., Haimovici F., Hill JA., Anderson DJ. Leukocytospermia is associated with poor semen quality *Fertil steril* 1990; 53: 528–36.
- 10 - Tomlinson MJ., Barratt CL., Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocytes subpopulations in semen suggest they are not a cause of male infertility *Fertil steril* 1993 ; 60 : 1069 - 75.
- 11 - Tomlinson MJ., White A., Barratt CL., Bolton AE., Cooke ID. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes : a positive role for seminal leukocytes ? *Hum Reprod* 1992 ; 7 : 517 – 22.
- 12 - Arata de Bellabarba G., Tortolero I., Villarreal V., Zoraida Molina C. Nonsperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. *Arch Androl* 2000 ; 45 : 131 – 3
- 13 - World Health Organization . Laboratory manual for the examination of semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge, UK. Cambridge University Press 1992
- 14 - Caldamone A.A., Emilson L.BV., Al-Juburi., Cockett A.T.K Prostatitis : prostqtic secretory dysfunction affecting fertility. *Fertile. Steril.* 1980; 34 . 602 - 3.
- 15- Zbell., P.J. Kattan, M.W., Lipshultz., L.I., Lamb, D. Coburn M. Semen leukocytes and Immature germ cells: Their relationship to each other and to bulk semen parameters. Annual Meeting 1995

**ACCIDENTS D'EXPOSITION AU SANG (AES) EN MATERNITE AU
SUD DU BENIN
FREQUENCE, PREVENTION ET CONNAISSANCES PRATIQUES**



ADISSO S.*,HOUEJISSIN S.*,HOUNDEFFO T.*, GNANSOUNOU F.*, ADIS-
SO E. L.***, PERRIN R-X.**, ALIHONOU E.*

*Clinique Universitaire de Gynécologie-Obstétrique (CUGO). 01 BP 1822 Cotonou

**Hôpital de la Mère et de L'Enfant Lagune (HOMEL). 01 BP 157 Cotonou

***Service de radiologie et d'Imagerie Médicale, CNHU « HKM » Cotonou

Correspondance : Sosthène ADISSO, Faculté des Sciences de la Santé, 03 BP 2855-Cotonou
Email : sosadiss@yahoo.fr

RESUME

Les accidents d'exposition au sang (AES) représentent pour les prestataires de soins, des risques majeurs de transmission d'infections graves. Qu'en est-il de leur fréquence, des mesures préventives adoptées et des connaissances pratiques des prestataires en cas d'AES, dans les maternités au sud du Bénin ? L'étude s'est déroulée dans cinq maternités au sud du Bénin et a porté sur 62 prestataires. Elle a été transversale, descriptive et analytique et s'est déroulée du 1^{er} janvier au 31 mars 2004. Les données ont été collectées à l'aide de questionnaires préétablies sur la survenue de ces accidents, la connaissance des prestataires et les moyens de prise en charge des accidents. Nous avons abouti aux résultats suivants : deux prestataires sur trois (67,7%) connaissent les AES, alors que leur fréquence est de 77%. Les accidents se sont produits principalement au cours des accouchements (25,7%). Dans cette circonstance, nous avons recensé les accidents par piqûre (48%), la projection de sang ou autres liquides organiques dans les yeux (50%), sur la peau et les autres muqueuses (56,2%). Les lunettes sont les barrières les moins portées, 21% ; les raisons avancées pour l'absence de protection sont la négligence et surtout la non disponibilité. Le protocole complet de prise en charge des AES est mal perçu par la majorité des prestataires. L'insuffisance constatée entre la connaissance des accidents d'exposition au sang et l'application des mesures préventives par les prestataires nécessite la mise en œuvre d'un recyclage et la fourniture effective des moyens de protection.

Mots clés : accident d'exposition au sang, prévention, maternité.

SUMMARY: Occupational Exposure to Blood and Body Fluids in the maternities in South of Benin: Frequency, prevention and practical knowledge.

The occupational exposure to blood and body Fluids represent for Health care workers some major risks of transmission of serious infections. What is it about their frequency, some preventive measures adopted, and some practical knowledge of health care workers in case of occupational exposure to blood and body fluids in maternities in the south of Benin? The study has been carried out in five maternities in the south of Benin and involved sixty-two (62) health care workers. It has been transversal, descriptive and analytical from 1st January to 31 March, 2004. The data have been collected with the help of questionnaire pre-established with the happening of these accidents, the practical knowledge about health care workers and the available means in order of taking care of accidents. We have come out with the following results: Two health care workers out of three (66.77%) know about occupational exposure to blood and body fluids whereas their frequency is of 77%. The accidents were mainly occurred during deliveries (25.7%). In these circumstances, we have recorded needles sticks injuries (48%), body fluid splashing to the eyes (50%), on the skin and other mucous membrane (56.2%). The wearing of glasses is the barriers the less attacked (21%), the advanced reasons for the absence of protection are related to negligence, and chiefly to the lack of materials. The complete protocol of the taking care of occupational exposure to blood and body fluids is not well perceived by the majority of health care workers. The insufficiency noticed between the knowledge of occupational exposure to blood and body fluids and the application of preventive measures by the health care workers necessitates the putting in place of a recycling and the effective supply of means of protection.

Key-words: Occupational exposure to blood and body fluids, prevention, maternity

INTRODUCTION

Les accidents d'exposition au sang ou autres liquides biologiques constituent un sujet de grande préoccupation pour les agents de santé et présentent un risque majeur de transmission d'infections graves telles que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de l'hépatite B (VHB) et le virus de l'hépatite C (VHC). Le rapport 2002 de l'OMS [1] sur la réduction des risques et la promotion de la santé relève que 2,5% des cas de HIV et 40% des cas d'hépatite B et C touchant les agents de santé, sont le résultat d'un accident d'exposition au sang. Plusieurs études ont été réalisées au Bénin sur les accidents d'exposition au sang mais aucune n'a abordé spécifiquement l'importance de ces fléaux dans les maternités de notre pays. Il nous apparaît alors opportun d'apprécier leur fréquence, les connaissances pratiques des prestataires en cas d'AES et les mesures préventives adoptées en cas d'AES, dans les maternités de référence au sud du Bénin

MATERIEL ET METHODES

Il s'agit d'une étude descriptive transversale et analytique des accidents d'exposition au sang survenus dans les maternités de référence de l'atlantique et du littoral au cours de la période de trois mois allant du 1^{er} janvier au 31 mars 2004. Dans une première étape d'un mois, nous avons sillonné les maternités pour rencontrer les prestataires qui y sont employés. Ensuite, nous leur avons distribué les questionnaires que nous sommes revenus chercher au bout d'un mois. Nous avons utilisé une méthode non probabiliste pour sélectionner les maternités et les prestataires de soins. Les maternités publiques ou confessionnelles du département de l'atlantique et du littoral disposant d'un bloc opératoire ont été incluses. L'enquête a été orientée vers les prestataires, gynécologues-obstétriciens, sages-femmes, infirmiers, aides-soignantes et agents d'entretien, exerçant dans lesdites maternités, disponibles et consentants. Chaque maternité retenue comporte un bloc technique avec une salle de dilatation, une salle d'accouchement et un bloc opératoire, un secteur de consultation et un secteur d'hospitalisation. L'autorisation des autorités politico-administratives et sanitaires a été obtenue au préalable ; le respect de l'anonymat a été observé ; aucune contrainte n'a été imposée aux enquêtés et la confidentialité des données recueillies a été assurée.

Durant cette étude nous avons été confrontés à des difficultés empêchant l'observation de

tous les prestataires et liées à leur mobilité entre les différents secteurs, à leur absence pour raison de congé ou de maladie ou encore au non consentement.

Cinq maternités de référence répondaient à nos critères d'inclusion. Il s'agit par ordre décroissant d'importance d'activité, de l'hôpital de la mère et de l'enfant lagune (HOMEL), de la clinique universitaire de gynécologie et d'obstétrique (CUGO), de la maternité de l'hôpital Saint Luc, de la maternité du centre de santé de Menontin, et de la maternité de l'hôpital de zone de Ouidah-Kpomassè-Tori Bossito.

Les variables suivantes ont été étudiées : la fréquence des AES (variable dépendante), les connaissances des prestataires sur les AES, la protection des prestataires de soins, les mesures à prendre en cas d'AES, le type d'AES, la circonstance de survenue, l'observance des normes en matière de prévention (variables indépendantes). Les données recueillies ont été vérifiées, décodées et analysées à l'aide du logiciel EPI INFO 6.

RESULTATS

Au cours des 3 mois qu'a duré notre étude, sur 200 prestataires prévus pour remplir les fiches d'enquête distribuées, 80 ont effectivement effectué le remplissage soit un taux de réponse de 40%. Parmi ces 80 fiches, 62 seulement sont exploitables. Les autres fiches ont été mal remplies.

Répartition des prestataires enquêtés en fonction de leur profession

La majorité des prestataires est représentée par les sages-femmes, 26 sur 62 (41,9%) et les médecins, 22 sur 62 (35,5%). Les autres, infirmières, aides-soignantes et agents d'entretien représentent 22,6% des prestataires.

Répartition des prestataires enquêtés par secteur d'activité dans la maternité

Le bloc technique (salle de dilatation, salle d'accouchement, bloc opératoire) concentre la plus grande partie des prestataires, 42 sur 62 (67,8%).

Connaissance des AES par les prestataires

Parmi les 62 prestataires, 50 soit 81,4% connaissent la définition et les risques des AES.

Fréquence des AES dans les maternités de référence de l'Atlantique et du Littoral

Pour un total de 62 prestataires retenus, 48 ont eu un accident d'exposition au sang au cours

des trois derniers mois soit une fréquence d'AES de 77%.

Type d'AES

La projection de sang ou autres liquides organiques sur la peau et les autres muqueuses

représente le type le plus fréquent d'AES, 27 cas sur les 48 prestataires exposés (56,2%); ensuite viennent la projection de sang ou de liquide organique dans les yeux, 24 sur 48 (50%) et les piqûres d'aiguille souillée, 23 sur 48 (48%).

Fréquences des circonstances de survenue des AES durant les 3 derniers mois

Dans le tableau I, ci-dessous sont répertoriées les différentes circonstances de survenue des AES et leur fréquence.

Tableau I : Répartition des prestataires selon les circonstances de survenue des AES

Circonstances de survenue exprimées par les prestataires	Fréquence (N=48)	Pourcentage (%)
Accouchement	27	56,2
Suture au bloc	17	35,4
Touchers vaginaux	13	27,1
Manipulation de prélèvements sanguins	12	25,0
Prélèvement veineux	11	23,0
Injection en IM	08	16,7
Elimination des objets tranchants	08	16,7
Injection IV	05	10,4
Incision	04	08,3

Types de barrière de protection utilisée lors de la survenue de l'accident.

Dans notre série, nous avons identifié 4 types de barrières utilisés lors de la survenue de l'accident: tous les prestataires avaient porté leur blouse lors de la survenue de l'accident, 46 sur 48 (95,8%), leur calot. Seuls 5 sur 48(10,4%) n'avaient pas porté de gants. Par contre seulement 10 sur 48(21%) étaient munis de lunettes de protection. 14 parmi les 24 prestataires ayant subi une projection de sang ou de liquide organique dans les yeux, 14(58,3%) en étaient donc dépourvus.

Observance des normes de prévention

Parmi les 48 prestataires ayant eu un accident d'exposition au sang. 45 n'ont pas porté de barrière de protection lors de la survenue de l'accident. La principale raison évoquée est la non disponibilité, 27 cas sur 45 soit 60%. Dans 3 cas sur 45 (6%) les prestataires ont oublié le port de barrière de protection. La négligence est évoquée par 13 prestataires sur 45 soit 29%.

Mesures pratiques à prendre en cas d'AES selon les prestataires

En cas de piqûre ou coupure

Dans le tableau II, ci-dessous est mentionnée la répartition des prestataires en fonction des mesures à prendre en cas de piqûre ou de coupure.

Tableau II : Répartition des prestataires en fonction des mesures à prendre en cas de piqûre ou de coupure.

Mesures à prendre	Effectif (N=62)	Pourcentage (%)
Application immédiate d'antiseptique	61	98,4
Lavage des mains	59	95,2
Contrôle Sérologique (VIH/VHB)	40	64,4
Déclaration de l'AES	29	46,8
Consultation du médecin du personnel	22	35,5
Sérothérapie antitétanique (SAT)	12	19,4

En cas de projection de sang ou autres liquides organiques dans les yeux

Dans le tableau III, ci-dessous est mentionnée la répartition des prestataires en fonction des mesures à prendre en cas de projection dans les yeux.

Tableau III : Répartition des prestataires en fonction des mesures à prendre en cas de projection de sang dans les yeux

Mesures à prendre	Effectif (N=62)	Pourcentage (%)
Rinçage à grande eau de l'œil.	62	100,0
Contrôle sérologique	42	67,7
Déclaration de l'accident de travail	29	46,8
Consultation en ophtalmologie	27	43,3
Consultation du médecin du personnel	20	32,3

En cas de projection de sang ou autres liquides sur la peau et autres muqueuses

Dans le tableau IV, ci-dessous, est mentionnée la répartition des prestataires en fonction des mesures à prendre en cas de projection sur la peau et autres muqueuses.

Tableau IV: Répartition des prestataires en fonction des mesures à prendre en cas de projection de sang ou autres liquides organiques sur la peau et autres muqueuses

Mesures à prendre	Effectif (N=62)	Pourcentage %
Lavage	50	80,6
Contrôle sérologique (VIH/VHB)	40	64,5
Déclaration de l'accident de travail	28	45,2
Consultation du médecin du personnel	19	30,6

DISCUSSION

Catégorie professionnelle

Le corps paramédical est le plus représenté, dominé par les sages-femmes. Ce résultat est conforme à celui de SINGRU A. et coll. [2] en Inde en 2007 qui trouvent une majorité d'infirmier. Cela explique le fait que ce personnel paramédical est le plus exposé.

Fréquence des AES

La fréquence d'AES sur une durée de 3 mois est très élevée (77%) nettement supérieure à celle de GUPTA et coll. [3] qui retrouvent seulement un taux de 24,75% des prestataires sur 3 ans. Cela serait probablement lié au fait que seuls les prestataires ayant été victimes se sont sentis concernés ; la majorité n'a pas manifesté d'intérêt à participer à l'enquête. Qu'en est-il réellement de leur attitude face aux AES ?

AES et circonstance de survenue

Dans notre étude la circonstance la plus souvent en cause est représentée par l'accouchement mettant en exergue le fait que le secteur le plus touché en maternité est la salle d'accouchement. Ce constat est différent de celui de BI et coll. [4] qui dans une étude réalisée dans un hôpital universitaire en Australie ont trouvé une prédominance des AES dans le secteur des urgences et celui du bloc opératoire. Le déroulement de notre étude

dans des maternités uniquement explique cette différence.

Connaissance des prestataires en matière d'AES

Le niveau de connaissance en AES des prestataires dans nos maternités est bon. Ce n'est pas le cas au Pakistan où JANJUA et coll. [5] en 2007 ont noté le peu de connaissance des agents de santé sur les risques de transmission liés aux AES, notamment chez les agents d'entretien, avec pour conséquence la mauvaise application des mesures universelles de prévention.

Types d'AES

Nous remarquons une proportion presque égale pour les différents types d'AES : projection sur la peau et autres muqueuses, projection sur l'œil et piqûres. Nos résultats sont nettement différents de ceux de ZAFAR et coll. [6] au Pakistan qui ont noté la prédominance des piqûres par aiguille souillée lors de prélèvements sanguins (19%). Cela se rapproche de la moitié de nos résultats concernant les piqûres (48%). Par contre une étude nationale menée par le GERES [7] en France sur les cas déclarés d'AES a retrouvé chez les sages-femmes, une fréquence similaire des projections et des piqûres lors de réfection d'épisiotomie, ce qui se rapproche de nos ré-

sultats et souligne le fait que les différents gestes appliqués lors d'un accouchement peuvent indifféremment être à l'origine d'un AES.

Barrière de protection

En dehors des blouses, calots, bavettes, gants qui sont utilisés systématiquement, les lunettes ne sont portées que dans 21% des cas. Les raisons évoquées à cet effet sont essentiellement la non disponibilité de lunette et la négligence des prestataires. Si dans les conditions de travail de nos maternités la disponibilité de ces barrières de protection pose problème, qu'est ce qui sous-tend la non utilisation de ces barrières dans les pays développés [7] ?

SADOH et coll. [8] ont déploré le non-respect des mesures préventives des agents de santé nigériens d'Abeokuta rendant ainsi le risque infectieux élevé ; plus de la moitié en effet n'enfilent jamais de gants pour les accouchements et les interventions. Pour BI [4], une des raisons évoquées par les prestataires est l'urgence qui souvent n'offre pas le temps d'enfiler les barrières de protection. Ces différents constats interpellent le comportement des prestataires en maternité pour la prévention effective des AES.

Mesures prises en cas AES

En cas de piqûre ou coupure

L'application d'antiseptique est la première mesure pratiquée par les prestataires. Elle est suivie par le lavage des mains dans notre étude. SINGRU a retrouvé une attitude pareille chez les infirmiers [2]. Les mesures pratiques énoncées par les prestataires ne couvrent pas tous les aspects de la conduite recommandée après AES. Devant tout AES, il nous paraît nécessaire de considérer le risque potentiel de VIH et de prendre en compte les recommandations prescrites comme l'a souligné

Lansac [9]. En particulier, comme l'a démontré PATEL à Londres, le recours au médecin du travail est nécessaire pour une qualité d'évaluation du risque infectieux en cas d'AES et donc de sa prise en charge.

En cas de projection dans les yeux

Le rinçage à grande eau est la première mesure préconisée par les prestataires. La consultation ophtalmologique préconisée par près de la moitié des prestataires est pertinente, mais si cette mesure citée par les prestataires est disponible dans les grands hôpitaux ce n'est pas toujours le cas dans les maternités périphériques.

En cas de projection sur la peau et autres muqueuses

L'application d'antiseptique et le lavage à l'eau sont, à l'instar de ce qui est fait en cas de coupure ou de piqûre, les deux mesures envisagées par les enquêtés. Cela témoigne de la bonne perception qu'ils ont du risque de transmission virale même en absence de coupure ou de piqûre. En effet une étude réalisée aux Etats Unis pendant 20 ans [11] a révélé que 14% des infections liées aux AES impliquent une exposition cutanéomuqueuse.

CONCLUSION

La fréquence élevée des AES dans nos maternités suscite préoccupation malgré la connaissance des mesures préventives et pratiques par les prestataires. Il apparaît nécessaire de susciter une prise de conscience plus élevée des AES dans nos maternités, par la mise à jour des connaissances, en rendant disponible de façon permanente les matériels et consommables nécessaires à leur prévention, en organisant une supervision formative et évaluation rigoureuse des activités des maternités.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WHO. Reducing Risks, promoting healthy life. World Health Report, Geneva 2002; p 230.
2. SINGRU S. A., BANERJEE A. Occupational Exposure to Blood and Body Fluids among Health Care Workers in a Teaching Hospital in Mumbai. Indian J Community Med. 2008; 33(1): 26–30.
3. GUPTA A., ANAND S., SASTRY J., KRISAGAR A., BASAVARAJ A., BHAT S. M., GUPTA N., C BOLLINGER R.C., L KAKRANI A. L. High risk for occupational exposure to HIV and utilization of post-exposure prophylaxis in a teaching hospital in Pune, India. BMC Infect Dis. 2008; 8: 142.
4. BI P., TULLYJ., PEARCE S., HILLER J. E. Occupational blood and body fluid exposure in an Australian teaching hospital. Epidemiol Infect. 2006; 134(3): 465–471.
5. JANJUA N. Z., RAZAQ M., CHANDIR S., ROZI S., MAHMOOD B. Poor knowledge – predictor of nonadherence to universal precautions for blood borne pathogens at first level care facilities in Pakistan. BMC Infect Dis. 2007; 7: 81.
6. ZAFAR A., HABIB F., HADWANI R., EJAZ M., KHOWAJA K., KHOWAJA R., IRFAN S. Impact of infection control activities on the rate of needle stick injuries at a tertiary care hospital of Pakistan over a period of six years: an observational study. BMC Infect Dis. 2009; 9: 78.

7. **VINCENT A., COHEN M., BERNET C., PARNEIX P., L'HERITEAU F., BRANGER B., TALON D., HOMMEL C., ABITEBOUL D., COIGNARD B.** Les accidents d'exposition au sang chez les sages-femmes dans les maternités françaises. Résultats de la surveillance nationale en 2003. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2006; 35: 247-56
8. **SADOH W.E., FAWOLE A. O., SADOH A. E., OLADIMEJI A.O., SOTILOYE O.S.** Practice of universal precautions among healthcare workers. *J Natl Med Assoc.* 2006; 98(5): 722–726.
9. **J. LANSAC, G. BODY, G. MAGNIN.** La pratique chirurgicale en gynécologie-obstétrique. 2^e édition. Paris: Masson; 2004. p. XIII-XV.
10. **PATEL D., GAWTHROP M., SNASHALL D., MADAN I.** Out of hours management of occupational exposures to blood and body fluids in healthcare staff *Occup Environ Med.* 2002; 59(6): 415–418.
11. **DO A.N., CIESIELSKI C.A., METLER R.P., HAMMETT T.A., LI J., FLEMING P.L.** Occupationally acquired Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection: national case surveillance data during 20 years of the HIV epidemic in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003; 24:86–96

ASPECTS MORPHOLOGIQUES DES RESULTATS DE LA CYTOLOGIE URINAIRE CHEZ DES SUJETS D'ORIGINE AFRICAINE VIVANT EN FRANCE

Silou¹ J.F., Mpio² I., Boisson¹ R.C.



(1) Laboratoire de cytologie urinaire, Centre Hospitalier Lyon-Sud. 69495 Pierre-Benite France
(2) AURAL Etablissement de santé et traitement des maladies rénales, 69008 Lyon France

RESUME

INTRODUCTION. La cytologie urinaire par microscopie en contraste de phase a une grande importance diagnostique et permet d'établir la nature de l'affection de l'appareil urinaire et son pronostic évolutif.

OBJECTIFS DE L'ETUDE. Nous rapportons les résultats d'une étude rétrospective et observationnelle sur les examens cytologiques des échantillons urinaires de sujets africains vivant en France.

PATIENTS ET METHODES. Les analyses morphologiques des premiers échantillons d'urines provenant de 77 sujets d'origine africaine admis au cours de l'année 2009 dans différents services du CHU de Lyon, ont été réalisées dans le Laboratoire de Cytologie urinaire. L'étude consiste en un examen par microscopie en contraste de phase sur des urines fraîchement émises et dans les 2 heures suivant le prélèvement.

RESULTATS. Nos résultats globaux révèlent par ordre décroissant, 26 cas (34%) d'hématurie glomérulaire (HTUG) isolée, 14 cas (18%) d'hématurie (HTU) mixte (glomérulaire et non glomérulaire), 12 cas (16%) de leucocyturie associée à des anomalies tubulaires et à la présence de la flore microbiologique, 10 cas (13%) d'HTUG modérée associée à une infection urinaire, 6 cas (8%) de cytologie normale, 5 cas (6%) d'HTU non glomérulaire (HTUNG) et 4 cas (5%) de cristallurie-cylindrurie.

Selon le genre, les échantillons proviennent de la femme dans 40 cas (52%) et de l'homme dans 37 cas (48%); le taux d'HTUG isolée reste comparable entre les 2 genres, par contre les signes d'infection urinaire sont plus fréquents ($p < 0,05$) chez la femme (25%) que chez l'homme (19%).

L'âge moyen des sujets est de 48 ± 15 ans (médiane 49 ans). Trois groupes d'âge ont été constitués : 2 patients (2%) âgés de moins de 19 ans (groupe 1), 59 patients (77%) âgés de 19 à 60 ans (groupe 2), 16 patients (21%) âgés de plus de 60 ans (groupe 3). Dans le groupe 2 prédomine l'HTUG isolée (20 cas) par rapport à l'HTU mixte (10 cas) et à l'HTUNG (5 cas); dans le groupe 3 on observe un taux comparable ($p = ns$) entre HTU glomérulaire isolée et mixte (6 et 4 cas) et aucune HTUNG.

CONCLUSION. Notre étude cytologique des urines chez un groupe de patients incidents d'origine africaine vivant en France rapporte une forte proportion de l'HTUG isolée et de la leucocyturie entre 19 et 60 ans sans influence du genre. Un sédiment urinaire infecté est plus fréquent dans le genre féminin. Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature pour la population caucasienne autochtone.

Mots-clés : microscopie en contraste de phase – cytologie urinaire – hématurie glomérulaire – Afrique

ABSTRACT.

Morphological results of urine cytology in African subjects living in France

INTRODUCTION. Urinary cytology by phase contrast microscopy is of great importance for diagnosis and to establish the nature of the urinary tract disease and its prognostic.

OBJECTIVES OF THE STUDY. We report the results of a retrospective and observational study about the cytological examination of the urine samples from African subjects living in France.

PATIENTS AND METHODS. The morphological analysis of the first urine samples from 77 African subjects admitted during the year 2009 in various services of the university hospital of Lyon, were conducted in the Laboratory of urinary cytology. The study consist of an examination by phase contrast microscopy on urine freshly issued and in the 2 hours following the collection.

RESULTS. Our overall result reveal by decreasing order, 26 cases (34%) of the isolated glomerular hematuria (GHTU), 14 cases (18%) of the mixed (glomerular and non-glomerular) hematuria (HTU), 12 cases (16%) of leucocyturia associated with tubular abnormalities and the presence of microbiological flora, 10 cases (13%) of moderate GHTU associated with urinary tract infection, 6 cases (8%) of normal cytology, 5 cases (6%) of non-glomerular HTU (NGHTU) and 4 cases (5%) of crystalluria-cylindruria.

According to the gender the samples came from women in 40 cases (52%) and men in 37 cases

(48%), the rate of isolated GHTU remains comparable between the 2 genders, against the signs of urinary infection are more frequent ($p < 0.05$) in women (25%) than men (19%). The mean age was 48 ± 15 years (median 49 years). Three age groups were formed: 2 patients (2%) aged under 19 years (group 1), 59 patients (77%) aged 19-60 years (group 2), 16 patients (21%) aged over 60 years (group 3). In group 2 prevails isolated GHTU (20 cases) compared to the mixed HTU (10 cases) and the NGHTU (5 cases); in group 3 one observes a comparable rate ($p = ns$) between isolated GHTU and mixed GHTU (6 and 4 cases) and no NGHTU.

CONCLUSION. Our cytological study of the urine from incident group of African patients living in France reports a high proportion of isolated GHTU and leucocyturia between 19 and 60 years without influence of gender. An infected urine sediment is more frequent in the female gender. Similar observations were reported in the literature for the native Caucasian population.

Keywords: phase contrast microscopy - urine cytology - glomerular hematuria – Africa

INTRODUCTION

La cytologie urinaire par microscopie en contraste de phase, examen non invasif, a une grande importance diagnostique et permet d'établir la nature de l'affection de l'appareil urinaire et son pronostic évolutif (1-3). Les données sur la cytologie du sédiment urinaire réalisée en Afrique sont de plus en plus rapportées (4, 5) ; il nous a paru intéressant de rapporter nos résultats chez des sujets originaires d'Afrique mais vivant en France.

PATIENTS ET METHODES

Les échantillons urinaires provenant de 77 sujets admis au cours de l'année 2009 dans différents services du CHU de Lyon, ont été analysés dans le Laboratoire de Cytologie urinaire, seuls sont pris en compte dans ce travail les résultats des premiers échantillons urinaires. L'analyse comportait une étude par microscopie en contraste de phase sur des urines fraîchement émises et dans les 2 heures suivant le prélèvement.

RESULTATS

Les échantillons proviennent des patients de sexe féminin dans 40 cas (52%) et de sexe masculin dans 37 cas (48%) ; l'âge moyen est de 48 ± 15 ans (médiane 49 ans). Trois groupes ont été constitués en fonction de l'âge ; 2 patients (2%) âgés de moins de 19 ans (groupe 1), 59 patients (77%) âgés de 19 à 60 ans (groupe 2), 16 patients (21%) âgés de plus de 60 ans (groupe 3).

Nos résultats globaux révèlent par ordre décroissant, 26 cas (34%) d'hématurie glomérulaire (HTUG) isolée, 14 cas (18%) d'hématurie (HTU) mixte (glomérulaire et non glomérulaire), 12 cas (16%) de leucocyturie associée à des anomalies tubulaires et à la présence de la flore microbiologique, 10 cas (13%) d'HTUG modérée associée à une infection urinaire, 6 cas (8%) de cytologie normale, 5 cas (6%) d'HTU non glomérulaire (HTUNG) et 4 cas (5%) de cristallurie-cylindrurie.

Les figures 1 et 2 montrent les caractéristiques morphologiques observées.

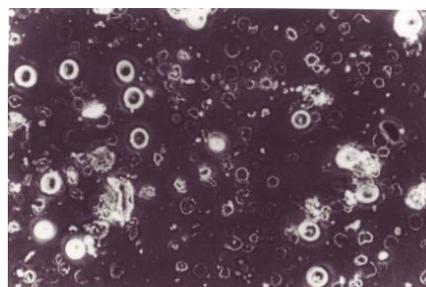


Figure 1 : Erythrocytes glomérulaires. Microscopie à contraste de phase. Obj 100

Notez l'anisocytose, le polymorphisme, les « fantômes », les images « en cible », en « boués », les schizocytes

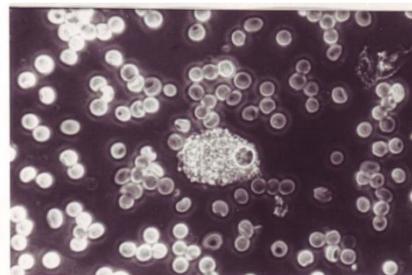


Figure 2 : Erythrocytes non glomérulaire (aspect monomorphe, contours réguliers). Microscopie à contraste de phase. Obj 100 immersion

Au centre de l'image, une cellule tubulaire proximale (noyau petit, excentré, à membrane nucléaire épaisse, cytoplasme granité

Documents dûs à l'obligeance du Pr H. Pellet

Au plan hématurique : on constate en fonction du sexe que le taux d'HTUG isolée reste comparable entre hommes et femmes et que l'HTUNG prédomine légèrement chez les hommes (4/5 cas). Selon les tranches d'âge définies, dans le groupe 2 prédomine l'HTUG isolée (20 cas) par rapport à l'HTU mixte

(10 cas) et à l'HTUNG (5 cas) ; dans le groupe 3 on observe un taux comparable ($p=ns$) entre HTU glomérulaire isolée et mixte (6 et 4 cas) et aucune HTUNG.

Au plan d'autres anomalies urinaires : en fonction du sexe les signes d'infection urinaire sont plus fréquents ($p<0,05$) chez la femme (25%) que chez l'homme (19%), le taux de cristallurie-cylindrurie est comparable. Selon les tranches d'âge définies, on observe un taux plus élevé ($p<0,05$) de leucocyturie associée à la flore ou à une infection urinaire dans le groupe 2 que dans le groupe 3 (35% versus 9%). La cytologie urinaire était normale dans le groupe 1.

DISCUSSION

Notre étude sur la cytologie urinaire en contraste de phase réalisée sur des prélèvements incidents en 2009 chez un groupe de patients d'origine africaine vivant en France semble confirmer une forte incidence de l'HTUG isolée et de la leucocyturie entre 19 et 60 ans quel que soit le sexe. Des observations similaires ont été rapportées en pratique néphrologique chez des sujets caucasiens (6, 7) confirmant la prépondérance de l'HTUG isolée parmi les signes urinaires les plus rencontrés. Dans ce groupe de sujets africains un sédi-

ment urinaire infecté est plus fréquent chez les femmes comme cela est rapporté chez les caucasiennes (1, 6, 7); la cristallurie-cylindrurie prédomine chez les sujets âgés, composée de aussi bien de calcium que de cristaux d'acide urique, ce résultat n'apparaît pas exceptionnel (2, 5, 7).

L'HTUNG est comparable tant sur le plan morphologique que sur son incidence par rapport aux observations publiées en occident sur les population autochtones (1, 3, 6), elle n'est pas plus fréquente que la forme à type d'HTU mixte comme cela est aussi rapporté par notre étude.

CONCLUSION

L'HTUG isolée paraît avoir une forte incidence en cytologie urinaire chez des patients d'origine africaine vivant en France ; au plan morphologique elle est considérée comme modérée en rapport avec les scores décrits et revêt les mêmes caractéristiques en microscopie à contraste de phase que chez les caucasiens. Les leucocyturies apparaissent par contre assez importantes le plus souvent associées à une forte présence microbienne.

Nos résultats ne reflètent que l'aspect cytologique et méritent d'être confrontés par la suite aux données cliniques des patients pour une étude plus exhaustive.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Flourié F., Cherfa H., Boisson RC. : La cytologie urinaire en contraste de phase. Ann Biol Clin 2002 ; 60(2) : 209-10.
- 2- Moliné V., Vieillefonc A. : Apport de la cytologie urinaire (méthodologie, intérêts et limites). Revue Francophone des laboratoires 2008 ; 398 : 25-36
- 3- Jean G., François B., Draï J., Pellet H., Durieu I., et al. : Analyse volumétrique des hématies urinaires dans le diagnostic étiologiques des hématuries. Presse Med 1993 ; 22 (30) : 1392-96
- 4- Ugwuja EL., Ugwu NC. : Urinary findings in young adults in Abakaliki, Nigeria. Niger J Clin Pract 2008; 11(3): 275-8
- 5- Muraguri PW., McLigeyo SO., Kayima JK. : Proteinuria, other selected urinary abnormalities among hypertension among teenage secondary school students in Nairobi, Kenya. East Afr Med J 1997 ; 74(8) : 465-6
- 6- Laville M., Roy P., Pellet H., Fabry J., Zech P.: Microscope hematuria in adults. Prevalence and associated. Presse Med 1991; 20: 545-50
- 7- Barbey F., Meuwly JY., Bringolf M., Venetz JP. : Hématurie et protéinurie isolée. Revue Med Suisse 2003 ; 574 :