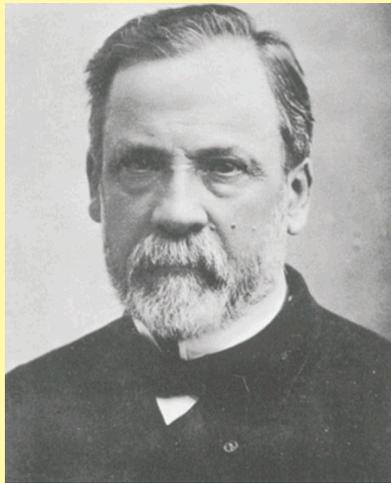


ARCHIVES DE L'INSTITUT PASTEUR D'ALGÉRIE



Institut Pasteur d'Algérie
01, Rue du Dr. Laveran, El-Hamma, Alger
Tél. +231 (0)21 67.25.02/25.11/23.44
Site web : www.sante.dz

**ARCHIVES
DE
L'INSTITUT PASTEUR
D'ALGÉRIE**

Institut Pasteur d'Algérie
01, Rue du Dr. Laveran, El-Hamma, Alger
Tél. +231 (0)21 67.25.02/25.11/23.44
Site web : www.sante.dz

ARCHIVES DE L'INSTITUT PASTEUR D'ALGÉRIE

Directeur responsable de la publication
Dr El Hadj Ahmed LEBRES

Responsable de la rédaction
Pr. Djamel GUETARNI

Comité de lecture

Pr, M.C. ABBADI	Institut Pasteur d'Algérie
Pr F. BACHI	Institut Pasteur d'Algérie
Pr R. BAKOUR	USTHB
Pr M. BELKAID	Institut Pasteur d'Algérie
DR R. BOUGUEDOUR	Direction des Services Vétérinaires
Pr. A. BOUGUERMOUH	Institut Pasteur d'Algérie
Pr F. BOULAHBAL	Institut Pasteur d'Algérie
Pr B. HAMRIOUI	CHU Mustapha Bacha
Dr. F. LARABA	U.S.T.H.B.
Pr. K. RAHAL	Institut Pasteur d'Algérie
Pr N. ZIDOUNI	Institut National de la Santé Publique
Dr M. SEGUIER	Institut Pasteur d'Algérie

Sommaire Contents

1. Evaluation de la toxicité des venins de Viperidae et de *Buthidae irradiés* au ^{60}Co : Approches biochimique et histologique
ABIB L, BOUKHALFA-ABIB H, BENNACEF-HEFFAR N & LARABA-DJEBARI F
2. Action du venin de scorpion sur la fonction rénale.
HAMMOUDI-TRIKI D, ADI-BESSALEM S & LARABA-DJEBARA F
3. La coqueluche en Algérie : Diagnostic direct et indirect de l'infection, sensibilité aux antibiotiques des souches identifiées.
LAZRI M, CARO V, BRUN D, NJAMKEPO E, OURAGHI R, GUESSOUM D, RAHAL K & GUISON N
4. Expression des gènes précoces dans les cellules épithéliales du cancer du rhinopharynx.
SBIF-LAMMALI F, CABRAS G, MELOULI H, DJENAOUI D, BOUGUERMOUH A & OOKA T
5. Génotypage du papillomavirus humain en Algérie chez des patientes prises en charge dans un service de chirurgie
SADOUKI N, DJEDIAT B, KHIDRI A, MEZALI H, BANDOUI D, HARROUZ F, GRABA A & BOUGUERMOUH A
6. Etudes des IGA anti EBV par groupes d'âge chez les patients atteints de carcinome nasopharyngiens en Algérie
MEISTER-BABIC D, MELOULI H, HOUALI K, EL HADJANE M, CHEROUATI M, LAICHI R, AFIANE M, DJENNAOUI D, OOKA T & BOUGUERMOUH A
7. Séroprévalence des anticorps anti-poliovirus chez des nourrissons à la veille du rappel de 18 mois par le VPO dans le centre de vaccination de Staouéli.
SEGHIER M, CHOUCANE A, ANES-BOULAHBAL D & BOURAOUD S
8. Flambées épidémiques de méningite associées au Coxsackievirus B5 en Algérie en 2002 et 2003
SEGHIER M, CHOUCANE A, BOUDJADJA S & BOURAOUD S.
9. Statut immunitaire anti-poliomyélite chez des enfants de 2 à 15 ans : enquête nationale séro-épidémiologique réalisée en 1998 en Algérie
SEGHIER M, BOUDJADJA S, CHOUCANE A & BOURAOUD S.
10. *Helicobacter pylori* : séroprévalence des facteurs de virulence CagA et VacA et diversité des souches en Algérie0
KIAS F, MOUFFOK F, TALEB F, TOUCHENE B, GUECHI Z, BOUHADEF A & BERRAH H

11. Tests diagnostiques de l'infection de helicobater pylori chez l'enfant
MOUFFOK F, TALEB F, KIAS F, GUECHI Z, BOUHADEF A & TOUCHENE B
12. Induction de l'arthrite rhumatoïde chez le rat WISTER par le collagène type II
ARRAR L, DERRADJI Y, ROUBA K, HANACHI N, CHAREF N, BOURICHE H, BOUMERFEG S & BAGHIANI A
13. Enquête sur la tuberculose bovine dans deux abattoirs d'Algérie.
SAHRAOUI N, YALA D, OUZROUT R, GUETARNI D & BOULAHBAL F

EVALUATION DE LA TOXICITE DES VENINS DE VIPERIDAE ET DE BUTHIDAE IRRADIES AU ⁶⁰Co : APPROCHES BIOCHIMIQUE ET HISTOLOGIQUE

ABIB Lila, BOUKHALFA-ABIB Hinda, BENNACEF-HEFFAR Nouara et
LARABA-DJEBARI Fatima

Laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins, Institut
Pasteur d'Algérie.

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences
Biologiques, USTHB Bab Ezzouar, Alger, Algérie.

RESUME

La capacité des rayonnements ionisants gamma à atténuer les effets toxiques des venins d'*Androctonus australis hector* (scorpion), de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina* (serpents) a été étudiée. Une étude comparative entre les effets des venins natif et irradié a été réalisée sur le foie de souris par une approche biochimique et histologique.

Les venins ont été irradiés en utilisant la dose de 2 kGy émise par le Cobalt (⁶⁰Co). Après irradiation, la toxicité de ces venins est atténuée jusqu'à 10 DL50. L'étude histologique du parenchyme hépatique des souris envenimées par les différentes préparations de venins (natif et irradié) a montré que les perturbations tissulaires engendrées par les venins irradiés à des doses d'injection élevées (5 DL50) sont moins importantes que celles provoquées par la dose sublétales du venin natif (< à 1 DL50). Les modifications tissulaires sont confirmées par une perturbation du taux des enzymes marqueurs dans le sérum et le foie de l'animal. En effet, la quantification de l'activité enzymatique des transaminases (TGP et TGO), montre que le taux de ces enzymes augmente dans le sérum et diminue dans l'organe analysé chez des souris envenimées avec le venin natif et aucune perturbation enzymatique n'est constatée avec le venin irradié à 2 kGy.

Mots clés : venin, *Buthidae*, *Viperidae*, irradiation gamma, toxicité.

E-mail : flaraba@ibnsina.ands.dz - Fax: 00213 21 91 72 21

EVALUATION OF THE TOXICITY OF VIPERIDAE AND BUTHIDAE VENOMS IRRADIATED FROM ^{60}Co : BIOCHEMICAL ET HISTOLOGICAL STUDIES

SUMMARY

The ability of gamma radiation from ^{60}Co (2 kGy) to attenuate toxic effects of scorpion *Androctonus australis hector* and *Viperidae* (*Cerastes cerastes* and *Vipera lebetina*) was studied. A comparative study between the effects of native and irradiated venoms was performed on the mice liver by means of biochemical and morphological approaches. The data indicated that the toxicity of irradiated venoms (1 and 2 kGy doses) decreased as compared with that of native venoms, no toxicity was observed until 10 DL50. Native venoms at sublethal dose caused a pronounced toxic effects on the liver preparation that was characterized by an increase of transaminase release. No significant enzymatic changes were observed in mice envenomed with irradiated venoms. Histopathologic evaluation showed that native venoms caused severe degenerative changes in the mice liver. Whereas, in the irradiated venoms at 2 kGy dose, no tissue alterations were observed. These results indicated that irradiation of *Androctonus australis hector*, *Cerastes cerastes* and *Vipera lebetina* venoms at 2 kGy dose may offer an effective venom-detoxification method that could help to solve the chronic problems of sera production.

Key words : venom, *Buthidae*, *Viperidae*, gamma radiation, toxicity.

INTRODUCTION

Le dysfonctionnement des organes internes des animaux est attribué aux effets des composants cytotoxique et nécrotique contenus dans les venins. Les venins de serpents (*Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*) sont constitués de substances pharmacologiquement actives tel que des polypeptides, des enzymes, des glycoprotéines et des substances de faible masse moléculaire (acides aminés, petits peptides, lipides, nucléosides et nucléotides, carbohydrates et amines). Toutes ces substances contribuent aux actions physiopathologiques des venins de serpents (Rivière et Bon., 1999). Certaines de ces enzymes telles que les phospholipases, les protéinases et les nucléases (Kini et Evans., 1992; Braud et al., 1999), exercent différents effets sur les victimes après envenimation. La létalité du venin dépend de l'action synergique des différents constituants toxiques (Mukherjee et al., 2000). Les venins dotées d'une forte toxicité, sont à l'origine de nombreux effets dont l'hémorragie, les troubles pulmonaire, hépatique et cardiovasculaire (Anai et al., 2002 ; Deshpande et al., 2005).

De même, les molécules des venins de scorpions (*Androctonus australis hector*) particulièrement les neurotoxines de type α , interagissent spécifiquement avec les canaux sodium potentiel dépendant et induisent des effets cliniques importants, conduisant à des perturbations des systèmes nerveux, cardiovasculaire, hépatique et pulmonaire (Ismail., 1995 ; Osnaya-Romero et al., 2001) qui peuvent aboutir au décès des victimes dans les cas les plus graves.

Le procédé d'irradiation gamma a été employé avec succès pour détoxifier plusieurs venins et toxines (Clissa et al., 1999 ; Souza et al., 2002). Le présent travail consiste à évaluer les effets des rayonnements ionisants gamma (2 kGy) sur la toxicité et l'hépatotoxicité par une étude histologique et enzymatique sur un modèle murin avec les venins d'*Androctonus australis hector*, de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina*.

MATERIEL ET METHODES

1. Venins et animaux :

Les venins d'*Androctonus australis hector* (Aah), de *Cerastes cerastes* (Cc) et de *Vipera lebetina* (VI), nous ont été fournis sous forme lyophilisée par le Laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie. Les souris blanches de souche NMRI (20 \pm 2g) proviennent de l'animalerie de l'Institut Pasteur d'Algérie.

2. Produits chimiques :

Les produits chimiques utilisés sont de nature analytique et proviennent de différentes firmes (Merck, Pharmacia et Sigma).

3. Détoxification des venins par les rayonnements ionisants gamma :

L'irradiation des venins de scorpion et de serpents a été réalisée au sein du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA). Les solutions de venins (0,1%) ont été soumises aux rayons gamma d'une source de cobalt-60 en utilisant la dose de 2kGy à un débit de dose de 480Gy/h. Après irradiation, les différents échantillons de venins irradiés 2kGy ont été soumis à une centrifugation à 1000g pendant 10 minutes, les protéines solubles contenues dans les surnageants récupérés sont conservés à -20°C.

4. Test de toxicité :

Ce test consiste à injecter à des lots de 4 souris ($20 \pm 2g$) par voie intrapéritonéale, un volume de 500 μ l contenant une solution des différentes préparations de venins natifs et irradiés à 2 kGy à des doses croissantes de 2 à 10 DL50. Le nombre de souris mortes est déterminé 48 heures après l'injection. Les DL50 des venins natifs d'*Androctonus australis hector*, de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina* sont respectivement estimées à 17 μ g/20g 48 μ g/20g et 50 μ g/20g de souris par voie intrapéritonéale.

5. Etude de l'hépatotoxicité des venins de scorpion et de serpents avant et après irradiation :

L'hépatotoxicité des venins natif et irradiés est mise en évidence par le dosage de l'activité enzymatique de la transaminase glutamo-pyruvique (TGP) (E.C. 2.6.1.2) et de la transaminase glutamique-oxaloacétique (TGO) (E.C.2.6.1.1), ainsi que par une étude histologique du parenchyme hépatique de souris témoins et envenimées.

L'activité enzymatique des transaminases a été déterminée dans les sérums et les homogénats du parenchyme hépatique prélevé après 24 heures d'envenimation de souris avec le venin natif ou irradiés d'*Androctonus australis hector*, de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina* par voie intrapéritonéale. Le dosage enzymatique des transaminases a été effectué selon les conditions recommandées par le fabricant (Sigma, St. Louis, Mo).

L'étude histologique a été entreprise sur le parenchyme hépatique, afin de mettre en évidence les effets physiopathologiques (*in vivo*) causés par les différentes préparations de venins natifs et irradiés sur le plan tissulaire. L'envenimation expérimentale est effectuée sur un groupe de souris réparti en trois lots (4 souris/lot). Les deux premiers lots reçoivent par voie intrapéritonéale, un volume de 500 μ l des venins natifs d'*Androctonus australis hector*, de *Cerastes cerastes* ou de *Vipera lebetina* à des doses sublétales (20 μ g/20 g pour les venins de vipères et 10 μ g/20 g pour le venin de scorpion). Les venins irradiés à 2kGy ont été injectés en utilisant une dose de 5 DL50. Le dernier lot servant de témoin, reçoit un volume de 500 μ l de NaCl à 0,9%. Les organes des animaux sont prélevés au bout de 24 heures d'injection et fixés dans une solution de Bouin aqueux. Des coupes transversales du parenchyme hépatique de 7 μ m sont colorées selon la méthode d'hématoxyline-eosine.

RESULTATS

1. Effet de l'irradiation gamma sur la toxicité des venins d'*Androctonus australis hector*, de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina* :

Les résultats du test de toxicité montrent que l'irradiation gamma a permis de détoxifier les venins de serpents et de scorpion jusqu'à une dose de 10 DL50 pour les venins d'*Androctonus australis hector* et de *Cerastes cerastes*. La toxicité du venin de *Vipera lebetina* quant à elle a été abolie jusqu'à une dose de 9 DL50 pour le venin irradié à 2 kGy. L'injection d'une dose de 2 DL50 des différents venins natifs provoque la mort de la totalité du lot de souris (Fig. 1).

2. Effet des rayonnements ionisants gamma sur l'hépatotoxicité des venins :

La mise en évidence des effets toxiques des venins natifs et irradiés à 2kGy d'*Androctonus australis hector*, de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina* a été effectuée par un dosage de l'activité enzymatique des transaminases (TGP et TGO) au niveau du sérum et du foie de souris. Les résultats obtenus ont révélé une augmentation du taux sérique de ces enzymes. Cette augmentation est accompagnée par une diminution de leurs taux dans le foie. Ces taux élevés dans le sérum seraient dus à la libération des transaminases à partir des tissus endommagés vers le sang. Les résultats obtenus avec les venins irradiés à 2 kGy, indiquent que les taux de TGP et TGO semblent être similaires à ceux du témoin au niveau de l'organe testé et dans le sérum (Fig. 2). Ce résultat pourrait s'expliquer par la perte de l'activité des composants des venins suite à l'irradiation gamma.

Parallèlement à l'étude enzymatique, une étude microscopique du parenchyme hépatique de souris envenimées avec les venins natifs ou irradiés a été entreprise. L'analyse de la structure du parenchyme hépatique après action des venins natifs, montre des altérations morphologiques qui se manifestent par une turgescence des hépatocytes. Les noyaux des hépatocytes présentent des dimensions irrégulières, certains sont picnotiques, d'autres ont partiellement ou complètement disparu suite à une caryolyse (Fi. 3). La comparaison des effets histopathologiques provoqués après injection des venins natifs et des venins irradiés à 2kGy, a montré que les perturbations tissulaires induites par les venins modifiés sont moins importantes.

DISCUSSION

Les résultats de notre étude mettent en évidence la diminution de la toxicité et la réduction de l'effet hépatotoxique des différents venins utilisés, via un procédé d'irradiation gamma au cobalt 60 (^{60}Co). La dose d'irradiation de 2 kGy utilisée a permis la détoxification jusqu'à une dose de 9 DL50 pour le venin de *Vipera lebetina* et 10 DL50 pour les venins d'*Androctonus australis hector* et de *Cerastes cerastes*. Cette détoxification serait probablement due à l'effet des radiations ionisantes gamma sur l'intégrité de certains ponts dissulfures des peptides et des protéines et à l'altération des acides aminés impliqués dans la toxicité des venins. Des résultats similaires ont été obtenus par les travaux de Murata et collaborateurs (1990) avec le venin de *Crotalus durissus terrificus* détoxifié à 2kGy. De même, des études réalisées sur les venins de serpents ont révélé que l'irradiation gamma entraîne des changements conformationnels et des altérations des propriétés physico-chimiques des constituants de venins (Spencer, 2000). L'inactivation des enzymes est due à la présence des radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau par les rayonnements ionisants gamma (Andriani, 1996).

Dans le but de déterminer l'effet de l'irradiation gamma sur l'hépatotoxicité des venins de scorpion et de serpents, un dosage enzymatique des transaminases (TGP et TGO) et une étude histologique du foie ont été réalisés. L'activité enzymatique des transaminases a été recherchée dans le sérum et le foie des souris envenimées avec les venins natifs et irradiés d'*Androctonus australis hector*, de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina*. Les résultats obtenus ont révélé une augmentation du taux sérique de ces enzymes marqueurs suite à une nécrose des hépatocytes qui serait à l'origine de l'élévation du taux des enzymes (TGP et TGO) dans le sang des animaux envenimés. Des résultats similaires ont été obtenus après envenimation des rats par les toxines d'*Eupatorium adenophorum* (Katoch et al., 2000).

L'examen microscopique des coupes du tissu hépatique de souris envenimées avec une dose sublétales des différents venins natifs de scorpion et de *viperidae* a révélé de nombreuses altérations morphologiques, qui consistent en une turgescence des hépatocytes. Les noyaux des hépatocytes présentent des dimensions irrégulières, certains sont picnotiques, d'autres ont partiellement ou complètement disparu suite à une caryolyse. Des modifications identiques à celles observées, ont été décrites, après envenimation expérimentale de souris avec le venin de scorpion *Tityus discrepans* (D'Suze et al., 2004), ainsi que le venin de *Vipera raddei* (Aznaourian et Amiryran, 2006). La comparaison des effets histopathologiques provoqués après injection des venins natifs et des venins irradiés à 2kGy, a montré que les perturbations tissulaires induites par les venins irradiés des deux espèces de serpents sont moins importantes que celles observées pour une dose sublétales des venins natifs, ce qui serait probablement due à la présence d'une quantité infime de composants toxiques non modifiés par irradiation gamma. Par contre, pour le venin de scorpion irradié à 2 kGy, l'analyse histologique du foie a montré une apparence morphologique ressemblant à celle d'un tissu témoin.

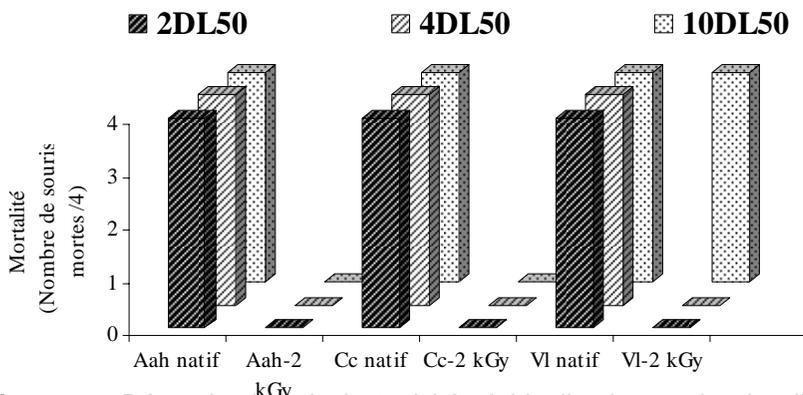


Figure 1 : Détermination de la toxicité résiduelle des venins irradiés d'*Androctonus australis Hector* (Aah), de *Cerastes cerastes* (Cc) et de *Vipera lebetina* (VI).

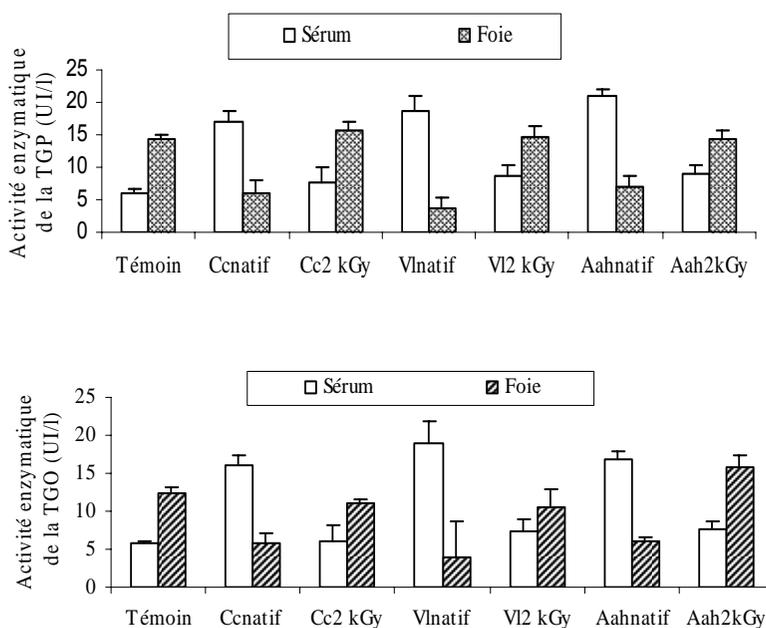
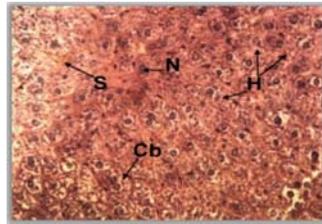
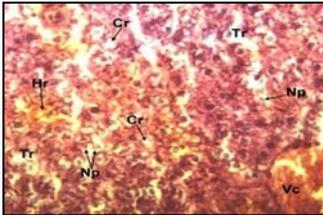


Figure 2 : Détermination de l'activité enzymatique des transaminases (TGP et TGO) dans le sérum et le foie de souris envenimées avec les venins d'*Androctonus australis Hector*, de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina* (natif et irradiés).



Témoins (NaCl 0,9 %)

Venins natifs



Venins irradiés à 2 kGy

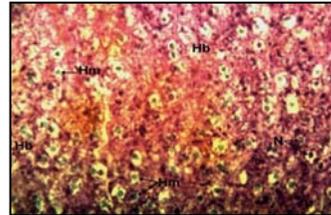
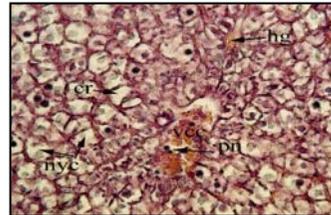
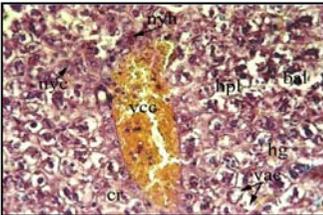
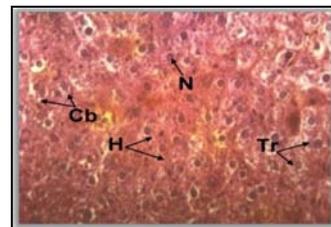
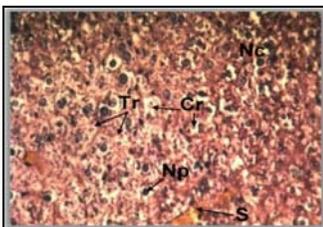
Venin de *Cerastes cerastes*Venin de *Vipera lebetina*Venin d'*Androctonus australis hector*

Figure 3 : Modifications histologiques observés au niveau du foie de souris envenimées avec les venins (*Androctonus australis hector*, *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*) natifs ou irradiés. Coloration Hématoxyline-Eosine; Grossissement : 417. Cr : Caryolyse ; hp : Hépatocyte ; Hr, hg : Hémorragie ; N, nyc : Noyau ; Tr : Turgescence ; Vc : Veine centrolobulaire.

BIBLIOGRAPHIE :

Anai, K., Sugiki, M., Yoshida, E., and Maruyama, M. (2002).
Neutralization of snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents
coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom
in rats.
Toxicon 40 : 63-68.

Andriani, E.P. (1996).
Irradiation of crotoxin in aqueous solution : the role of the main reactive
species in structural and biological alterations.
J. Venom. Anim. Toxins 2 : 168.

Aznavarian, A.V., and Amiryani, S. V. (2006).
Histopathological changes induced by the venom of the snake *Vipera
raddei* (Armenian adder).
Toxicon 47 : 141-143.

Braud, S., Wisner, A., Bon, C. (1999).
Venins de serpents et hémostase.
Annales de l'Institut Pasteur 10, 2: 195-206.

Deshpande, S. B., Alex, A. B., Jagannadham, M. V., Rao, G. R. K., and
Tiwari, A. K. (2005).
Identification of a novel pulmonary oedema producing toxin from Indian
red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) venom.
Toxicon 45 : 735-743.

D'Suze, G., Salazar, V., Diaz, P., Sevcik, C., Azpurua, H., and Bracho,
N. (2004).
Histopatological changes and inflammatory response induced by *Tityus
discrepans* scorpion venom in rams.
Toxicon 44 : 851-860.

Clissa, P.B., Nascimento, N., and Rogero, J.R. (1999).
Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom
treated with different doses of gamma rays.
Toxicon 37 : 1131-1141.

Ismail, M. (1995).
The scorpion envenoming syndrome.
Toxicon 33: 825-858.

Katoch, R., Sharma, O.P., Dawra, R.K., and Kurade, N.P (2000).
Hepatotoxicity of Eupatorium adenophorum to rats.
Toxicon 38: 309-314.

Kini, R. M., Evans, H. G. (1992).

Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon* 30, 3: 265-293.

Mukherjee, A. K., Ghossal, S. K., Maity, C. R. (2000).

Some biochemical properties of Russell's viper (*Daboia russelli*) venom from Eastern India: correlation with clinicopathological manifestation in Russell's viper bite.

Toxicon 38: 163-175.

Murata, Y., Nishikawa, A. K., Nascimento, N., Higashi, H. G., Dias Da Silva, W., and Rogero, J. R. (1990).

Gamma radiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities.

Toxicon 28 : 617.

Osnaya-Romero, N., De Jesus Medina-Hernandez, T., Flores-Herandez, S.S., and Leon-Rojas, G (2001).

Clinical symptoms observed in children envenomated by scorpion stings at the children's hospital from the state of Malos, Mexico.

Toxicon 39: 781-785.

Rivière, G., Bon, C. (1999).

Immuno-thérapie antivénimeuse des envenimations ophidiennes: vers une approche rationnelle d'un traitement empirique.

Annales de l'Institut Pasteur 10, 2 :173-182.

Souza, F.A. D., Spencer, P. J., Rogero, J. R., Nascimento, N., Pai-Siva, M. D., and Gallacci, M. (2002).

⁶⁰Co gamma irradiation prevents *Bothrops jararacussu* venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction.

Toxicon 40 : 1101-1106.

Spencer, P.J.(2000).

An effect of radiation on the structure of Bothropstoxin-1.

J. Venom. Anim. Toxins, 6:282-291.

ACTION DU VENIN DE SCORPION SUR LA FONCTION RENALE

HAMMOUDI-TRIKI D, ADI-BESSALEM S et LARABA-DJEBARI F

Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins, Institut Pasteur d'Algérie.

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences Biologiques, USTHB, Alger, Algérie.

RESUME :

L'étude entreprise consiste à montrer les effets du venin d'*Androctonus australis hector* (*Aah*) sur les modifications métaboliques ainsi que sur les altérations tissulaires après envenimation expérimentale. Pour cela, une envenimation de souris avec une dose subléthale (10 µg/20 g) a été réalisée afin de quantifier à des temps variables d'envenimation, les variations des activités enzymatiques (transaminases et la phosphatase alcaline) et certains paramètres métaboliques (urée et créatinine).

Les résultats obtenus montrent que l'envenimation expérimentale provoque des perturbations dans les activités métaboliques. Une augmentation des taux de toutes les enzymes sériques transaminases et PAL marqueurs de l'organe rein a été observée, avec un maximum de concentration à 60 min après envenimation. Une urémie élevée ainsi qu'une augmentation de la concentration de la créatinine sont également observées rapidement après injection du venin.

Le venin d'*Aah* provoque également des changements tissulaires importants au niveau du cortex rénal. Ces perturbations se manifestent par des désorganisations au niveau tissulaire avec apparition de zones nécrotiques et des œdèmes.

Ces résultats suggèrent que le venin de scorpion induit rapidement des désordres métaboliques considérables pouvant provoquer probablement un dysfonctionnement de la fonction rénale.

Mots clés : Venin d'*Androctonus australis hector*, histopathologie, rein, créatinine, urée, transaminase, phosphatase alcaline.

SCORPION VENOM ACTION ON THE RENAL FUNCTION

SUMMARY

In this study, we examined the effect of *Androctonus australis hector* (*Aah*) venom on metabolic modifications after envenoming and we analyzed histopathological changes. Thus, the experimental studies were performed in mice to follow variation kinetic of enzymatic activities (transaminases, alkaline phosphatase) and metabolic parameters (urea and creatinin).

The obtained results show that the *Aah* venom induced rapidly important modifications in metabolic responses and tissue damage responsible of renal failure. Indeed, a significative increase of metabolic activities (GOT, GPT, ALP) and the levels of creatinin and urea were observed after experimental envenomation. Microscopic examination of renal cortex showed edema and necrotic areas in mice envenomed.

Key words : Venom *Androctonus australis hector*, kidneys, histopathological study, creatinin, urea, transaminase, alkaline phosphatase.

INTRODUCTION

Les accidents causés par des piqûres de scorpions représentent un problème de santé publique dans plusieurs pays du monde. Les scorpions *Androctonus australis hector* (Aah) et *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) sont les deux espèces les plus dangereuses pour l'homme en Algérie.

Les venins de ces scorpions sont des mélanges de complexes biochimiques comprenant un certain nombre de polypeptides neurotoxiques (35 à 70 acides aminés). Ces neurotoxines amplifient l'excitabilité des cellules nerveuses et musculaires déclenchant ainsi une cascade des perturbations hémodynamiques, inflammatoire, métaboliques et histologiques. En effet, les venins de scorpion provoquent des altérations tissulaires au niveau de différents organes (foie, cœur, pancréas, reins, appareil génital et poumons) plus ou moins graves selon l'espèce de scorpion, la dose et la voie d'injection du venin (Bertke et Atkins, 1961 ; Almeida *et al.*, 1976; Penna-Videaù *et al.*, 2000; Bessalem *et al.*, 2002; 2003). Les conséquences physiopathologiques les plus graves sont la cardiopathie et la formation de l'œdème pulmonaire.

Les modifications de la fonction rénale après une envenimation par les scorpions a été peu rapportées dans la littérature (Bertke et Atkins, 1961 ; Corréa *et al.*, 1997). L'intérêt de cette étude a porté sur l'effet du venin d'*Androctonus australis hector* sur les variations de certains paramètres métaboliques marqueurs de la fonction rénale d'une part, et d'autre part sur les modifications tissulaires au niveau de l'organe rein.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique :

Le venin de scorpion de *Androctonus australis hector* obtenu par stimulation électrique est fourni par l'Institut Pasteur d'Algérie. Ce venin est conditionné sous forme lyophilisée et conservé à 4°C. La DL-50 de ce venin est estimée à 17 µg/20 g de souris (Laraba-Djebari et Hammoudi-Triki, 1998).

Les souris utilisées lors des expérimentations sont de race NMRI. (20 ± 2 g), elles proviennent de l'élevage de l'Institut Pasteur de l'Algérie (annexe de Kouba).

2. Matériel non biologique :

Les produits chimiques et les réactifs utilisés sont: la phosphatase alcaline (PAL EC 3.1.3.1), la glutamate oxaloacétique transaminase (GOT E.C 2.6.1.1), la glutamate pyruvique transaminase (GPT EC 2.6.1.2) fournis par Bayer (Allemagne).

Hématoxyline, acide picrique, acide acétique, éthanol, toluène et éosine sont fournis par Merck (Allemagne).

3. Méthodes :

3.1. Dosage des paramètres métaboliques :

Les animaux sont envenimés par voie sous cutanée avec une dose sublétales de venin d'*Aah* (10 µg/20 g d'animaux). Des prélèvements sanguins sont effectués à des temps de 15, 30, 60, 90, 120, 180, 360, 960, 1440 et 2880 min. Les activités enzymatiques des transaminases (GOT et GPT) et la PAL (exprimées en UI/l) sont dosés dans les sérums selon les recommandations de la firme Bayer. Les variations métaboliques (urée et créatinine) sont quantifiées en mg/ml selon les recommandations de la firme Biotrol (France).

3.2. Etude histologique :

Les reins prélevés des souris envenimées ont été immergés dans une solution de fixateur, le Bouin aqueux, pendant 4 jours à température ambiante, puis déshydratés dans l'éthanol et imprégnés dans des bains de paraffine. Après confection des blocs, des coupes de 7 µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome rotatif. Les coupes d'organes sont colorées à l'hématoxyline et éosine puis comparées à des coupes de rein de souris témoins. Les observations microscopiques ainsi que les prises de photo ont été réalisées sur un microscope photonique (Motic) aux objectifs 40 et 100.

3.3. Expression des résultats

Les résultats des dosages représentent la moyenne de 3 essais (moyenne ± écart-type). Ils ont été traités statistiquement par le test de Student t.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Variations métaboliques après envenimation :

L'injection d'une dose sublétales provoque une augmentation significative des enzymes (transaminases et PAL) dans le sang. Le maximum, des taux sériques des enzymes significativement plus élevés ($p < 0,001$) que les animaux témoins, est observé 60min après envenimation (fig.1). Les variations des activités enzymatiques demeurent élevées de manière significative ($p < 0,05$) après une envenimation de 180 min à l'exception du taux de la GPT qui devient quasi similaire à celui des animaux témoins.

Ces enzymes étant des marqueurs du métabolisme du foie et du coeur, leurs concentrations sériques élevées peuvent être également d'origine hépatique et cardiaque.

Des variations dans les activités enzymatiques, marqueurs de certaines lésions tissulaires ont été rapportées dans les envenimations scorpioniques (Corrêa et *al.*, 1997; Daisley et *al.*, 1999 ; Bessalem et *al.*, 2003). En effet, le venin de *Tityus serrulatus* provoque une élévation importante du taux des transaminases, de la lactate déshydrogénase, de la phosphatase alcaline et de la créatine kinase dans les sérums de rats, 60 minutes après envenimation (Corrêa et *al.*, 1997)

L'augmentation des taux enzymatiques dans le sang et leur diminution dans les organes est due probablement à leur libération vers le milieu extracellulaire suite aux lésions tissulaires provoquées par l'envenimation. Le taux élevé d'enzyme dans le milieu vasculaire dépend du degré de lésions des tissus (Bertke et Atkins, 1961).

L'urémie et la créatinémie, marqueurs de filtration glomérulaire, sont également significativement augmentées respectivement après une envenimation de 120 min et de 360 min (fig.2).

L'urée provient de la destruction des protéines, elle est entièrement filtrée par les glomérules des reins, son taux sanguin reflète le fonctionnement global des reins. Toutefois, sa valeur peut être influencée par certains facteurs extra-rénaux. Par contre, la créatinine sanguine, constituant des protéines musculaires, éliminées uniquement par les reins, n'est pas affectée comme l'urée par des facteurs extra-rénaux, son taux sanguin est donc un meilleur marqueur de la fonction rénale.

Les augmentations en urée, et créatinine observées après injection du venin d'*Aah* sont accord avec d'autres études (Ismail et *al.*, 1990 ; Omran et *al.*, 1992 ; Mirakabadi et *al.*, 2006). Ces molécules sont les produits finaux du métabolisme des protéines, et leur concentration augmenterait lors de la défaillance rénale après une envenimation scorpionique. Selon Omran et collaborateurs (1992), la défaillance rénale et la diminution de la filtration glomérulaire pourraient être liées à la défaillance cardiaque.

2. Modifications tissulaires du cortex rénal après envenimation :

L'examen histologique de la zone corticale du rein d'un animal sain (témoin) montre un parenchyme rénal avec une architecture conservée, composée de glomérules, de tubules contournés normaux non altérés, avec des noyaux bien distincts, un revêtement épithélial continu et un tissu interstitiel normal (fig. 3 A).

Les résultats obtenus après injection d'une dose sublétales du venin d'*Aah* (10 µg/20 g) révèlent des modifications morphologiques qui portent essentiellement sur les glomérules et tubules. Les lumières des tubules ne sont plus distinguées et les glomérules sont complètement désorganisés avec apparition de zones nécrotiques (fig. 3 B).

Des études expérimentales ont montré une désorganisation du cortex rénal avec la présence de congestion et de zones hémorragiques après envenimation des rats avec le venin de scorpion *Tityus serrulatus* ainsi que sa fraction toxique (Corréa et *al.*, 1997). Le venin de scorpion *Centruroides sculpturatus* induit également des perturbations rénales qui se manifestent par des régions nécrotiques et hémorragiques au niveau de la zone corticale (Bertke et Atkins, 1961).

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude montrent l'intensité des troubles biochimiques et histopathologiques provoqués par une envenimation expérimentale avec le venin d'*Aah*. La libération des neurotransmetteurs tels que les catécholamines et l'acétylcholine serait la cause de ces altérations observées au niveau du rein. En effet, les neurotoxines des venins de scorpion en affectant les membranes des cellules neuronales et des cellules musculaires entraînent une modification du potentiel d'action et par conséquent un dysfonctionnement cardiaque, pulmonaire et rénale.

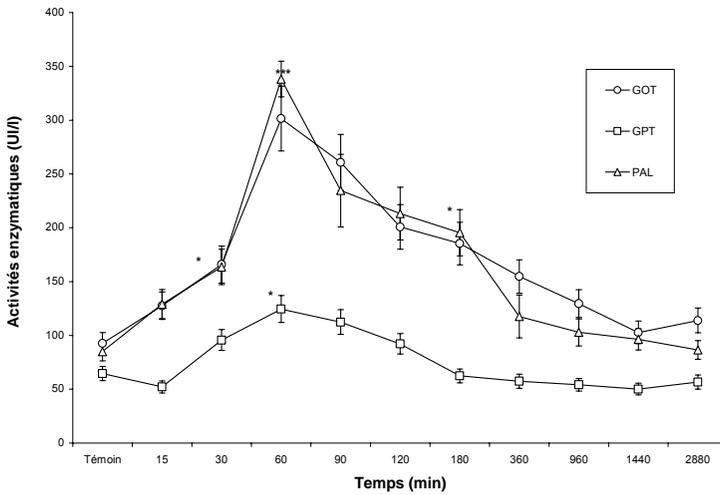


Figure 1 : Effets d'une dose sub létale du venin d'*Aah* sur le taux des enzymes métaboliques sériques à différents intervalles de temps après envenimation des souris (moyenne \pm écart-type, n = 3) * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

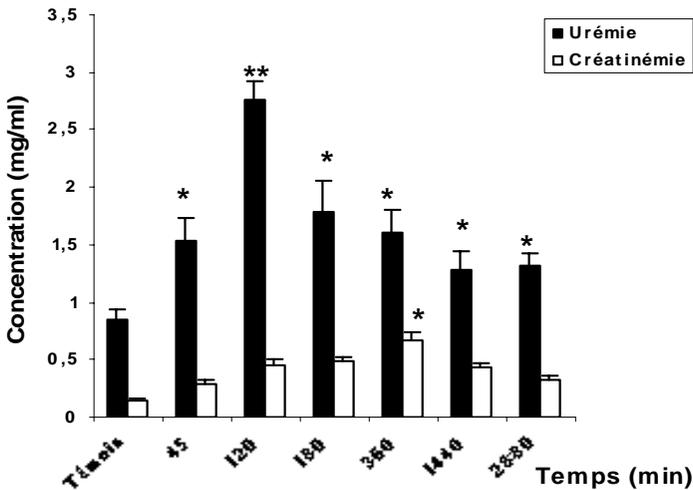


Figure 2 : Cinétique de dosage de l'urémie et la créatinémie après envenimation des souris avec le venin d'*Androctonus australis Hector* (moyenne \pm écart-type, n = 3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

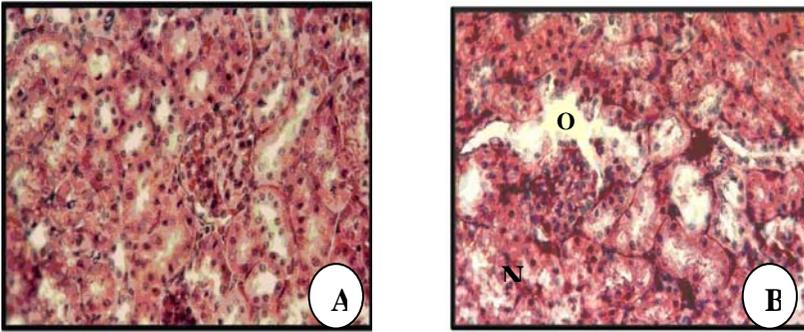


Figure 3 : Modifications histopathologiques du cortex rénal après injection d'une dose sublétales de venin d'*Aah* (10 µg/20 g) à des souris (coloration : hématoxyline éosine, objectif x 40). Légendes : N : nécrose, O : œdème. Obj : 40

BIBLIOGRAPHIE :

- Almeida H.O., Lima E.G. and Freire-Maia L. (1976).
Mechanism of the acute pulmonary edema induced by intracerebroventricular injection of scorpion toxin (Tityustoxin) in the unanesthetized rat.
Toxicon **14**: 435-440.
- Amaral C.F.S., Lopez J. A., Magalhaes R. A and De Rezende N.A. (1991).
Electrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial damage after *Tityus serrulatus* scorpion poisoning.
Am. J. Cardiol. **67**:655-657.
- Bertke E.M and Atkins J.H. (1961).
Effects of *Centruroides sculpturatus* venom upon rat tissues. A histopathological study.
Toxicon **2**: 205-209.
- Bessalem S., Hammoudi-Triki D. and Laraba-Djebari F. (2002).
Biodistribution du venin d'*Androctonus australis hector* et modifications histopathologiques du pancréas.
Toxines et recherches biomédicales, éditions scientifiques et médicales Elsevier. 235-242.
- Bessalem S., Hammoudi-Triki D. and Laraba-Djebari F. (2003).
Effet de l'immunothérapie sur les modifications métaboliques et histopathologiques après envenimation scorpionique expérimentale.
Bull. Soc. Pathol. Exot. **96**: 110-114.
- Corrêa M. M., Sampaio S.V., Lopez R.A., Mancuso L.C., Cunha O.A.B., Franco J.J and Giglio J.R. (1997).
Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin Tityustoxin-I.
Toxicon **35** (7):1035-1067.
- Daisley H., Alexander D. and Pitt-Miller P. (1999).
Acute myocarditis following *Tityus trinitatis* envenoming: morphological and pathophysiological characteristics.
Toxicon **37**:159-165.
- Ismail M., Abd-Elsalam M.A. and Morad A.M. (1990).
Do changes in body temperature following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus* influence the course of toxicity?
Toxicon, **28**: 1265-84.

Laraba-Djebari F. and Hammoudi D. (1998).
Utilisation de la fraction toxique majoritaire isolée à partir du venin dans la valorisation du sérum anti-scorpionique.
Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie T **62** : 254-266.

Mirakabadi A. Z., Jalali A.; Jahromi A. E., Vatanpur H. and Akbary A. (2006).
Biochemical changes and manifestations of envenomation produced by *Odonthobuthus doriae* venom in rabbits.
J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis **12**: 67-77.

Omran M.A. and Abdel-Rahman M.S. (1992).
Effect of scorpion *Leiurus quinquestriatus (H and E)* venom on the clinical chemistry parameters of the rat.
Toxicol. Lett., **61**: 99-109.

Penna-Videaù S., Cermeno-Vivas J., Moreno-Marval M. and Quiroga-Notti M. (2000).
Histopathological changes in albino mouse testis induced by the administration of *Tityus n. sp.* Venom.
J. Venom. Anim. Toxins **6** (2): 1-11.

LA COQUELUCHE EN ALGERIE: DIAGNOSTIC DIRECT ET INDIRECT DE L'INFECTION, SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES IDENTIFIEES

M LAZRI*, V. CARO**, D. BRUN**, E. NJAMKEPO**, R. OURAGHI*, Dj. GUESSOUM*, K. RAHAL* and N. GUISO**

* Pasteur Algiers Institute,

** Pasteur Paris Institute

SUMMARY

Algeria is highly vaccinated since 1959 with the same whole-cell vaccine as in France. Change in the transmission of pertussis (adults and adolescents to infants instead of child to child) was recently observed as in many vaccinated countries, mainly due to waning immunity and absence of vaccine booster. However, change in circulating clinical isolates cannot be excluded.

Ninety-one patients were suspected in 2003-2004. Culture and real-time PCR (based on IS481 and *ptxA-Pr* targets) were performed on 69 nasopharyngeal aspirates taken from infants hospitalized for pertussis and some of their family's members. ELISA reference serology was also performed.

Eight collected *B. pertussis* were biochemically and genetically characterized: all are haemolytic, sensitive to erythromycin and 75% of them express Fim3. The isolates cluster in PFGE group IV as majority of French isolates and exhibit *ptxA* allele 1 and *prn* allele 2. One *B. bronchiseptica* isolate was also collected.

IS481 PCR was shown more sensitive than *ptxA-Pr* PCR with however a lower specificity. Seventeen patients possessed more than 125EU/ml anti-PT antibodies confirming the infection.

This study shows that epidemiology observed in Algeria is similar to that observed in other highly vaccinated countries. Algeria should thus consider possibility to introduce supplementary vaccine boosters to control the current increase of contaminated infants.

INTRODUCTION

La coqueluche est une infection respiratoire humaine, très contagieuse. *B pertussis* et *B parapertussis* sont les agents responsables de cette maladie. La contamination se fait par voie respiratoire par inhalation de gouttelettes d'aérosols contenant les bactéries.

En Algérie, la généralisation de la vaccination en 1969 avec le vaccin à germes entiers a entraîné une diminution rapide de la morbidité et de la mortalité dues à cette infection. Cependant, la maladie reste à déclaration obligatoire. Le calendrier vaccinal consiste en 3 vaccinations à 3, 4, 5 mois et un rappel à 18 mois.

Une résurgence de la maladie est apparue non pas à cause d'une réduction de la couverture vaccinale, mais plutôt à cause d'une perte progressive de l'immunité due à l'absence de rappel vaccinal (fig 1).

L'Algérie est un pays où la couverture vaccinale est élevée depuis plusieurs années. L'épidémiologie concernant la coqueluche devrait être semblable à celle de l'Europe ou des Etats-Unis (1). Afin de le savoir nous avons acquis les techniques de diagnostic bactériologiques et moléculaires auprès de l'Institut Pasteur de Paris et d'autre part nous avons collaborés avec des pédiatres hospitaliers algériens afin de recevoir régulièrement des prélèvements.

En 2003 et 2004, des prélèvements en vue d'une analyse bactériologiques (ANP, FNP, et sérums) ont été pratiqués chez des nourrissons hospitalisés pour suspicion de coqueluche ainsi que chez les parents de certains d'entre eux (sujets contact).

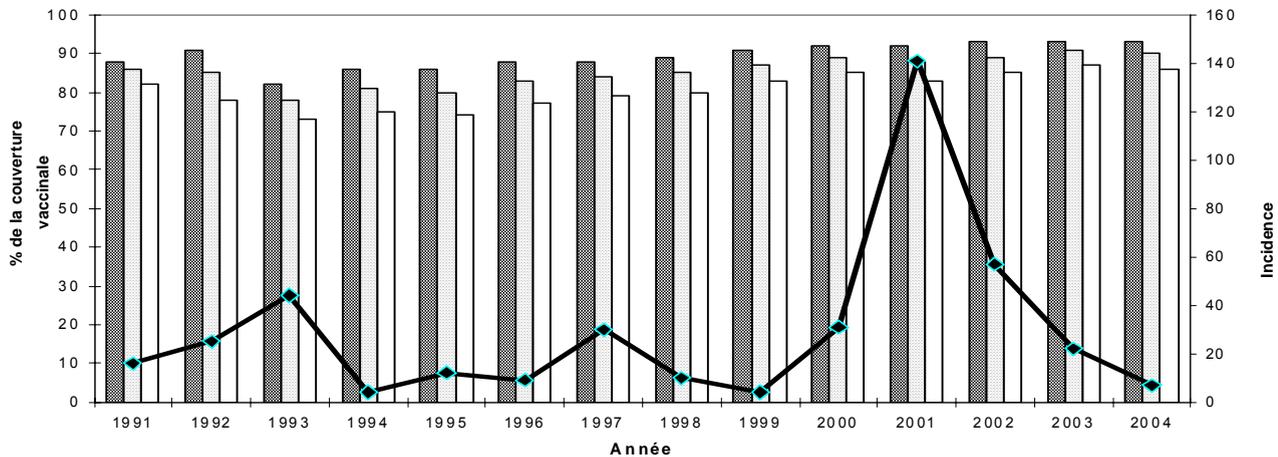
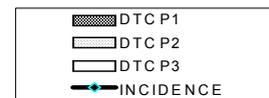


Fig 1. Incidence de la coqueluche en Algérie et couverture vaccinale entre 1991 et 2004
 Abréviations : DTC P: Diphtérie Tétanos Coqueluche Polio 1er, 2ème, 3ème doses



MATERIEL ET METHODES

Dés la réapparition de la coqueluche en Algérie, nous avons demandé une collaboration au Centre National de Référence de la coqueluche et autres bordetelloses de l'Institut Pasteur à Paris pour une initiation aux techniques moléculaires de diagnostic bactériologique. Les prélèvements (ANP, FNP et sérums) nous ont été adressés par les hôpitaux lorsqu'il y avait une hospitalisation de nourrissons pour une suspicion de coqueluche. Dans certains cas des prélèvements ont été réalisés sur ces nourrissons même s'ils ne présentaient pas de symptômes cliniques (sujets contact).

- Un total de 67 aspirations nasopharyngées (ANP) et 02 frottis nasopharyngés (FNP) ont été collectés entre 2003 et 2004 chez des enfants de moins de 1 an. La majorité des enfants avait moins de 03 mois et n'était pas vaccinée (n = 61) ; deux enfants de 06 mois et 1 an étaient correctement vaccinés (n = 2).

Tous les enfants présentaient les signes de la coqueluche, avec une toux persistante dépassant 21 jours marquée par des quintes et finissant par une reprise inspiratoire comparable au chant du coq. Chez certains enfants les accès de quintes s'accompagnaient de vomissements. La fièvre était absente chez la plupart des patients. Une hyper lymphocytose a été observée chez la majorité des patients.

- Des FNP ont été collectés chez les mères (n = 10) ou chez les pères (n=3) de certains des enfants. Ces parents étaient tous correctement vaccinés selon le calendrier vaccinal mais n'ayant pas reçu de rappel après 10 ans. Certains de ces parents avaient présenté des signes de rhume ou d'angine et avaient même reçu une antibiothérapie.
- A partir des ANP et des FNP, 09 isolats ont été collectés, 08 de *B pertussis* et 01 de *B bronchiseptica*. Ces isolats ont été cultivés à 35° C pendant 5 à 6 jours sur le milieu Bordet Gengou additionné de 15% de sang de mouton défibriné et conservés à -80° C.
- Les caractères biochimiques, la sensibilité/résistance à certains antibiotiques (cefaléxine 30 µg, erythromycine 15UI, doxycycline 30 µg, cotrimoxazole 1.25/23.75) et l'expression des fimbriae par microagglutination ont été analysés sur tous les isolats. Les antibiogrammes ont été réalisés sur milieu Bordet-Gengou enrichi avec 20% de sang de cheval défibriné, la souche CIP 8132 (Tohamal) a été utilisée pour la lecture interprétative comme contrôle de qualité. Les fimbriae ont été détectés par la technique de microagglutination à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques des deux fimbriae (Fim 2 et Fim 3)
- Les isolats ont aussi été caractérisés par électrophorèse en champs pulsé (ECP) et par génotypage (2).

- Soixante sept ANPs ont été conservées à -70° C, la présence d'ADN de *B. pertussis* par PCR en temps réel a été recherchée. Deux PCR ont été réalisées par ANP, l'une ayant pour cible le promoteur de l'opéron de la toxine de pertussis ou PCR-PT et l'autre la séquence d'insertion IS 481 ou PCR-IS. Avant toute réaction de PCR, l'ADN a été extrait à partir de chaque ANP à l'aide du kit Roche. Le diagnostic de coqueluche est confirmé lorsque les deux PCR sont positives. Lorsque seule la PCR-IS est positive, on considère que le cas est confirmé si le nombre de (témoin contrôle) Ct est inférieur ou égal à 35. Au-delà de ce Ct, la PCR doit être refaite sur un autre prélèvement pour valider le résultat.
- Trente-neuf sérums ont été prélevés chez les enfants et 13 chez les parents dans lesquels les anticorps anti-toxine de pertussis (anti-PT) ont été recherchés par la technique ELISA comme décrite par Simondon et coll (3). Le cas est confirmé si la sérologie est > 125 UE/ml (Unité Elisa /millilitre) à condition que le patient n'ait pas reçu de vaccination depuis moins d'un an.

RESULTATS

Cette étude a porté sur 91 patients ayant été collectés en 2003 et 2004. Pour ces patients 67 ANP et 02 FNP ont été analysés.

Durant l'année 2003-2004 un total de 08 isolats de *B pertussis* et un isolat de *B bronchiseptica* ont été collectés.

Tous les isolats de *B pertussis* sont hémolytiques, ce qui indique qu'ils expriment l'adényl cyclase hémolysine. Ils présentent tous les caractères biochimiques classiques de *B pertussis* et *B bronchiseptica*.

Le milieu Mueller-Hinton +20% de sang de cheval ne donne pas de bons résultats : absence de culture à l'antibiogramme, E test et CMI (concentration minimale inhibitrice milieu solide) pour *B pertussis*, mais peut être utilisé pour *B bronchiseptica*.

Le milieu Bordet-Gengou +20% de sang de cheval ne permet pas la lecture des diamètres qu'au bout de 48h. il en est de même pour les E test. Vu la durée de la croissance, il est préférable d'étudier la sensibilité de ces germes par la technique de dilution en milieu solide (CMI) (4).

Toutes les souches de *B pertussis* sont sensibles aux antibiotiques testés sauf à la cefalexine, la souche de *B bronchiseptica* est résistante au cotrimoxazole et à l'érythromycine (tab 1)

Tableau 1 : Résultats des CMI sur milieu solide Bordet Gengou et E test de l'erythromycine pour *B pertussis* et *B bronchiseptica* ^a.

Souches	CMI solide (n) ^b	CMI E test
	Erythromycine	
<i>S aureus</i> ATCC 29213 ^c	0.25	0.25
Cip 8132 (Tohama I)	0.004	0.016
<i>B pertussis</i>	0.016 (3) 0.032 (2) 0.008 (1) 0.004 (1) 0.125 (1)	0.016 (8)
<i>B bronchiseptica</i>	16	4

^a CMI donnée en microgrammes par millilitre.

^b *n* nombre d'isolats testés à partir d'une culture pure ajustée à 0.5 Mac Farland

^c valeurs critiques données par le CLSI pour le contrôle de qualité du *S aureus* ATCC 29213 : 0.25 à 1.0 µg/ml.

Dans le tableau 2 sont indiqués les fimbriae exprimés des isolats, leur groupe d'ECP et le génotypage des gènes codant la toxine de pertussis (PT) et du gène codant une adhésine, la pertactine ou (PRN).

Tableau 2 : Caractéristiques des isolats de bordetelles collectés

Année	Souches	Nature du prélèvement	Expression des Fimbriaes	Groupe en PFGE	Allèle Ptx S1	Allèle prn
2003	<i>B. bronchiseptica</i>	ANP	-	ND	ND	ND
2003	<i>B pertussis</i> 3	FNP	3	IV β	2	A
2003	<i>B pertussis</i> 2	ANP	2 et 3	IV β	2	A
2004	<i>B pertussis</i> 7	ANP	ND ^a	ND	2	A
2004	<i>B pertussis</i> 5	ANP	3	IV β	2	A
2004	<i>B pertussis</i> 8	ANP	3	IV β	2	A
2004	<i>B pertussis</i> 4	ANP	3	IV β	2	A
2004	<i>B pertussis</i> 6	ANP	3	IV β	2	A
2004	<i>B pertussis</i> 9	ANP	3	IV β	2	A

^a ND, non déterminé

L'analyse des ANPs par PCR (62) en temps réel confirme le diagnostic dans 15 cas avec deux PCR positives pour chaque cas. Pour les 47 autres cas, seule la PCR-IS est positive. Cependant, pour les Ct égaux ou < à 35, il y a donc aussi confirmation du diagnostic dans ces 47 cas. L'analyse des sérums indique 17 sérologies > 125 UE/ml confirmant là aussi le diagnostic de coqueluche. La sérologie du patient chez lequel *B bronchiseptica* a été isolée est négative.

DISCUSSION

Une disparition de la coqueluche a été constatée dès l'introduction de la vaccination contre cette maladie en 1969, depuis les laboratoires ont cessé de faire la recherche de *B pertussis*. Cependant une réapparition de la coqueluche a été constatée par des diagnostics cliniques sans confirmation bactériologique, d'où la décision de remettre au point le diagnostic bactériologique de la coqueluche car le diagnostic clinique est quelquefois très atypique.

Dans cette étude sur les 91 patients, 58 (63,7%) ont été confirmés par la culture et/ou la PCR et/ou la sérologie. Sur ces 91 patients il y avait 74 nourrissons et 17 adultes. Cinquante trois nourrissons sur 74 (71,6%) et 5 adultes sur 17 (29,4%) ont été confirmés.

Cette épidémiologie correspond à celle d'un pays ayant une couverture élevée avec une transmission adulte vers des nourrissons et non d'enfant à enfant (5).

Il est important de noter qu'il est confirmé que la PCR-IS est plus sensible que la PCR-PT. Cependant, il peut se poser des problèmes de spécificité comme cela est confirmé pour le cas du patient chez qui nous avons isolé la *B bronchiseptica* qui une PCR – IS à la limite de la positivité (35Ct), Les isolats collectés durant cette étude appartiennent au groupe ECP IV β et possèdent un gène *ptx S1* de type A et un gène *prn* de type 2. Ce type d'isolat est semblable au type majoritaire circulant en Europe (Finland, Suède, Allemagne, Pays-Bas et la France) depuis l'année 2000 (6).

CONCLUSION

Cette étude montre bien que l'Algérie devrait considérer la possibilité d'introduire des rappels vaccinaux supplémentaires afin de diminuer l'actuelle augmentation de cas chez les nourrissons pour lesquels la maladie est dramatique.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Pr Z.GUECHI (CHU Hussein dey-Alger), Pr. S. KHALED, S. MAHRANE (EHS El Hadi Flici-Bab El Oued), Pr M. NAIM (Hôpital central de l'armée-Alger), M. TAZIR (CHU Mustapha-Alger), D. TOUATI (CHU Alger-Ouest), Pr A. ACHIR, L.OUSSADOU (Secteur sanitaire de Birtraria), Dr M. AZOUAOU (CHU de Bab El Oued).

BIBLIOGRAPHIE

1. BOURGEOIS N, DOUCET-POPULAIRE F, GHASSIA J C. Infection à *Bordetella pertussis*: Diagnostic et épidémiologie clinique et moléculaire. Feuilles de biologie. 2002, 249: 17-24, 250: 5-16
2. MOOI F R, HALLANDER H, WIRSING VON KONING C H, HOET B and GUIO N. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. Eur. J Clin.Microbiol Infect. Dis.2000, 19: 174-181.
3. SIMONDON F, ITEMAN I, PREZIOSI M P, YAM A, and GUIO N. Evaluation of an immunoglobulin G enzym-linked immunosorbent assay for pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in diagnosis of pertussis in Senegal. Clin Diagn Lab Immunol 1998, 5: 130-134.
4. BERTHA C HILL, CAROLYN N BAKER and FRED C TENOVER. A simplified method for testing *Bordetella pertussis* for resistance to erythromycin and other antimicrobial agents. J Clin Microbiol march 2000, 38, 1151-1155.
5. WIRSING Von Konig CH, HALPERIN S, RIFFELMANN M and GUIO N. Pertussis of adults and infants. The Lancet infectious diseases, volume 2, issue 12, December 2002, pages 744-750.
6. CARO V, NJAMKEPO E, CM VAN AMERSFOORTH S, MOOI FR, ADVANI A, HALLANDER HO, QIUSHUI HE, MERTSOLA J, RIFFELMANN M, VAHRENHOLZ C et AL. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* populations in various European countries with different vaccine policies. Microbe and Infection 2005, 7: 976-982

EXPRESSION DES GENES PRECOCES DANS LES CELLULES EPITHELIALES DU CANCER DU RHINOPHARYNX.

SBIF-LAMMALI. F, CABRAS. G, MELOULI. H, DJENNAOUL. D,
BOUGUERMOUTH. A & OOKA. T

RESUME

Les patients atteints de cancer du rhinopharynx (NPC) développent des anticorps dirigés contre les antigènes précoces (anti-EA) et les antigènes tardifs (anti-VCA) à des taux supérieurs à ceux observés chez les sujets sains porteurs du virus d'Epstein-Barr (EBV) ou chez les patients atteints d'autres pathologies associées à L'EBV. La présence et le taux de ces anticorps constituent un marqueur pour le diagnostic et le pronostic du NPC.

Dans ce contexte, nous avons recherché l'expression de cinq antigènes précoces (DNase, BALF2, BMRF1, BARFI, BALFI) et de deux antigènes tardifs (p18 et gp220, '350) dans les tumeurs.

Les résultats ont démontré pour la première fois la présence d'une désoxyribonucléase virale (DNase) biologiquement active, de la protéine « DBP » codée par le gène BALF2 et la présence du transcrit BARFI aussi bien dans les biopsies fraîches que dans les tumeurs transplantées chez les souris athymiques. Aucune protéine tardive n'est exprimée. L'expression des protéines précoces montre qu'une nouvelle approche des interactions EBV- cellules doit être envisagée dans le NPC.

INTRODUCTION

Le virus d'Epstein-Barr a été l'un des premiers virus à être impliqué dans deux cancers humains: le lymphome de Burkitt (BL) et le carcinome du rhinopharynx (NPC), qui se manifestent en général longtemps après la primo-infection (Raab-Traub, 1983). La mise en évidence du génome d'EBV par Zur Hausen et al (1970) dans les cellules tumorales de BL endémique et de NPC indifférencié, ainsi que l'élévation du titre de certains anticorps spécifiques, témoignant de l'activité ou d'une réactivation du cycle viral, ont constitué les premiers indices de l'association étroite existant entre EBV et ces 2 cancers (Henle et al. 1973).

Le cancer du rhinopharynx est un problème de santé publique en Asie du Sud-Est où l'incidence est de 20 cas/10⁵ habitants/an. L'Afrique du Nord qui représente une zone intermédiaire, a une incidence d'environ 2 à 9 cas/10⁵ habitants/an. En Algérie, le NPC vient en 4^{ème} position dans les cancers chez l'homme et en 5^{ème} position chez la femme (Yaker, 1980). Une des caractéristiques du NPC observée en Afrique du Nord, est que ce cancer atteint deux tranches d'âge de la population; l'analyse de la courbe bimodale des âges fait ressortir 2 pics de fréquence: le 1^{er} de 10 à 24 ans et le 2^{ème}, de 40 à 60 ans (Cammoun et al 1974, Bouguermouh 1985). Dans la série chinoise un seul pic est observé (40 à 60 ans). Par ailleurs des différences de polymorphisme ont été décrites entre les virus de NPC algérien et ceux du sud-est asiatique (Bouzid et al 1994, Bouzid et al 1998, Sheng et al 2004).

Au niveau de l'expression du génome EBV dans les biopsies de NPC, peu de choses sont connues. L'expression est décrite par de nombreux auteurs comme étant de type latent, avec la transcription des gènes BARFO, EBNA-1, LMP-1, LMP-2, EBER et BZLF1 (Karran et al., 1992; Busson et al 1992; Cochet et al 1993). Les protéines virales retrouvées sont les protéines latentes EBNA1 dans 100% des cas et LMPI dans 60% des cas (Young et al, 1988).

Alors qu'aucune particule virale n'a pu être mise en évidence dans le tissu tumoral in situ, le profil sérologique des patients de NPC est caractérisé par des titres élevés d'anticorps dirigés contre les protéines précoces (LA) et les protéines tardives (VCA) du virus (de Thé et colt, 1987, Ooka et coll., 1991). De plus, les sérums des patients NPC ont la capacité de neutraliser l'activité de plusieurs enzymes virales telles que: la désoxyribonucléase (DNase) (Cheng et al 1980; Ooka et al, 1984, Chen et al, 1987, la thymidine kinase (De Turenne-Tessier et al 1989; Littler et Arrand, 1988), et la DNA-polymérase (Lin et al 1995). Le taux des anticorps anti-DNAsiques reflète en général l'évolution de la maladie. Ce taux décroît lorsque la masse tumorale régresse sous l'effet d'un traitement radiothérapie et inversement, une augmentation de ces anticorps constitue un excellent indicateur de rechute.

Malgré l'absence de particules virales, certaines protéines précoces ont été mises en évidence dans le NPC. En effet, Raab-Traub et al (1983) ont détecté des transcrits correspondants aux séquences codantes des gènes du cycle lytique dans les biopsies de NPC. Luca et al (1988), ont pu mettre en évidence par immunoblot dans toutes les tumeurs analysées, à partir d'extraits préalablement enrichis en EA, des éléments majeurs du groupe des EA: les polypeptides de 50/52 kDa (codés par BMRFI) du complexe des EA-D, et la protéine de 17 kDa (codée par BHRFI) du groupe des EA-R. De plus, la technique d'immunohistochimie a permis de localiser ces protéines au sein des cellules tumorales (Lung et al 1989) L'expression de BZLFI dans les cellules tumorales a été mise en évidence par Cochet et al (1993) dans 8 biopsies de NPC. Les transcrits de BRLFI, de BMLF1, de BLLFI (gp 350/220) et de la forme lytique de la LMP-1 (DILMP-1) ont été détectés dans les biopsies de NPC exprimant également BZLFI (Martel-Lenoir et al, 1995).

Nous avons recherché l'expression de la DNase des protéines codées par BALF2, BHRFI qui *in vitro* s'associent à la DNase (Lin et al 1995) ainsi que l'expression des gènes BARFI et BALF1. Ce gène BARFI possède une activité transformante sur cellules de rongeurs (Wei et Ooka 1989) et a été impliqué dans l'immortalisation des cellules primaires de reins de singe (Wei et al 1996).

BALFI a une homologie avec le gène antiapoptotique Bcl2 (Dawson et al 1995). Il pourrait donc intervenir dans l'oncogénèse des cellules épithéliales nasopharyngées. Les résultats obtenus démontrent la présence de protéines précoces dans les cellules épithéliales tumorales et suggèrent que l'on peut qualifier l'infection virale de cycle lytique abortif dans les tumeurs de NPC.

MATERIEL ET METHODES

Matériel tumoral :

Le matériel tumoral provient de patients algériens atteints de cancer de rhinopharynx (NPC).

Les prélèvements de biopsies ont été effectués dans les services d'O.R.L. des centres hospitalo-universitaires de Mustapha et de Kouba (Alger). Chaque prélèvement est partagé en deux parties, l'une destinée à l'étude histopathologique et l'autre immédiatement congelées de l'azote liquide en vue de l'étude virologique. Cette dernière a été réalisée en grande partie à Lyon dans le laboratoire de virologie moléculaire du Docteur Ooka.

Les études histologiques ont été réalisées au niveau des services d'anatomo-pathologie des deux hôpitaux précités. Les biopsies sont numérotées et les stades cliniques sont représentés par la lettre T. T1 pour le stade clinique T1, T2 pour le stade clinique T2, T3 pour le stade clinique T3 et T4 pour le stade clinique T4. Toutes les biopsies choisies pour l'étude des gènes précoces ont été caractérisées comme étant de type undifférencié (WHO III).

Le poids des biopsies analysées variait de 0.1 à 0.5 g. Avant utilisation, chaque échantillon consacré à l'étude virologique est coupé en petit morceaux au froid, la moitié est utilisée pour l'extraction d'ARN, l'autre moitié est divisée en deux pour l'extraction de l'ADN et pour l'analyse de protéines. Nous avons également utilisé trois tumeurs de NPC transplantées sur souris athymiques C15, C17 et C18 gracieusement offertes par le Docteur Busson de l'institut Gustave Roussy de Villejuif (Busson et al, 1988).

Extraction d'ADN :

Les lignées cellulaires et les biopsies ont été broyées dans un volume de tampon d'extraction (Tris 70mM pH 7.4; DDTA 50mM; NaCl 150mM; sarcosyl 1%), puis soumises à l'action de la protéinase K à raison de 200ug/ml de concentration finale pendant une nuit à 37°C. Un volume de phénol saturé au Tris 10mM-EDTA 1mM est ajouté et le mélange est assuré par inversion. Après une centrifugation de 10 min à 8000g le surnageant est récolté. Une deuxième extraction d'ADN est effectuée sur le culot et les deux surnageants sont réunis. Sur ces derniers, un demi volume de phénol et demi volume de chloroforme-alcool isoamylique (24:1) sont ajoutés. Ce mélange est centrifugé puis le surnageant est récupéré; le phénol en est éliminé par addition d'un volume de chloroforme: alcool isoamylique. L'ADN est précipité par deux volumes d'éthanol et de 0.1 volume d'acétate de sodium à 3M pendant une nuit à -20°C. La concentration d'ADN est alors déterminée par spectrophotométrie à 260 et 280 nm selon la formule suivante: concentration d'ADN= D.O.260 x 50 x dilution x volume final.

Extraction d'ARN :

L'extraction d'ARN des biopsies de NPC et des lignées cellulaires a été réalisée à l'aide d'un kit « Stratagène » (U.S.A.), Les cellules sont reprises dans 1 volume de la solution D (contenant du thiocyanate-guanidine et du B-mrcaptoéthanol) puis broyées. Un dixième de volume d'acétate de sodium 2M (pH 4) est ajouté. Après agitation par inversion, on rajoute au mélange un volume de phénol saturé à l'eau et on agite par inversion. Ensuite 0.2 volume de chloroforme: alcool isoamylique (24:1) est rajouté et après une forte agitation, les tubes sont mis pendant 15 minutes dans de la glace.

Après une centrifugation à 10000g pendant 20min, le surnageant contenant l'ARN est récolté. Un volume d'isopropanol est alors rajouté à ce dernier et le tube est mis à -20°C pendant 2 heures pour assurer la précipitation. Le précipité est alors récupéré après centrifugation à 10000g pendant 20min à +4°C puis resuspendu dans 0.1 volume de solution D. Un volume d'isopropanol est rajouté et le tube est mis à -20°C pendant 2 heures. Le culot est récupéré après centrifugation dans les mêmes conditions et lavé avec une solution d'éthanol à 75%. Il est alors séché puis repris dans 50 à 100µl d'eau. L'ARN est conservé à -20°C dans une solution contenant 0.3M d'acétate de sodium et 2.5 volumes d'éthanol. La quantité d'ARN est déterminée par spectrophotométrie à 260 et 280 nm selon la formule suivante: $D.0260 \times 40 \times \text{dilution} \times \text{volume final}$. La qualité de l'ARN s'apprécie après migration sur gel d'agarose à 1%. L'ARN est de bonne qualité lorsque les deux bandes de 18S et 28S sont visibles sur gel.

PCR BARFI :

La présence de l'ADN viral dans les biopsies NPC est mise en évidence par amplification du fragment viral BARFI. La réaction de PCR a été réalisée dans un volume de réaction de 25µl contenant : 1µg d'ADN viral, 0.8U de la Taq polymérase (Amplitaq, Perkin-Elmer), 3mM MgCl₂ et 2.5 µmoles des deux amorces (5'-CCAGAGCAATGGCCAGGTTC et 3'-GCGTGAACGGAT AAAGTGGAACTTAAGGG) permettant d'amplifier un fragment de 700 bp, 50 µM de désoxyribonucléotide triphosphate et le tampon standard de PCR. La réaction a été effectuée dans un appareil de PCR (Perkin Elmer, thermocycler) de la manière suivante: dénaturation à 94°C pendant 20s; hybridation à 55°C pendant 30s et extension à 75°C pendant 1min. 35 cycles ont été utilisés pour l'amplification. Les produits amplifiés sont analysés sur gel d'agarose (1%) puis transférés sur membrane de nylon Hybond N+ (Amersham). La détection de la séquence BARFI est réalisée par hybridation d'une sonde BARFI P³² par « Southern blot ».

Southern blot :

La sonde radioactive BARFI est synthétisée selon le protocole décrit par le kit « Random Primer » (Stratagène, U.S.A.): dans un tube eppendorf, à 25ng d'ADN est ajouté un volume de 24µl d'eau puis 10µl d'amorces oligonucléotidiques. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 5min, puis additionné de 10µl de tampon 5X, 5µl de phosphore P³² et 1µl d'enzyme exo(-) klenow (5U/ul). Le tube est incubé à 37°C pendant 10min et la réaction est arrêtée par addition de 2 µl de solution « stop mix ». Les nucléotides libres contaminant la sonde sont éliminés après passage sur colonne de sephadex G50. La sonde radioactive obtenue est dénaturée à 100°C pendant 3 min avant utilisation. L'hybridation est effectuée dans une solution modifiée décrite par Ausubel et al. (1987), contenant 50mM de phosphate de sodium (pH 7.2), 7% de SDS, 1% de

BSA et 100ug d'ADN de sperme de saumon dénaturé. La sonde radioactive, utilisée à raison de 10' cpm/ml est mise en contact du filtre pendant une nuit à 65°C. Le filtre est ensuite lavé deux fois avec une solution 2xSSC, 0.1% SDS à 65°C et deux fois avec une solution 0.1xSSC, 0.1% SDS pendant 30 min à 65°C Les filtres sont exposés pendant une nuit avant d'être développés.

Hybridation in situ-EBER :

La présence de l'EBV dans les cellules tumorales a été confirmée sur des coupes paraffinées de biopsies NPC par hybridation in situ en utilisant une sonde froide d'EBER-1 marquée à la digoxigénine. La sonde anti-sens est utilisée comme contrôle. Les sections sont déparaffinées avec le xylène, puis les lames sont trempées dans une série de solutions d'alcool (100°, 95°, 80°) puis incubées toute la nuit dans du tampon PBS. Les lames sont alors séchées et traitées avec une solution de 0.2 N de HCl pendant 12min à température ambiante puis 0.25 mg/ml de l'enzyme protéinase K (Boehringer) pendant 10min à 37°C. Les lames sont ensuite déshydratées par des solutions d'alcool et préhybridées dans une solution contenant 50% de formamide, 4xSSC, 5% de sulfate de dextran, 1x de solution Denhardt et 100ug/ml de DNA de sperme de saumon pendant 1h à température ambiante. L'hybridation est alors réalisée à 42°C une nuit dans la même solution contenant la sonde froide à la concentration final de 1ng/µl. Après hybridation, les lames sont trempées dans une solution de 4x SSC pour décoller la lamelle, puis lavées dans une solution de 1xSSC à température ambiante et enfin dans une solution 0.1xSSC à 42°C. La détection d'EBER-1 a été réalisée par la technique de l'immunopéroxydase décrite ci-dessous.

Northern Blot :

a) Préparation des poly-A+ :

L'ARN poly-A+ a été extrait en utilisant la méthode décrite dans le Kit des particules magnétiques contenant la streptavidine (PolyAtract mRNA isolation system III, Promega, France).

b) Technique de Northern blot (BARF1 et BGLIF5) :

5 à 10ug de ces poly-A+ sont séparés sur gel d'agarose à 1% contenant de la formamide (Wei et al, 1994) puis transférés par capillarité sur membrane de nylon Hybond N+ et hybridés avec une sonde radioactive sous les conditions standards décrites ci-dessus. Les sondes BARF1, BGLF5 et actine sont synthétisées à l'aide du kit « Random primer » (Stratagène). Les filtres sont ensuite lavés et exposés pendant deux nuits avant d'être développés.

RT-PCR (BARFI et BGLFS) :**a) Synthèse de c-DNA simple brin :**

La synthèse du brin complémentaire (c-DNA) a été réalisée à partir de 5µg d'ARN extrait de biopsies par 200 unités de la reverse transcriptase (M-MLV-H-RT- Superscript; BRL-Gibco, France) dans une solution contenant 50 mM de Tris (pH 8.2), 10mM MgCl₂, 75mM KCl, 10mM de dithiothreitol (DTT), 1mM de dATP, dGTP et dTTP, dCTP, 0.5µg d'oligo-dT15, 2 unités d'inhibiteur de RNase. Ce mélange est alors incubé à 42°C pendant 60 min. La réaction est ensuite stoppée par addition de 0.2M d'EDTA et de 0.25M de SDS. Les nucléotides libres sont éliminés par passage sur colonne Sephadex G50 (Pharmacia).

b) RT-PCR :

0,1 volume du mélange précédant a été utilisé pour la RT-PCR des gènes BGLF5, BALF I et BARFI. L'amplification par PCR de la séquence de BGLF5 a été réalisée par l'utilisation des amorces suivantes: 5'GGGGAATTCTTGGTCCAGATGGCCGACGTG et 3'GGGATCCCATGGCGGTGTCAAAGT aux positions 122350 et 120911 respectivement permettant ainsi l'amplification d'un fragment 1379 bp. Les conditions de réaction sont identiques à celles décrites pour l'amplification du gène BARF1. La détection de la séquence de la DNase est réalisée par southern blot à l'aide d'une sonde ^{p 32} comprenant la séquence BGLF5 synthétisée par le kit Random primer.

L'amplification de la séquence BALFI a été réalisée par des amorces ALFI-5'-GGGATCCAATGAACCTGGCCATTTGCTCTG-3' (sens) à la position 165517 du génome EBV et ALFI-AS---5'--CGGAATTACAAAGATTTTCAGGAAGTC-3' (antisens) à la position 164.858.

L'amplification par PCR de BARF1 a été décrite ci-dessus.

Extraction des protéines :

Les biopsies et les lignées cellulaires servant de témoins ont été reprises dans 1 volume de tampon A (Tris-HCl 50mM pH 8, DTT 1mM, KCl 10mM, leupeptine 1µM, pepstatine A 1 pM et PMSF 1mM), et les membranes nucléaires et cytoplasmiques ont été rompues par 3 cycles de congélation-décongélation rapides (-160°C/37°C) puis par une brève sonication (2 fois 30 sec, niveau 20 du sonicateur « Branson B-15 »). Le lysat est ensuite centrifugé 1 h à 105000g (36000 rpm sur SW40) de façon à éliminer les débris cellulaires. Le surnageant qui contient les protéines constitue l'extrait protéique brut. Il est conservé à -80°C

Purification partielle de la Dnase :

L'extrait cellulaire total de deux biopsies de NPC (7-T3 et 3-TI) et des cellules P3HR-1 a été utilisé pour une purification partielle de la DNase sur colonne de DNA cellulose. 600 µg de protéines solubles ont été déposées sur 300µl de DNA cellulose équilibrée avec du tampon d'extraction des protéines. Après lavage, les protéines retenues sur la colonne ont été éluées par un gradient linéaire de 0,05 à 0,8 M de NaCl par le système « batch ». 100µl de chaque fraction collectée ont été immédiatement congelées à - 160°C pour l'étude de l'activité enzymatique.

Activité enzymatique :

a) Dosage de l'activité enzymatique :

Le test d'activité est réalisé dans 60 µl de tampon de réaction (Tris-HCl (pH 8) 50mM, MgCl₂ 3mM, DTT 1 mM) comprenant 20µl d'extrait enzymatique et 1µg d'ADN de sperme de saumon marqué radioactivement au dCTP-P³² par la technique «d'élongation d'amorce au hasard» (Random Primer, kit Stratagène). La réaction enzymatique est réalisée en présence de 10mM ou de 300mM de KCl. Après incubation de 45min à 37°C, la réaction est arrêtée par addition d'EDTA à 16mM. Pour chaque essai, deux dépôts de 25µl de mélange réactionnel sont mis sur des filtres en Fibre de verre GF/C (Whatman). Ces derniers sont ensuite plongés dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) à 10%. L'ADN non digéré précipite sur filtres pendant 30 min à + 4°C.

Après 3 lavages au TCA 10% et un lavage à l'alcool 70°, les filtres sont séchés et la radioactivité acido-insoluble est déterminée par comptage du p³² par effet cerenkov. L'activité enzymatique, déterminée en cpm, correspond à la quantité d'ADN dégradée mesurée par la production de la radioactivité acido-soluble.

b) Neutralisation de L'activité Dnasique :

L'inhibition spécifique de l'activité de la DNase d'EBV des cellules P3HR-1 et des biopsies de NPC (3-TI, 7-T3) a été testée avec 2 sérums un semai humain d'un patient atteint de NPC dont les titres en IgG VCA et en IgG EA sont respectivement de 1:2560 et de 1:640 et un sérum polyclonal de lapin immunisé contre la DDNase purifiée. L'enzyme est préincubée avec un volume égal de chacun des sérums cités pendant 20 minutes à la température ambiante. L'activité enzymatique est alors déterminée comme précédemment à plusieurs temps d'incubation (15, 30, 60 et 120min). Les réactions sont réalisées en présence de 300 mM de KCl.

Le degré d'inhibition est exprimé en pourcentage d'ADN non dégradé, soit : (radioactivité acido-soluble avec sérum/ radioactivité acido-soluble sans sérum) x 100

Immunoblot des protéines (DNase BALF2, BMRFI, p18, gp350/220) :

Les protéines ont été extraites de la façon suivante: les biopsies sont mises en suspension dans 10 volumes de tampon RIPA (0.1 % SDS, 0.5% désoxycholate, 0.5% Triton X-100, 0.4 M NaCl, 5 mM EDTA et 20 mM Tris/HCl pH 7.6). Après sonication, la concentration protéique a été estimée par la technique de Bio-Rad (Bio-Rad laboratoires, Inc.) 30 à 50 µg de protéines ont été diluées avec un volume égal de tampon de gel (10% glycérol, 5% B-mercaptoéthanol, 2% SDS, 0.05% bleu de bromophénol, 50 mM Tris-HCl pH 6.8) puis mises à 100°C pendant 5 min. Les protéines sont ensuite séparées sur gel de polyacrylamide puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Les sites non-spécifiques sont bloqués par incubation de la membrane dans du PBS contenant 0.1 % de Tween 20 et 5% de lait écrémé.

Les différents anticorps utilisés sont :

- Anticorps anti-DNase polyclonaux de lapin immunisé contre la DNase purifiée : 1/50000 (ainsi que le sérum préimmun utilisé à la même dilution).
- Anticorps monoclonaux anti-BALF 2: 1 /1000.
- Anticorps polyclonaux de lapin anti-BMRFI : 1/1000.
- Anticorps polyclonaux de rat anti-p18: 1 /100.
- Anticorps polyclonaux anti-gp350/220: 1/100.

Après incubation en présence des anticorps pendant 1 heure à température ambiante, les filtres sont lavés; les anticorps fixés sont détectés après incubation d'une heure à température ambiante avec des anti-IgG de souris couplés à la peroxydase. Les filtres sont lavés et les anticorps sont visualisés par le système de chimioluminescence (ECL, Amersham).

Immunohistochimie (DNase et BALF2)

L'immunomarquage par peroxydase est effectué sur des coupes de biopsies NPC et sur des coupes d'une tumeur transplantée chez la souris C 18. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants:

- Le sérum polyclonal de lapin immunisé contre la DNase purifiée à la dilution 1:500,
- Anticorps monoclonaux anti-BALF2 à la dilution 1:100
- Un anticorps monoclonal de souris L26 dirigé contre l'antigène CD20 des lymphocytes B à la dilution 1:100,
- Un sérum polyclonal de lapin dirigé contre l'antigène CD3 des lymphocytes T à la dilution 1:100,
- Le sérum préimmun de lapin à la dilution 1:500.

Les lames sont déparaffinées puis traitées avec une solution d'eau oxygénée à 30% pendant 20 min. Elles sont ensuite lavées, puis incubées avec du sérum de chèvre non immun pendant 25 min. Enfin elles sont incubées avec les anticorps primaires pendant 25 min, et lavées trois fois avec du PBS. Le système enzymatique de révélation (biotine-streptavidine) comprend une immunoglobuline antisouris/lapin (25 min) biotinylée et un complexe streptavidine conjugué à la peroxydase (30 min) (kit « StreptABC Complexe/HRP Duet, Mouse/Rabbit », Dako). Toutes les incubations sont réalisées à la température ambiante. la révélation est faite à l'aide d'un chromogène, le 3' diaminobenzidine (DAB, Dako). La lecture est effectuée après contre coloration avec hématoxyline et montage des lames. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une coloration rouge.

RESULTATS

Mise en évidence du génome viral et des EBER dans les tumeurs :

PCR BARFI :

Toutes les biopsies testées se sont révélées « EBV positives » par PCR amplifiant le gène viral BARFI de 0.7 kb (figure 1).

Hybridation in situ-EBER

L'aspect histologique des biopsies étudiées illustré par la figure 2, a confirmé l'état indifférencié de la tumeur. L'architecture prédominante du tissu tumoral est caractérisée par la présence de nombreux cordons tumoraux à cellules fusiformes bordés d'un stroma peu abondant où s'observe la présence de lymphocytes T (figure 2a) et de lymphocytes B (figure 2b) infiltrants.

La présence du virus Epstein Bar dans les cellules tumorales a été confirmée par la mise en évidence des EBER par hybridation in situ en utilisant une sonde riboprobe non radioactive marquée à la digoxigénine (sens et antisens). Ces petits ARN exprimés au niveau des cellules épithéliales sont localisés principalement dans le noyau ou au niveau de la membrane nucléaire (figure 2d) La coloration spécifique observée dans les cellules tumorales, ne se retrouve pas dans les lymphocytes situés à proximité. L'hybridation avec la sonde antisens ne donne aucun signal (figure 2c). Toutes les biopsies testées expriment les EBER.

Mise en évidence d'une activité DNasique dans les tumeurs :Activité DNasique dans les tumeurs :

Nous avons dans un premier temps recherché une activité enzymatique de cette protéine à de fortes concentrations de sel (300 mM de KCL). En effet à cette concentration, l'activité des DNases dans les cellules non infectées est inhibée selon Ooka et al,(1984). Le Tableau 1 mentionne les pourcentages de l'activité DNasique à 10 et 300 mM de KCl pour 8 biopsies de NPC et dans les tumeurs transplantées chez les souris C15, C17 et C18. Le contrôle négatif est représenté par l'alignée Raji non induite et les contrôles positifs par la lignée p3HR-1 non induite et les contrôles positifs par la lignée P3HR-1 induite et la DNase d'EBV purifiée. A 10 mM, tous les échantillons montrent une activité enzymatique variant de 17 à 92%, les lignées témoins Raji et P31IR-1 présentent une activité de 56 et 97% respectivement et l'enzyme virale purifiée, une activité de 95%. A 300 mM de KCl, aucune activité n'est détectée chez les cellules Raji alors que cette activité a été évaluée à 55% chez les cellules P3HR-1 et à 42% au niveau de l'enzyme purifiée. Dans les biopsies de NPC, ce pourcentage varie de 12 à 90. On note pour les trois biopsies 3-T1, 4-T2 et 8-T4 que l'activité enzymatique est plus importante à 300 mM qu'à 10 mM. Aucune activité enzymatique n'a pu être détectée à 10 et à 300 mM de KCl chez la biopsie 6-T3; il y a eu probablement perte de l'activité recherchée soit durant la période de conservation de la biopsie soit durant l'extraction de la protéine.

Chez les souris athymiques, cette activité varie de 43 à 66% à 10mM. Plus faible à 300 mM mais néanmoins détectable, elle varie de 15 à 19%.

Test de séroneutralisation de l'activité DNasique :

Pour confirmer l'origine virale de cette activité enzymatique, nous avons effectué des tests de séroneutralisation.

Les premiers tests de neutralisation d'activité enzymatique à partir du surnageant de biopsies contenant l'enzyme n'ont révélé qu'une faible inhibition spécifique aussi bien avec des sérums de NPC qu'avec le sérum de lapin. Il est possible que plusieurs substances contenues dans les biopsies inhibent de manière aspécifique la liaison sérum enzyme. Nous avons donc réalisé, en raison de l'affinité de l'enzyme pour l'ADN, une purification partielle de la DNase de deux biopsies (3-T1 et 7-T3) sur colonne de DNA-cellulose en éluant différentes fractions à l'aide de solutions de NaCl dont les concentrations varient de 0 à 0.8 M. Chaque fraction élue est testée en activité enzymatique à 10 et à 300 mM de KCL. Les résultats, représentés sur la Figure 3, montrent que les profils d'éluion des deux biopsies sont différents, Celui de la biopsie 3-T1 est comparable à celui des cellules P3FIR-1. La plupart de l'activité des DNases cellulaires est élue à 0.1-0.2 M NaCl pour la biopsie 3-T1 et

les cellules P3I-IR-1 et l'activité virale éluée à 0.2-0.3 M. Dans le cas de la biopsie 7-T3, le profil d'éluion montre à 300mM de KCl, une activité virale élevée dans toutes les fractions de 0.4 à 0.8 M de NaCl.

Les fractions éluées à 0.2M-0.3M pour les cellules P3HR-1 et la biopsie 3-TL et la fraction éluée à 0.8M pour la biopsie 7-T3 ont été testées en séroneutralisation à l'aide de deux sérums: un sérum de NPC et un sérum de lapin immunisé contre 1a DNase virale (sérum anti-DNase). Les tests ont été effectués en présence de 300mM de KCl. de façon à inhiber, au moins partiellement, les DNases endogènes contaminant les fractions choisies. L'étude cinétique représentée sur la Figure 4, montre que l'activité enzymatique qui est respectivement de 54%, 47% et 42% pour les cellules P3I-IR-1, la biopsie 3-TI et la biopsie 7-T3 après 2 heures d'incubation à 37°C; elle est inhibée à 100% par chacun des deux sérums utilisés. Ces résultats montrent également que la purification, même partielle, de la DNase virale à partir des biopsies NPC est nécessaire pour obtenir une séroneutralisation spécifique,

Mise en évidence des transcrits de gènes précoces dans les tumeurs :

BGLF5 :

Par la technique de " Northern blot" un transcrit majeur de 1.8 kb a été mis en évidence chez la souris C18 uniquement (Figure 5). Les réponses en ARN dans les biopsies fraîches et chez les souris C17 et C15 étant plus difficiles à détecter, il est possible que l'activité traductionnelle dans les tumeurs soit plus efficace ou du moins plus stable que l'activité transcriptionnelle. Il est néanmoins intéressant de noter que seul le patient dont est issue la biopsie C 18, possédait des taux d'anticorps anti-EA et VCA (IgA) élevés contrairement à C15 et C17 (Busson et al, 1988).

Dans les biopsies de NPC, nous avons pu détecter le transcrit BGLF5 par la technique de la " RT-PCR ". La Figure 6 montre qu'une bande de 1.379 kb est présente au niveau des biopsies 3-TI, 7-T3, des tumeurs C15, C18 et de la lignée témoin EBV positive P3HR-1. Aucun signal n'a été obtenu avec le témoin négatif (Louckes) et aucune bande n'a été observée dans les tubes n'ayant pas reçu de 1 enzyme transcriptase-reverse (RT-).

BARFI :

L'expression du gène viral BARF 1 a été recherchée sur 11 biopsies de NPC. Nous avons recherché la présence du transcrit. Le choix de ces biopsies a été effectué en fonction de la qualité d'ARN extrait. Seules les biopsies présentant une excellente qualité d'ARN ont été retenues, et ceci indépendamment du stade clinique et de l'âge du patient.

Par la technique de « Northern blot », l'oncogène BARF1 n'est détectable que faiblement dans une biopsie de NPC nommée R3 (UCNT, stade clinique 3). Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 7. Le transcrit révélé dans le NPC a une taille de 1.1 kb, alors que dans les lignées témoins EBV positives B95-8 et P3HR-1, les deux transcrits majeurs mis en évidence présentent des tailles de 0.8 et 1.4 kb. Ces résultats suggèrent un mode de transcription différent entre les tumeurs et les cellules lymphoïdes. Cependant, il faut signaler que ce résultat n'a été obtenu que sur une biopsie, et qu'il doit être confirmé sur un nombre de prélèvements plus important.

Etant donné la difficulté à détecter ce messager dans le NPC par la technique de « Northern blot » nous avons eu recours à la technique " RT-PCR ". Le transcrit du gène BARF1 a pu être mis en évidence dans 8 cas sur 11, soit 70% , des cas de NPC ainsi que dans les tumeurs transplantées chez les trois souris à thymiques C15, C17 et C7.8 (Figures 8a et 8b)

BALF1 :

La recherche de l'expression de BALF1 a été réalisée par la technique RT-PCR sur 16 biopsies NPC. 85% d'entre elles expriment le gène antiapoptotique BALF1. Ce gène est aussi exprimé dans les lignées dérivées du lymphome de Burkitt. (Cabras et al 2005)

Dnase :

L'expression de la DNase d'EBV a été analysée sur 7 biopsies de NPC ainsi que sur trois tumeurs transplantées chez les souris à thymiques C15, C17 et C18 par immunoblot utilisant un sérum polyclonal de lapin immunisé contre la DNase virale purifiée. Les résultats sont représentés sur la Figure 10. Toutes les biopsies examinées expriment la DNase: 4 présentent un PM identique à celui du contrôle positif P3HR-1 soit de 52 kDa et les trois autres ont un PM plus élevé: 60 kDa pour la biopsie 4-T2, 53 à 55 kDa pour les biopsies 2-T1 et 3-T1 respectivement. Parmi ces biopsies, 4 nommées 7-T3, 8-T4, 1-T1 et 2-T1 présentaient plusieurs bandes. Dans le cas de la biopsie 7-T3, trois bandes majeures sont présentes. On ignore si les différences observées résultent de modifications post-traductionnelles, du polymorphisme du gène ou bien des techniques de détermination de la masse moléculaire employée par les auteurs (Clough, 1979; Ooka et al., 1984; Zhang et coll., 1987). Les protéines détectées sur gel sont spécifiques du virus EBV puisqu' aucune bande n'a été observée chez les lignées témoins EBV négatives (BEC, RHEK-1, HaCaT, BJAB et Louckes) ni avec le sérum pré immun de lapin (P).

BALF2 :

La recherche de la protéine codée par le gène BALF2 a été effectuée sur 6 biopsies de NPC nommées NPC1, NPC2, NPC3, NPC4, NPC5 et NPC6.

La protéine DBP codée par le gène BALF2 a été détectée par immunoblot dans 4/6 biopsies testées (NPC1, NPC2, NPC4 et NPC5) avec un poids moléculaire de 130 à 135 kDa comparable à celui de la souche témoin B95-8 (Figure 11a). La protéine est également présente dans la tumeur C18 mais non détectable dans les tumeurs C15 et C17 (Figure 11b).

BMRF1 :

Les résultats en immunoblot sont illustrés sur la figure 12 Cette protéine est détectée dans 4/5 biopsies de NPC testées. L'anticorps polyclonal de lapin utilisé reconnaît une gamme de protéines EA-D variant de 47 à 54 kDa. Les trois biopsies NPC1, NPC2 et NPC3 présentent une bande commune de poids moléculaire compris entre 45 et 47 kDa, NPC1 et NPC2 présentent une bande additionnelle dont le poids moléculaire est de 50 kDa environ. Les témoins positifs, représentés par les souches P3HR-1 et B95-8 répondent avec deux bandes dont le poids moléculaire est 45 et 58-60 kDa.

Localisation des protéines précoces DNase et BALF2 dans le tissu tumoral par la technique d'Immunohistochimie :Dnase :

L'analyse immunohistochimique avec les sérums de lapin anti-DNase révèle que les 2 biopsies 3-T1 et 7-T3 expriment l'antigène dans les foyers tumoraux (figure13). Aucune coloration n'est observée avec le sérum pré immun (Figure 13E). Dans la tumeur 7-T3, la coloration est principalement localisée à la périphérie du noyau (Figure 13F) alors que chez la biopsie 3-T1, la DNase semble être abondante au niveau du cytoplasme (Figure 13G). Nous avons également recherché l'antigène dans la tumeur de la souris nude C18, et nous avons observé une réponse positive au niveau des cellules épithéliales (Figure 13 I et J) Cette coloration diffuse à localisation nucléaire, est spécifique car elle n'est pas observée avec le sérum préimmun (Figure 13H) ni sur une tumeur EBV négative (résultat non présenté).

BALF2 :

Les résultats en immunohistochimie représentés sur la figure 14 confirment l'expression de la DBP au niveau des cellules épithéliales chez la souris C18. Cette coloration obtenue avec des anticorps monoclonaux anti-BALF2 est spécifique car elle n'est pas observée avec le sérum « EBV négatif » (figure 13A). C'est la première fois que cette protéine est mise en évidence dans les tumeurs de NPC.

Expression des gènes tardifs :

Bien que les auteurs rapportent une absence d'expression de protéines tardives dans les tumeurs de NPC, nous avons tenté de rechercher l'expression de deux gènes tardifs. - BFRP3 codant pour une protéine capsidale (VCA), la p18 - et BLLFI codant pour une protéine membranaire (MA), la gp350/220 sur les mêmes biopsies de NPC utilisées lors de la recherche des protéines virales codées par BALF2 et BMRFI (NPC1, NPC2, NPC3, NPC4, NPC5). Les résultats illustrés par la figure 15 montrent qu'aucune biopsie testée n'exprimait la protéine p18 ni la protéine gp220/350 (résultat non illustré) Ces résultats sont en accord avec la littérature rapportant qu'aucune particule virale n'a été mise en évidence dans les tumeurs de NPC.

DISCUSSION

Jusqu'a présent, parmi les antigènes précoces, seules les protéines codées par les gènes BZLFI, BMRFI (EA-D) et BHRFI (EA-R) ont été décrites dans les NPC (Cochet et al 1993; Luca et al, 1988; Lung et al 1989). Au cours de ce travail nous avons réussi à identifier deux autres protéines précoces dans ce type de tumeur: la désoxyribonucléase (DNase) virale et la protéine codée par BALF2. La DNase a été retrouvée dans les cas analysés par immunoblot, sa localisation dans les cellules épithéliales a été démontrée par immunohistochimie. Son activité enzymatique est spécifiquement inhibée par les sérums de patients atteints de NPC ainsi que par des anticorps de lapin dirigés contre la protéine purifiée. Quant au produit de BALF2, il a été identifié dans 4/6 des cas de NPC étudiés par immunoblot. Dans la tumeur transplantée de la souris C18 la protéine correspondante de 135 kDa est détectée à la fois par immunoblot et par immunohistochimie. En accord avec les observations d'autres auteurs, nous avons retrouvé sur immunoblot la protéine codée par BMRF1 dans 4/5 cas. Nous n'avons pas cependant détecté les protéines tardives p18 (VCA) et la glycoprotéine majeure gp220/350.

Les transcrits de BARFI et BGLF5 ont très faiblement répondu par la technique de " Northern blot". En revanche, la méthode de la RT-PCR a bien montré l'expression de ces gènes dans les biopsies de NPC et dans les tumeurs transplantées chez la souris. Par ailleurs, sur lignées

lymphoblastoïdes à EBV négatives » transfectées par le gène BARFI, le messager n'est détectable par "Northern blot" que lorsque une sonde riboprobe est utilisée (Wei et al., 1994).

Cette étude révèle également l'importance de la technologie employée pour la détection de l'expression d'EBV dans le NPC. Pour s'assurer de la présence de l'expression d'un gène il s'avère nécessaire de disposer non seulement de techniques assez sensibles pour la détection des transcrits, mais également d'utiliser des anticorps spécifiques pour la mise en évidence des protéines correspondantes.

Il est possible qu'un plus grand nombre de gènes précoces soient transcrits, mais à des taux difficilement détectables par notre technique. C'est pourquoi, nous avons parfois eu recours à la RT-PCR qui présente plusieurs avantages: en raison de sa grande sensibilité, elle requiert une quantité de matériel tumoral minimale, et grâce à l'emploi de différentes paires d'amorces, elle permet d'analyser le mode d'épissage des ARN messagers. Cependant, par RT-PCR on ne peut identifier les cellules qui donnent un résultat positif au sein d'une tumeur, alors que les prélèvements biopsiques ont l'inconvénient d'entraîner du tissu sous-muqueux riche en lymphocytes B ou autre matériel non tumoral « EBV positif ». C'est pourquoi l'immunohistochimie peut être complémentaire car elle permet de faire une discrimination entre les différents types de tissu ainsi que les compartiments cellulaires. Toutefois, l'interprétation des résultats en immunohistochimie reste très délicate- les colorations non spécifiques, la nécessité de témoins EBV négatifs fiables au niveau des cellules comme des sérums sont autant d'obstacles à surmonter pour éviter tout résultat faussement positif. Il est donc souhaitable de compléter l'examen histochimique par une recherche de protéines en immunoblot. Nous avons associé ces deux techniques pour prouver la présence de la DNase virale ainsi que de la protéine codée par BALF2 dans les cellules épithéliales tumorales. Les antigènes EA-D et EA-R ont également été décrits par ces deux méthodes (Luka et al 1988; Lung et al 1989). En revanche, la protéine ZEBRA codée par BZLF1 n'a pu être révélée par immunoblot et n'a été identifiée par immunohistochimie que dans une très faible proportion de cellules (Cochet et al, 1993) alors que d'autres auteurs ne l'ont pas retrouvée du tout (Sam et al 1993)

Nous avons apporté la première démonstration de l'expression de l'oncogène précoce BARFI, des gènes BGLF5 et BALF2 codant respectivement pour la DNase et la protéine 135Kdu gene antiapoptotique dans les biopsies primaires de NPC et dans les tumeurs transplantées chez les souris C15, C17 et C 18. Ceci indique clairement que l'expression virale dans le NPC n'est donc pas limitée aux gènes latents seulement.

L'expression de BARFI dans le NPC mais aussi dans le lymphome induit par EBV chez le tamarin (Zhang et al 1992), suggère que ce gène pourrait jouer un rôle important dans la carcinogenèse. Notre travail a apporté des résultats intéressants concernant le transcrite identifié par la technique "Northern blot", la taille du messenger majeur est de 1.1kb dans les biopsies. Or on sait qu'il existe 2 ARNm majeurs dans les lignées lymphoïdes, de 1.2 et 0.7kb. Parmi ces deux messagers, celui de 0,7kb a été isolé sous forme de eDNA impliquant que cet ARNm est fonctionnel, alors que la nature de celui de 1.2kb n'est pas connue. Il serait donc intéressant de voir si le même messenger dans les cellules épithéliales est le même que celui qui est détecté dans les cellules B ou s'il s'agit seulement d'un produit d'épissage. Il est par ailleurs possible que dans les cellules épithéliales le contrôle de la transcription de BARFI soit totalement différent de celui observé dans les cellules B comme c'est le cas pour EBNA-1 et I, MP-1,. Le gène BARF1 de 0.74 kb peut immortaliser les fibroblastes de rongeurs (Bulbe 3T3, NIH3T3) ainsi que les lymphocytes B humains (Wei et Ooka, 1989; Wei et al 1994). Ces cellules transfectées provoquent des tumeurs chez le raton nouveauté, mais les tumeurs provoquées par les cellules B transfectées sont moins agressives que celles provoquées par les fibroblastes de rongeurs. L'introduction de BARFI dans les cellules B humaines conduit à l'activation de c-myc et à une augmentation de l'expression de CD21, CD23 et du récepteur de la transferrine. Par ailleurs, l'expression de la protéine de 31-33 kDa codée par BARFI a été récemment impliquée dans l'immortalisation des cellules épithéliales primaires de rein de singe (Wei et al., 1996). Ce résultat pourrait confirmer ceux de Griffin et Karran (1984), et de Karran et colt. (1990), qui ont observé l'immortalisation des cellules épithéliales primaires simiennes et humaines après transfection par un fragment de 40 kb situé dans la région BamHI- A du génome viral contenant la séquence complète de BARF1. Ces transfectants expriment deux polypeptides de 30 et 31 kDa. Il faudrait donc comparer les protéines issues respectivement du gène BARF 1 et du fragment de 40kb.

La présence des protéines précoces DNase, BALF2, et BMRFI et BALF1 dans les biopsies analysées apporte une donnée intéressante par rapport à la production massive d'anticorps anti-EA observée dans le NPC. En effet, les malades développent des taux très élevés d'anticorps dirigés contre les antigènes précoces et tardifs du virus. Les titres d'anticorps anti-DNase sont particulièrement significatifs car ils sont en relation étroite avec le stade clinique de la maladie (Chen et al 1987): les périodes de rémission sont accompagnées d'une baisse des anticorps neutralisant la DNase, alors que les titres élevés sont l'indice d'une réapparition locale de la tumeur et du développement ultérieur de métastases (Chen et al 1989). Le fait que les titres d'anticorps diminuent en même temps que la masse tumorale régresse, implique que les foyers de réactivation pourraient se situer au sein de la tumeur et non pas dans une autre partie du corps humain. Cette hypothèse

paraît renforcée par nos résultats obtenus par immunohistochimie qui démontrent la présence de la protéine DNase dans les cellules épithéliales tumorales. Dans un tel contexte, il paraît donc plus juste de qualifier le type d'expression de l'EBV dans le NPC de "lytique abortif" plutôt que de "latent". On peut s'interroger sur la signification de l'expression de gènes précoces dans le NPC dans la mesure où cette pathologie ne correspond pas à une infection cellulaire lytique, mais à une multiplication anarchique de cellules cancéreuses. Nous n'avons pas détecté par immunoblot de protéines virales tardives ce qui est en accord avec d'autres auteurs (Young et al. 1988), et personne jusqu'à présent n'a détecté de particule virale dans les tumeurs. Pourtant les patients atteints de NPC présentent des titres très élevés d'anticorps anti-VCA: ceci peut supposer la production de faibles quantités de protéines tardives non détectables par les méthodes utilisées mais suffisantes pour stimuler l'immunité humorale. Par ailleurs, le blocage du cycle productif pourrait être dû au degré de permissivité de la cellule hôte (Gradoville et al 1990).

L'étude de la contribution des gènes précoces dans le déterminisme du phénotype malin est d'un grand intérêt car elle correspond à une nouvelle approche des interactions « EBV-cellules » dans le NPC. Les protéines précoces pourraient intervenir soit directement dans l'oncogenèse soit, par formation de complexe inactivant les produits anti-oncogènes cellulaires comme c'est le cas de la protéine de ZÉBRA d'EBV, de EIB de l'adénovirus et de l'antigène T de SV40. Par ailleurs la DNase, la DBP (BALF2) et le produit codé par BMRFI sont des protéines qui interviennent dans la réplication d'ADN. Il n'est pas exclu que ces protéines interviennent dans la recombinaison des gènes viraux et/ou cellulaires notamment pour la DNase qui possède des propriétés endo- et exonucléasiques (Stolzenberg et Ooka, 1990). De cette façon elles entraîneraient une perturbation génique pouvant provoquer l'activation anormale de certains gènes, d'autant plus que l'activation enzymatique virale détectée dans la tumeur se révèle très différente de celle observée dans les cellules B. En effet, cette activité est stimulée par des concentrations de sel élevées (300 mM) alors que dans ces conditions l'enzyme virale dans les cellules B est à peine détectable. Par ailleurs, la présence de la DNase virale dans un nombre étendu de cellules, et non de façon limitée comme pour la protéine ZÉBRA (Cochet et 1993), suggère que la régulation des gènes précoces dans les cellules épithéliales tumorales diffère de la cascade observée dans les cellules B infectées (avec expression de BZLFI en premier). Pour compléter l'étude, il serait intéressant sur les plages des cellules épithéliales exprimant la DNase de caractériser d'une part leur état de différenciation cellulaire et d'autre part le type d'infection virale par la détermination de l'expression de gènes latents et précoces.

BIBLIOGRAPHIE

Ausubel F.M., Brent R., Kinston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struki K., (1987). Screening recombinant DNA libraries in "Current protocols in Molecular Biology" Harvard Medical School, Boston Massachusset General Hospital, p63.

Bellows DS., Howell M., Pearson C., Hazlewoods SA., Hardwick M., (2002), Epstein-Barr virus BALF1 is a Bcl2 like antagonist of herpesvirus antiapoptotique Bcl2 proteine. *J. virol* 2469-76.

Bouguermouh A., (1985) Thèse de doctorat en Sciences Médicales, Alger.

Bouزيد M., Djennaoui D., Dubreuil C., Bouguermouh A., Ellouz D., Abdelwahab J., Decaussin G., and Ooka T., (1994). Epstein-Barr virus genotypes in NPC biopsies from North Africa. *Inter. J. Cancer* 56 468-473.

Bouزيد M., Sheng W., Buisson M., Bouguermouh A., Morand P., Seigneurin J.M, Ooka T., (1998). Different distribution of H1-H2 Epstein-Barr virus variant in oropharyngeal virus and in biopsies of Hodgkin's disease and in nasopharyngeal carcinoma from Algeria. *Int. J. Cancer.* 77, 205-210. Author errata in *Int. J. Cancer* 80 485 (1999)

Busson P., Mc Coy R., Sadler R., Gilligan K., Turz T., and Raab-Traub N. (1992). Constant transcription of the Epstein virus LMP2 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol.* 66 3257-3262

Cabras G., Decaussin G., Zeng Yué., Djennaoui D., Melouli H., Broudly P., Bouguermouh A., Ooka T., (2005). Epstein-Barr virus encoded BALF1 is transcribed in Burkitt lymphoma a cell lines and in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *J. Clinical virol.* 34 26-34.

Cammoun M., Vogt-Horner G. and Mourali N. (1974). Tumors of the nasopharynx in Tunisia: an anatomic and clinical study based on 143 cases. 33 184-1993.

Chen JH., Chen JC., CHO SM et al (1987). Antibodies to Epstein-Barr virus specific DNase in patients with nasopharyngeal and control groups. *J. Med. Virol.* 23 11-21.

Chen J.H., Chen C.J., Liu MY et al (1989). Antibodies to Epstein-Barr virus-specific DNase as a marker for field survey of patients with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J. Med. Virol* 27 269-273

Cochet C., Martel-Renoir D., Grunwald V., Bosq J., Cochet G., Schwab Bernaudin J.F., et Joab I.; (1993). Expression of the Epstein-Barr virus immediate early gene BZLF1 in nasopharyngeal tumor cells. *Virology* 197 358-365.

Dawson CW., Rickinson A.B, Young L.S (1995). A viral homologue of the Bcl2 oncogene, disturbs epithelial cell differentiation. *Nature. Oncogene* 10 69-77.

Decaussin G., Sbih-Lammali., De Turenne-Tessier., Bouguermouh A., Ooka. (2000): Expression of 5588.

De Thé G., et Zheng Y. (1987). Population screening for EBV markers : toward improvement of nasopharyngeal carcinoma control. In the Epstein-Barr virus : recent advances. Edited by MA. Epstein and Achong. Williams Heinemann Medical books, London p 237-249.

De Turenne-Tessier M., Ooka T., Calender A., De Thé G., Daillie J. (1989). Relationship between nasopharyngeal carcinoma and high antibody titers to Epstein Barr virus specific thymidine kinase. *Inter. J. Cancer.* 43 45-48.

Henle W. Ho JHC., Henle G., Dwan HC (1973). Antibodies to Epstein-Barr related antigens virus in . Comparaison of actives cases and long-terme survivors. *J Natl.Cancer.* 51 361-369.

Karran L., Gao Y., Smith P., Griffin B. (1992). Expression of a family of EB virus complementary strand transcripts in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 8058-8062.

Lin SF., Hsu TY., LIU MY., LIN LS., YANG HL., Chen JY., Yang CS. (1995). Characterisation of Epstein-Barr Virus DNase and its interaction with the major DNA binding protein. *Virology* 208 712-722.

Litter E., Arrand JR., (1988) : Characterisation of the Epstein-Barr virus encoded thymidine kinase expressed in heterologous ukaryotic and procariotic systems ; *J.Virol.* 62 (3892-3895).

Lucas J., Deep ZE., Hartmon DP., Jenson B., Pearson GR (1988). Detection of antigens associated with Epstein-Barr virus replication in extracts. *J. Natl. Cancer INST.* 80 1164-1167.

Lung M., Chan KH., Lam W., Kou SK., CHAN CW., NG M (1989). In situ detection of Epstein -Barr virus markers in nasopharyngeal carcinoma patients. *Oncology* 46 310-317.

Martel-Lenoir M., Grunewald R., Touitou R., Schwaab G., Joab L., (1995) : Qualitative analysis of the expression of the Epstein Barr virus markers in nasopharyngeal carcinoma patients. *Oncology* 46 310-317.

Ooka T., De Turenne M., De Thé G., Daillie J (1984). Epstein-Barr virus specific DNase activity in non producer Raji cells after treatment with 12-0-tetradecanoylphorbol-13- acetate and sodium butyrate. *J. Virol.* 49:626-628.

Raab-Traub N., Hood R., Yang CS., Henry II B., Pagano JS; (1983). Epstein-Barr transcription in nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol* 48 580-590.

Sheng W., Bouguermouh A., Bouzid M., Djennaoui D., Ooka T. (2004) BAMH1 DNA fragment H polymorphism of Epstein-Barr virus is associated with the mutations present in an 89 BP sequence localised in EBNA 2 gene. *Virus Genes* 29 99-108.

Stozenberg , Ooka T. (1990)
Purification properties of Epstein-Barr DNase expressed in *Escherichia coli* .
J. Virol 64 96-104.

Wei MX., Et Ooka T. (1989) A transforming function of the BARRF1 gene encoded by Epstein- Barr virus. *EMBO J* 8 2897-2903.

Wei MX., Moulin JC., Decaussin G., Berger F., Ooka T. (1994). Expression and tumorigenicity of the Epstein-Barr virus BARRF1 gene in human leukocytes B-lymphocyte cell lines. *Cancer res* 54 1843-1848.

Yaker A (1980) Profil de la morbidité cancéreuse en Algérie 1066-1975. Ed SNED Médecine, ALGER.

Zhang CN., Decaussin g., De Turenne –Tessier., Daillie J., Ooka T. (1987). Identification of an Epstein-Barr virus Specific deoxyribonuclease gene using complementary DNA. *Nucleic acids res.* 15 2707-2717.

Zur Hausen H., Schulte-Holthausen M., Klein G., Henle W., Henle G., Clifford P., Santesson L. (1970) EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinoma of nasopharynx. *Nature* 228 :1056-1058.

GENOTYPAGE DU PAPILLOMAVIRUS HUMAIN EN ALGERIE CHEZ DES PATIENTES PRISES EN CHARGE DANS UN SERVICE DE CHIRURGIE.

Sadouki N.* , Djediat B.** , Khidri A.** , Mezali H.** Bandoui Dj.* ,
Harrouz F.* , Graba A.** , Bouguermouh A.*

*Service de virologie humaine, Institut Pasteur d'Algérie

**Centre Pierre & Marie Curie, CHU Mustapha Alger.

RESUME

L'infection par des HPV oncogènes est la cause nécessaire au développement du cancer du col de l'utérus ; deuxième cancer qui touche la femme en Algérie. L'intérêt de cette étude est de rechercher la distribution des génotypes HPV dans notre pays avant l'introduction du vaccin prophylactique.

L'étude a été réalisée sur 49 biopsies de patientes présentant un cancer du col de l'utérus. 47 cas ont été retenus. La prévalence du HPV a été recherchée par PCR Amplicor (Roche Diagnostic System) et le génotypage a été réalisé par le test INNO-LiPA HPV Genotyping system v2. 05 biopsies ont donné des résultats indéterminés.

Les papillomavirus humain oncogènes ont été retrouvés associés au cancers du col dans 95.7% des cas. Le typage de ces différents cas a révélé la présence de l'HPV16 dans 62% des cas. Ce dernier est associé à l'HPV18 dans 71.4% des cas. Les 28.6 % restant sont dues à d'autres types HPV oncogènes. Parmi ces types HPV39 a été retrouvé pratiquement autant de fois que l'HPV18. Cette étude a également révélé que 33.3% des patientes ont présenté des infections avec des HPV multiples.

Nos résultats confirment que l'HPV16 est le type majoritairement retrouvé en Algérie. La vaccination par le vaccin prophylactique contre le type 16 et 18 en association avec la poursuite du dépistage des lésions permettra de prévenir et de diminuer le taux de cancer du col en Algérie.

Mots clés : Papillomavirus, cancer du col de l'utérus, génotypage.

SUMMARY

Infection with oncogenic human papillomavirus (HPV) types is a necessary cause of cervical cancer, the second most frequently occurring cancer in women worldwide, with geographical differences in their distribution. Data on the local distribution are now of interest, before the introduction of HPV type specific prophylactic vaccines.

Search and typing were performed by polymerase chain reaction (PCR) using the recently developed PCR-based Amplicor HPV test (Roche molecular system) for the detection of 13 HR HPV types. A reverse line blot hybridization assay (Innogenetics) was used to investigate HPV type distribution.

A total of 49 biopsies of women with cervical carcinoma were tested for the presence of HPV DNA by PCR-based Amplicor HPV test (two of them have been excluded from the study because they haven't shown the amplification of the β -globine gene) 45 of 47 positive cases (95.7%) were found to be positive for HPV DNA and were evaluated using the genotyping test INNO-LiPA. HPV16 was the most prevalent genotype, constituting 26 of 42 positive cases (62%). It has been found associated with HPV18 in 71.4% of the cases. The remain 28.6% of the cervical cancer studied were associated to the other oncogenic HPV type, with a high prevalence of HPV39. This finding should be confirmed on much more samples. This study showed also 33.3% of multiple HPV type infection in one individual, which could play an important role in the disease progression.

Our results confirm that HPV16 has a very high prevalence among women with invasive cancer in Algeria. Therefore, the use of a prophylactic vaccine for type 16 and 18 in combination with lesion screening could prevent and reduce significantly this carcinoma.

INTRODUCTION

Le cancer du col représente environ 10% de tous les cancers chez la femme. Il vient par sa fréquence en deuxième position après le cancer du sein. Dans le monde 500 000 nouveau cas par an sont observés et entraînent environ 275 000 décès [Ferlay J. & al. 2004, Coursaget P. & al. 2006].

Il est actuellement admis qu'une infection par les papillomavirus (HPV) génitaux dits à haut risque est la cause nécessaire au développement du cancer du col de l'utérus. Dans tous les cas ce cancer est associé à une infection par un HPV (IARC Press, 2005).

Il existe plus de 140 génotypes HPV différents, 40 d'entre eux ont un tropisme ano-génitale, dont 15 HPV sont dit à haut risque.

Dans le monde l'HPV16 et 18 sont les types les plus souvent associés aux cancers du col de l'utérus. Ils représentent 70 % des types associés à cette tumeur maligne. Ils sont détectés chez 2.5% des femmes dans le monde et chez 1.3% des femmes en Europe (Clifford GM & al. 2005). Ces données justifient la mise au point de deux vaccins anti cancer du col de l'utérus qui ciblent principalement ces deux types d'HPV (HPV16 & 18).

Les résultats de différentes études effectuées à l'institut pasteur d'Algérie montrent que les types 16 et 18 sont les plus fréquemment retrouvés au niveau de la tumeur maligne du col. Ils représentent 70 à 73 % des types HPV associés aux cancers. Mais les ratios entre ces deux types fluctuent selon les différentes études.

Nous connaissons par ailleurs mal la fréquence des autres génotypes qui peuvent éventuellement se répandre plus largement chez la femme algérienne.

Le but de cette étude est donc de déterminer la situation actuelle des types qui circulent dans la population algérienne avant l'introduction du vaccin anti HPV.

MATERIELS ET METHODES

Matériel biologique

L'étude a porté sur 49 biopsies du col utérin de patientes âgées entre 35 et 85 ans. Il s'agit dans 43 cas d'un carcinome épidermoïde du col utérin et dans 06 cas d'un cancer in situ (CIS).

Les biopsies ont été collectées au service de chirurgie (CPMC) du CHU Mustapha (Alger) – Pr. A. Graba-

Chaque biopsie est partagée en deux fragments, l'un est adressé au service d'anatomopathologie du Centre Pierre Marie Curie, pour l'étude histologique, l'autre partie est destinée à la détection et au typage du papillomavirus humain au service de virologie humaine à l'Institut Pasteur d'Algérie.

Méthodes

Test Amplicor HPV (Roche)

Les échantillons de cellules cervicales ont été prélevés sur milieu PreservCyt et conservés à -20°C jusqu'au moment de leur utilisation.

L'**extraction** de l'ADN du papillomavirus humain est réalisée par un kit "Amplilute liquid medium extraction –Roche-". Une séquence nucléotidique de 165pb située dans la région L1 polymorphe du génome HPV est amplifiée par un pool d'amorces contenu dans le mélange réactionnel, conçu pour amplifier l'ADN de 13 génotypes haut risque (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, et 68). Une paire d'amorces supplémentaires ciblent le gène de la β -globine humaine (amplicon de 268pb) utilisé comme contrôle de l'adéquation de l'extraction et de l'amplification des cellules.

Pour l'**hybridation** : une dénaturation chimique des amplicons HPV et β -globine est réalisée par l'ajout de la solution de dénaturation. Une partie aliquote d'amplicons dénaturés HPV et β -globine (marqués à la biotine) sont transférés dans des puits distincts des microplaques (MWP) équipées de sondes HPV à haut risque ou de sondes oligonucléotidiques spécifiques de la β -globine.

La **détection** des hybrides est réalisée après lavage qui permet d'éliminer tout ce qui n'est pas fixé. Un conjugué avidine couplé à une peroxydase est ajouté. Il se fixe sur les amplicons biotinilés eux mêmes hybridés à la sonde (HPV HR ou β -globine) immobilisée sur la plaque.

Une réaction colorimétrique est obtenue par l'ajout d'un substrat chromogène. La lecture de la densité optique est réalisée à une longueur d'onde de 450nm après l'arrêt de la réaction par l'ajout d'un l'acide.

INNO-LiPA HPV Genotyping v₂ :

- **Amplification** de l'ADN HPV est directement réalisée sur l'extrait d'ADN obtenu par le kit "Amplilute liquid medium extraction –Roche-". Les oligonucléotides SPF10 permettent l'amplification d'un fragment de 65pb du cadre de l'ORF du gène L1. Il permet la détection d'au moins 25 types d'HPV.

La PCR est effectuée dans un volume final de 50µl, contenant 10µl d'extrait d'ADN et 40µl du mixte, constitué de : 10mmol/litre Tris-HCL (pH 9.9), 50mmol/litre Kcl, 2.0 mmol/litre Mgcl₂, 0.1% Triton X-100, 0.01% gelatine, 200µmol/litre de chaque désoxynucléotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et 15 pmol de chaque amorce marquée à la biotine à l'extrémité 5' et 1.5 U de la Taq DNA polymérase (Amersham Biosciences). Après un chauffage de 09 mn à 94°C , 40 cycles de la PCR (30sec à 94°C, 45sec à 52°C, 45sec à 72°C) et une extension finale pendant 5mn à 72°C. un témoin positif et négatif sont inclus dans chaque série d'amplification.

Le géotypage est réalisé par l'hybridation réverse LiPA (line probe assay), par l'utilisation de L'INNO-LiPA HPV Genotyping System (Innogenetics). La version SPF LiPA contient des sondes HPV haut risque types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 et 82, des types probablement à haut risque : 26, 53 et 66. Les HPV type Bas Risque : 6, 11, 40, 54 et 70. Et les types à risque indéterminé : 30, 34, 67, 69, et 85.

Ces 28 sondes (reconnaissant 25 HPV différents) sont immobilisées en lignes parallèles sur une membrane en nitrocellulose par le biais d'une queue poly dT ajoutée à l'extrémité 3' de chaque oligonucléotide spécifique.

10µl du produit de PCR biotinilé à l'extrémité 5' du primer, sont dénaturés dans une solution alcaline et incubés dans une solution stringente avec une sonde oligonucléotidiques immobilisée sur les membranes de nitrocellulose.

Après un lavage stringent, les hybrides sont détectés par une phosphatase alcaline couplée à une stréptavidine et un substrat 55-bromo-4-chloro-3- indolylphosphate et le nitrobleu de tétrazolium.

Un précipité pourpre au niveau des lignes des sondes permet de révéler les réactions positives.

RESULTATS

L'étude a été effectuée sur 49 biopsies de patientes âgées entre 35 et 80 ans. 43 patientes présentent un carcinome épidermoïde et 06 d'entre elles un cancer in situ du col utérin. Les résultats du typage des 49 biopsies (43 carcinomes épidermoïdes et 6 cancers in situ) en fonction du stade clinique sont représentés dans le tableau -1-.

Les HPV à haut risque ont été mis en évidence par la technique d'amplification (Amplicor –Roche-). Deux échantillons n'ont pas présenté d'amplification du gène de la β globine et ont été éliminés de l'étude. 45 cas sur les 47 biopsies retenues dans l'étude (soit 95.7% des cancers étudiés) sont révélés infectés par les HPV haut risque.

Les résultats du génotypage effectué par le test INNO-LiPA HPV Genotyping a donné un résultat indéterminé dans 05 cas. L'étude est donc réalisée sur un effectif de 42 échantillons. Les résultats sont rapportés dans le tableau -2-.

Table 1 : Répartition des 42 prélèvements HPV positifs selon le type HPV en fonction des résultats histologiques

Type HPV	HISTOLOGIE	
	CIN3 à CIS N= 6	Cancers épidermoïdes N = 36
HPV16	6	10
HPV16/18		4
HPV16/ autre type		6
HPV18		4
Autre type HPV		12

Tableau 2 : Prévalence des différents types de papillomavirus humain dans la population étudiée.

Type HPV	HISTOLOGIE	
	Cancers épidermoïdes N = 42	Pourcentage %
HPV16	16	38.1 %
HPV16/18	3	7.1 %
HPV16/18/68	1	2.3 %
HPV16/31/39/68	1	2.3 %
HPV16/35	1	2.3 %
HPV16/39	1	2.3%
HPV16/56	1	2.3%
HPV16/45/39	1	2.3%
HPV16/45/68	1	2.3%
HPV18	4	9.5 %
HPV31	1	2.3 %
HPV31/45	1	2.3 %
HPV33	1	2.3 %
HPV35	1	2.3 %
HPV39	3	7.1 %
HPH40/51	1	2.3 %
HPV45	1	2.3 %
HPV45/68	1	2.3 %
HPV52	1	2.3 %
HPV39/59	1	2.3%

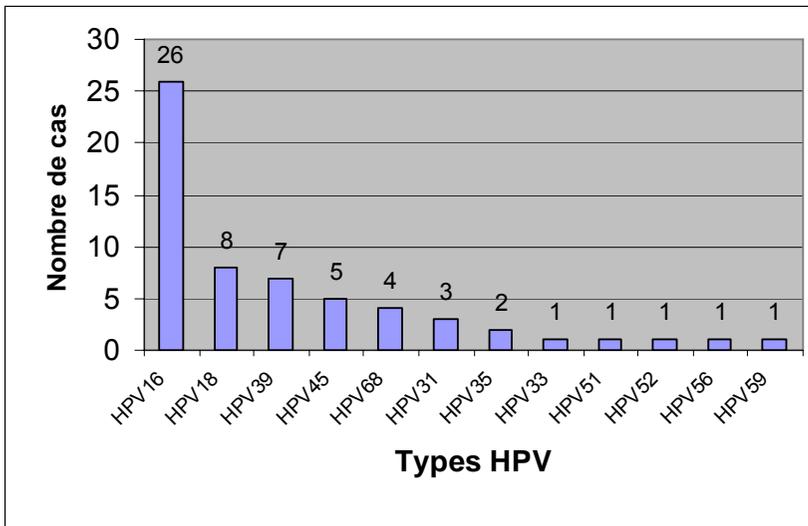


Figure 1 : Répartition des différents types HPV retrouvés seul ou associés chez 42 patientes étudiées.

La répartition de nos résultats en fonction des infections dues à un seul type d'HPV ou à plusieurs types associés montre que :

- HPV 16 / 18 sont les plus fréquemment retrouvés dans notre population

Ils ont été retrouvés seuls ou associés à d'autres HPV

HPV16 seuls ou associés : 26 cas

HPV18 seuls ou associés : 8 cas

Il faut retrancher 4 cas où il y a association HPV16/18, pour avoir le total des patientes infectées par ces deux virus.

HPV16 et 18 a donc été retrouvé chez 30 patientes soit 71.4% de la population étudiée.

- Les autres types d'HPV oncogènes sont donc responsables du cancer du col de l'utérus dans la population étudiée dans 28.6% des cas.
- Dans 28 cas seul un HPV est incriminé
- Une association de 2 à 4 HPV a été observée dans 14 cas. Les résultats de cette association sont détaillés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3 : Répartition des cas d'HPV isolés ou associés au niveau de la tumeur

	Nombre	%	
4 types d'HPV	1	2.4%	33.3%
3 types d'HPV	3	7.1%	
2 types d'HPV	10	23.8%	
1 type isolé	28	66.6%	
Total	42	100%	

DISCUSSION

Dans cette étude, nous observons une fréquence très élevée du papillomavirus humain dans le cancer du col de l'utérus. L'HPV a été mis en évidence dans 95.7% des cas. Plusieurs études effectuées en Algérie depuis 1985 ont montré cette fréquente association : 73%, 92.8%, 97.7% ont été retrouvés par S. Meguini 1992, J. Benyakoub 1997, Hammouda 2004. Des pourcentages beaucoup plus élevés sont rapportés dans la littérature, ils atteignent 99.7% des cas (Walboomers et al, 1999).

Pour ce qui est de la distribution des génotypes HPV dans la population étudiée :

- L'HPV16 est clairement le génotype prédominant dans le cancer du col de l'utérus. Sur les 42 prélèvements étudiés 26 cas ont été retrouvés infectés par l'HPV16 (soit 62% des cas). L'étude réalisée par le docteur Hammouda (génotypage effectuée sur une population de patientes algérienne dans un laboratoire Hollandais en 2004) a montré 60.5% HPV16. Ces études confirment donc que l' HPV16 est le type le plus fréquemment rencontré en Algérie. Cette situation est observée dans pratiquement toutes les régions du monde, même si la proportion du cancer cervicale attribuable à l'HPV16 varie significativement d'une région à l'autre.

En effet selon les résultats retrouvés par la méta analyse effectuée par Clifford 2005 : 50%, 52%, 63% & 62% sont détectés respectivement en Afrique, Amérique du sud et centrale, l'Amérique du Nord et l'Europe. Les résultats de cette étude révèlent que le taux d'HPV 16 observé en Afrique est inférieur à celui retrouvé en Amérique et en Europe.

Cependant nos résultats ainsi que ceux du Dr Hammouda rejoignent ceux de ces deux derniers continents :

- Le second génotype oncogène mis en évidence dans notre étude est l'HPV 18. Sa fréquence (8 cas sur 42 soit 19%) ainsi que celle de tous les autres types oncogènes détectés dans notre étude sont nettement moins importants que celle de l'HPV16.

L'étude faite par le Dr Hammouda a montré 12% HPV18 associé au cancer du col, et selon la méta-analyse de Clifford 15%, 13%, et 10% sont respectivement retrouvés en Amérique du Nord, Europe et l'Amérique centrale et du Sud.

Les autres types d'HPV à haut risque (autre que l'HPV16 et 18) associés au cancer du col de l'utérus correspondent à 28.6% des cas.

Par ordre décroissant ces autres types HPV à haut risque sont retrouvé seul ou associé dans :

HPV39 (16.6%) > HPV45 (11.9) > HPV31 (7.1%) > HPV68 (9.5%) > HPV35 (4.8%) > HPV33 (2.4%).

Nous constatons que HPV39 est détecté dans 07 cas pratiquement autant de fois que l'HPV18 (8cas). Il serait donc intéressant de vérifier sur un nombre plus important de patientes la fréquence relativement élevée de ce sérotype.

A partir de cette étude nous constatons que HPV16 et 18 à eux seuls représentent 71.4% des HPV qui circulent dans la population algérienne. Ceci confirme donc l'intérêt d'introduire le vaccin HPV type spécifique qui permettrait vraisemblablement de réduire considérablement le taux de cancers du col en Algérie, dans le cas où la cancérogenèse reste limitée principalement aux HPV16 et 18. Tandis que dans l'hypothèse d'un gradient cancérigène de différents génotypes, il conviendrait dans les vaccins de génération future de prendre en compte les autres types HPV oncogènes tel que l'HPV39 qui a été retrouvé seul ou associé aux autres HPV dans 16.7% des cas. Pratiquement autant de fois que l'HPV18 (19% des cas). Ceci afin d'éviter un glissement de prévalences, lorsque celle des génotypes 16 et 18 auront été réduites par la vaccination [Dr Lena Edelman 2006].

Concernant la co-infection par plusieurs types d'HPV chez le même patient; le tableau -3- a montré que dans 33.3% des cas étudiés, 2 à 4 types d'HPV ont pu être mis en évidence chez 14 patientes. Dans 66.6% des cas une seule bande soit un seul virus est détecté.

Il faut toutefois signaler que l'un des inconvénients de la technique INNO-LiPA est qu'elle ne met pas toujours en évidence les co-infections à cause de la compétition que présentent les génotypes majoritaires

pour les primers utilisés dans la PCR par rapport aux HPV "mineurs" présents dans l'échantillon.

Plusieurs autres travaux signalent ces infections à HPV multiples que nous retrouvons dans notre étude (Munos et al 2003, Franceschi et al 2003, Halfon et al 2007). Ces mêmes auteurs signalent aussi qu'une infection avec plusieurs HPV haut risque ne constitue pas un risque plus élevé pour le développement d'une néoplasie cervicale, lorsqu'on la compare à une infection avec un HPV haut risque seul mais persistant.

D'autres auteurs pensent que l'infection multiple dans un seul échantillon -suggérant une exposition répétitive- pourrait être à l'origine d'un risque plus élevé d'évolution de la maladie (Hamont et al. 2006 ; Baseman et al. 2005).

Ce taux de co-infection assez élevé et le nombre de cas HPV autre que l'HPV16 et 18 retrouvé dans plus d'un quart des cancers (28.6% des cas) montre l'intérêt de poursuivre le dépistage des lésions et le génotypage du HPV même avec l'arrivée de la vaccination contre les génotypes 16 et 18.

La technique actuellement utilisée et le seul test approuvé par la FDA pour la détection en routine des infections à HPV est le test HC2 (Digene). Ce test permet de mettre en évidence 13 génotypes à haut risque. Il présente une bonne sensibilité et reproductibilité. Cependant plusieurs études récentes ont montré l'inexactitude des résultats de ce test lorsqu'ils sont proches de la valeur seuil Halfon et al. (2007).

Le test développé par innogenetics pour le diagnostic du HPV est le test INNO-LiPA HPV Genotyping. Ce test est facile rapide et simple à mettre en oeuvre. Il permet de diagnostiquer les génotypes HPV les plus importants, notamment les génotypes 6, 11, 16, et 18 présents dans les vaccins prophylactiques les plus avancés. Il a été approuvé récemment. Il constitue un complément important au test de Papanicolaou et aux tests actuels de dépistage du HPV DNA en permettant la confirmation du diagnostic de l'infection HPV.

En outre ce test pourrait avoir un intérêt considérable dans le suivi des femmes vaccinées et permettra de donner une information pertinente sur l'efficacité de la vaccination.

Selon une étude rapportée par Sin Hang Lee (2007), l'introduction d'un des vaccins HPV proposés nécessite un contrôle du génotype de l'infection à HPV avant et après l'immunisation de la population de femme sexuellement active. Car selon une étude soumise à la FDA (26) : l'injection d'un vaccin HPV chez les femmes qui présentent une infection à HPV du même type peut augmenter le risque de développer une lésion précancéreuse de haut grade dans 44.6% des cas par conséquent il serait de ce fait plus prudent d'effectuer un test de

génotypage spécifique si une infection antérieure est suspectée. Ceci montre donc l'intérêt de poursuivre le dépistage et la typage du papillomavirus humain même dans l'ère de la vaccination.

L'idéale peut être serait de vacciner les préadolescentes 12, 13 ans qui ne sont pas porteuse d'HPV et qui sont encore scolarisées.

Certains auteurs proposent une détection primaire de HPV dans les pays en voie de développement en particulier car :

Le FCV est une technique lourde difficile à réaliser et donne près de 30% de résultat faux négatif.

Le dépistage primaire du HPV permettrait d'écartier les femmes HPV négatif et d'espacer (jusqu'à 5 ans) le second examen.

Il ne faut pas oublier que si la vaccination était introduite avant bien entendu les premières infections de la femme par le papillomavirus, il faudrait attendre 20 à 30 ans pour que l'effet de la vaccination se fasse sentir dans la population générale.

CONCLUSION

Selon les résultats de cette présente étude, l'HPV16 est retrouvé chez la majorité des patientes présentant un cancer invasif du col de l'utérus. L'HPV16 et 18 sont les génotypes les plus fréquemment retrouvés en Algérie, comme c'est le cas dans le reste du globe. Leur éradication permettrait de réduire le nombre des cancers du col. Cependant les résultats de la vaccination ne se verront que dans 20 à 30 ans. Ceci montre donc l'intérêt de poursuivre le dépistage par FCV et par le test HPV particulièrement par le test de génotypage type spécifique qui serait intéressant. Essayer de mettre en place tout au moins dans les grandes villes d'Algérie la détection du HPV.

La combinaison vaccination et dépistage permettra sans aucun doute un meilleur contrôle de ce cancer.

BIBLIOGRAPHIE :

Baseman J.G., Koutsky L.A. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of clinical virology* 32S : S16-S24.

Benyacoub J., Boudriche A., Djennaoui T., Bandoui Dj., Ayyach G., Bouguermouh A. ; (1997) ; human papillomavirus infection in Algerian women and its association with cervical lesions. 16th International Papillomavirus conference – Siena- Septembre 5-12 1997.

Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al. (2005). Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys : a pooled analysis. *Lancet*; 366 : 991-8

EDELMAN Lena (2006): Programme de recherche appliquée : papillomavirus et cancer. Institut Pasteur Paris.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globocan (2002). Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. (2004). Lyon : IARC Press. IARC CancerBase n°5, version 2.0.*

Franceschi S., Rajkumar T., Vaccarella S., Gajalakshmi V., Sharmila A., Snijders P.J., Munoz N., Meijer C.J. Herrero R. (2003). Human papilloma and risk for cervical cancer in Chennai, India: a case control study. *Int. J. Cancer*; 107: 127-133.

Hamont D., Ham M., Bakkers J., Massuger L. & Melchers W. (2006). Evaluation of the SPF10-INNO LiPA Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Test and the Roche Linear Array HPV Genotyping Test. *Journal of Clinical Microbiology* . Vol. 44, No. 9, : 3122–3129

Halfon Ph., Trepo E., Antoniotti G., Bernot C., Cart-Lamy Ph., Khiri H., Thibaud D., Marron J., Martineau A., Peñaranda G., Benmoura D., Blanc B. & RBML. Prospective evaluation of the Hybrid Capture 2 and AMPLICOR Human Papillomavirus (HPV) Tests for Detection of 13 High-Risk HPV Genotypes in Atypical Squamous Cells. *Journal of Clinical Microbiology*. (2007) Vol. 45, No. 2 : 313–316.

Hammouda Djouda. (2004) ; Etude cas témoin sur le papillomavirus et ses cofacteurs de risque dans la genèse des cancers du col de l'utérus. Thèse pour l'obtention du grade de docteur en sciences médicales.

IARC Working group (2005). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomavirus. Lyon : IARC Press, Vol 90.

Munos N. Bosch FX., De Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah KV. Snijder PJ. Meijer CJ. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirustypes associated with cervical cancer. *N. J. J. Med.*; 348 : 518-527.

Meguenni S., El Mahdaoui S., Bandoui Dj., Bouguermouh A., Allouache A., Bendib A., Chouiter A., Djenaoui T., Lalliam N., Bouhadeh A., Bouhadjar H (1992). Detection du DNA des virus du papillomavirus humain (HPV) dans les lésions génitales par hybridation moléculaire. *Arch. Inst. Pasteur Algérie.*, 58 : 291-297.

Sin Hang Lee*, Veronica S Vigliotti, Jessica S Vigliotti and Suri Pappu. Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories *Infectious. Agents and Cancer* (2007) 2 :11.

Walboomers JM., Jacobs MV. Manos MM. Bosch FX., Kummer JA., Shah KV. Snijders PJ. Meijer CJ., Munoz N. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathol.* ; 189 : 12-19.

ETUDE DES IGA ANTI EBV PAR GROUPES D'AGE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CARCINOME NASOPHARYNGIENS EN ALGERIE.

Meister-Babic D, Melouli H , Houali K, El Hadjane M, Cherouati M, Laichi R, Afiane M, Djennaoui D, Ooka T, Bouguermouh A

RESUME

On distingue au Maghreb deux classes d'âge chez les patients atteints de carcinome nasopharyngien (NPC) : les adultes de plus de 30 ans que l'on retrouve dans les régions dites à haut risque et une tranche d'âge de 10 à 40 ans limitée à l'Afrique du Nord. Presque tous les patients de plus de 30 ans produisent des IgA anti EBV de type VCA. Par contre moins de 50% de sérums d'enfants et de jeunes adultes ne montrent pas ce type d'anticorps.

Pour tenter de comprendre cette différence entre les deux tranches d'âge nous avons recherché chez des patients EBV et des sujets sains les IgA contre :

- Le VCA qui est un antigène tardif
- Deux antigènes précoces de l'EBV (EA et DNase)
- La rubéole qui présente la persistance d'IgA spécifiques longtemps après l'infection.

Les IgA anti VCA et anti EA n'ont pas été retrouvées au même niveau chez les jeunes patients comparés aux adultes de plus de 30 ans et aux sujets sains. Les IgA anti DNase et Les IgA antirubéoleuses ne montrent pas de différence significative dans la réponse positive ou négative chez les patients de ≤ 30 ans ou > 30 ans ni chez les sujets sains.

Ces résultats suggèrent qu'une déficience générale des IgA ne semble pas exister chez les jeunes patients atteints de NPC. Cette étude confirme aussi la nécessité de rechercher un test plus performant de diagnostic et de suivi du NPC.

Mots Clés : NPC, IgA EBV, Patients jeunes.

STUDY OF IGA EBV BY AGE GROUPS AMONG NASOPHARYNGEAL CARCINOMA (NPC) PATIENTS IN ALGERIA

In Northern Africa, there is an unusual peak of incidence among young subjects (10-30 years) as well as the more usual occurrence in adults (>30 years) as in the rest of the world.

Almost all the adult NPC patients produce IgA anti VCA. The sera of young NPC patients less than 50% do not show IgA antibodies.

To try to explain these discrepancies we looked for IgA antibodies in sera from rubella patient that persist long after infection and in patients sera against two early antigens (EA and DNase). The IgA antibodies were not found at high level (less than 32%) neither against VCA nor EA in young NPC patients.

On the contrary, NPC patients showed the same level of rubella antibodies in EBV patients and healthy subjects. IgA anti DNase were present in all the sera of the two groups.

These data suggest that there is no general immuno-deficiency in EBV young patients.

This study confirms the need to elaborate a more performing test for the diagnosis and follow-up of NPC.

INTRODUCTION

Le virus Epstein-Barr est associé dans tous les cas au cancer du nasopharynx type II et III (NPC). Cette tumeur affiche de façon inhabituelle au Maghreb l'atteinte de deux groupes d'âge respectivement de 10 à 30 ans et de 40 à 65 ans. (Cammoun et al 1974).

Le premier groupe n'est pas retrouvé dans les pays de haute prévalence (Sud Est Asiatique, Groeland, Alaska) (de Thé 1982). Henlé G et Henlé W indiquent en 1976 que les patients atteints de NPC produisent des IgA anti VCA que l'on retrouve très rarement chez les porteurs sains ou les patients atteints d'autres pathologies associées à l'EBV.

Dés 1985 l'attention est attirée sur le fait que l'on ne met pas en évidence des IgA anti VCA et les IGA anti EA chez plus de la moitié des enfants et jeunes adultes atteints de NPC (Bouguermouh 1985).

Cette absence d'IgA antiVCA chez certains patients reflète-elle une immunodéficience générale des IgA présente dans 1/700 de la population (Roitt, 2201) ou est-elle spécifique de certains antigènes EBV exprimés par le virus au cours du NPC. ?

Pour tenter de répondre à cette question nous avons cherché à mettre en évidence les IgA contre :

- Le VCA qui est un antigène tardif.
- Deux antigènes précoces exprimés par l'EBV (EA et DNase).
- Les antigènes d'un virus provoquant une infection avec persistance d'immunoglobines spécifiques sur une longue période (Morris et al 1985, Pristowoit 1995). Nous avons choisi pour cette étude l'infection rubéoleuse.

MATERIEL ET METHODES

Sujets étudiés :

L'étude a porté sur deux groupes de patients et sujets sains (groupe A et B).

Tous les sérums de patients atteints de NPC de type II et III ont été adressés par le service ORL de l'hôpital Mustapha d'Alger.

- Les sérums des sujets sains du groupe A ont été recueillis au cours d'une enquête séroépidémiologique nationale (1998).
- Les sérums de sujets sains du groupe B ont été prélevés au centre antirabique de l'Institut Pasteur d'Algérie avec l'accord éclairé des intéressés

Ces sérums ont été conservés à -20° jusqu'à usage. Les sérums des patients ont été prélevés avant tout traitement.

Leur répartition est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Répartition des sérums étudiés.

Etat clinique	Age	Nombre	
		Groupe A	Groupe B
NPC	≤ 30 ans	47	23
Sujets sains	≤ 30 ans	35	24
NPC	> 30 ans	75	16
Sujets sains	> 30 ans	37	19

METHODES

La recherche des IgG et des IgA antiVCA et antiEA s'est effectuée par immunofluorescence indirecte sur cellules P3HR-1 et RAJI (Henle G et al 1970). La recherche des IgG anti Rubéoleuse s'est effectuée par ELISA (Behring). Les IgA anti rubéoleuses ont été recherchées par une technique ELISA adaptée dans le service de virologie de l'IPA. (Maidi 1997).

Nous avons utilisé des Kits destinés au diagnostic des IgM antirubeoleuses et remplacé le conjugué anti IgM par un conjugué anti IgA. La mise au point s'est faite sur les kits de diagnostic IgG et IgM de trois laboratoires (Behring, Sanofi-Pasteur et Sorin) en présence de deux sérums anti IgA rubéole positifs (fort et faible) et deux sérums négatifs.

Nous avons procédé à des essais pour déterminer la meilleure dilution possible du conjugué anti IgA humaine.

Le kit Behring IgM antirubéoleuses a été utilisé pour la poursuite de l'étude.

La recherche des IgG et IgA anti DNase EBV s'est effectuée par immunoblotting selon la technique décrite par Stolzenberg en 1996. Cette technique a été modifiée pour la révélation des anticorps anti DNase qui s'est faite par chimioluminescence (Melouli H 1999). Ont été considérés comme positifs les sérums ayant un titre \geq à $\frac{1}{2}$.

RESULTATS

Seront présentés successivement :

- Chez tous les patients et sujets sains les résultats du titrage des IgG anti VCA.
- Chez les patients et sujets sains porteurs d'IgG VCA positifs le titrage :
 - Des IgA anti VCA
 - Des IgA anti EA
 - Des IgG et IgA anti DNase EBV.
- Chez les patients et sujets sains du groupe A, le titrage des IgG et IgA antirubéoleuses.

Détection des anticorps anti VCA :

IgG anti VCA :

Tableau 2 : Recherche des IgG anti VCA chez les patients NPC et sujets sains (groupe A)

Etat clinique	Age	Total	IgG VCA	%
NPC	≤ 30 ans	47	47	100
Sujets sains	≤ 30 ans	36	35	97,2
NPC	> 30 ans	75	75	100
Sujets sains	> 30 ans	37	37	100

Tous les sujets NPC et sujets sains sont porteurs d'IgG anti VCA à l'exception d'un enfant sain de 12 ans.

Tous les sujets du groupe B sont porteurs d'IgG anti VCA (Tableau non représenté dans cette publication)

IgA anti VCA :

Les résultats du dépistage des IgA VCA positives des groupes d'âge seront présentés séparément.

Tableau 3 : Recherche des IgA anti VCA chez les patients et sujets sains (groupe A)

Etat clinique	Age	Total	IgA VCA	%
NPC	≤ 30 ans	47	15	31,9
Sujets sains	≤ 30 ans	35	01	2,8
NPC	> 30 ans	75	73	97,3
Sujets sains	> 30 ans	37	01	2,7

Tableau 4 : Recherche des IgA anti VCA chez les patients et sujets sains (groupe B).

Etat clinique	Age	Total	IgA VCA	%
NPC	≤ 30 ans	23	09	39,1
Sujets sains	≤ 30 ans	16	00	00
NPC	> 30 ans	24	20	80,3
Sujets sains	> 30 ans	19	00	00

Les IgA anti VCA n'ont été mises en évidence respectivement que dans 31,9% et 39,1% des patients d'un âge ≤30 ans des groupes A et B, alors qu'elles sont respectivement présentes dans 97,3% et 80,3% des sérums des patients des groupes A et B.

Détection des anticorps contre les antigènes précoces (EA et DNase) :

IgG EA

Les résultats de la recherche des IgG anti EA ne seront pas présentés sous forme de tableau dans cette publication. Les IgG anti EA sont positifs à 100% dans les sérums de patients atteints de NPC et à 17,4% chez les sujets sains d'âge ≤ 30 ans.

IgA EA

Les IgA anti EA ont été recherchées :

- Chez les patients et sujets sains d'âge ≤ 30 ans du groupe A.
- Chez les patients et sujets sains des deux tranches d'âge du groupe B

Tableau 5 : Recherche des IgA EA chez les patients et sujets sains (groupe A).

Etat clinique	Age	Total	IgA EA	%
NPC	≤ 30 ans	47	06	12,7
Sujets sains	≤ 30 ans	36	00	00

Tableau 6 : Recherche des IgA anti EA chez les patients et sujets sains du groupe B.

Etat clinique	Age	Total	IgA EA	%
NPC	≤ 30 ans	23	09	39,1
Sujets sains	≤ 30 ans	16	00	00
NPC	> 30 ans	24	19	79,2
Sujets sains	> 30 ans	19	00	00

Les résultats indiquent que les sérums de peu d'enfants et de jeunes adultes sont IgA positifs aussi bien dans le groupe A (12.7%) que le groupe B (23,3%). On met en évidence 79,2% de sérums IgA positifs chez les patients NPC d'âge > 30 ans. Aucune trace d'IgA anti EA n'est retrouvée chez les sujets sains.

IgA ANTI Dnase :

Le résultat de la recherche des IgA anti DNase sera présenté dans les tableaux 7 et 8 ainsi que les résultats concernant les IgA anti VCA et anti EA déjà exposés dans les tableaux précédents.

Tableau 7 : Résultat des titrages des anti IgA anti VCA, anti EA et anti DNase (groupe A).

Etat clinique	Age	Total	%		
			IgA VCA	EA	DNase
NPC	≤ 30 ans	47	31,9	12,7	100
Sujets sains	≤ 30 ans	35	2,8	00	00
NPC	> 30 ans	75	97,3	NF	NF
Sujets sains	> 30 ans	37	2,7	NF	NF

Tableau 8 : Résultat des titrages des anti 1gA anti VCA, anti EA, anti DNase (groupe B).

Etat clinique	Age	Total	%		
			IgA VCA	EA	DNase
NPC	≤ 30 ans	23	39,1	23,3	100
Sujets sains	≤ 30 ans	16	00	00	00
NPC	> 30 ans	24	80,3	79,2	100
Sujets sains	> 30 ans	19	00	00	00

Dans cette étude les IgA anti DNase sont présentes à 100% chez les patients atteints de NPC et absentes chez les sujets sains.

Infection antirubeoleuse :

La recherche d'un déficit éventuel en IgA antirubéoleuses a été effectuée uniquement dans le groupe B. Nous avons d'abord titré les IgG antirubéoleuses.

IgG anti rubéoleuses :**Tableau 9 :** Recherche des IgG antirubéoleuses chez les patients NPC et les sujets sains.

Etat clinique	Age	Nombre	Positif	%
NPC	≤ 30 ans	47	45	95,7
Sujets sains	≤ 30 ans	35	32	91,4
NPC	> 30 ans	75	73	97,3
Sujets sains	> 30 ans	23	23	100

Les résultats indiquent que presque tous les sujets sont porteurs d'IgG antirubéoleuses. Pour le dosage des IgA antirubéoleuses ne seront titrés que les sérums IgG positifs.

Les résultats seront présentés en fonction de la présence ou de l'absence des IgA VCA et EA

Tableau 10 : Réponse en IgG antirubéoleuses en fonction de l'état clinique et de la présence ou de l'absence des IgA anti VCA.

IgG R+	IgA VCA	IgG Rubéole +	IgG Rubéole -
Patients N = 45	IgA VCA +	13	2
	IgA VCA -	32	0
Sujets Sains N = 32	IgA VCA + 0		
	IgA VCA - 32	32	0

IgA anti rubéoleuses :

Tableau 11 : Réponse en IgA anti rubéoleuses chez les sujets de moins de 30 ans en fonction de l'état clinique et de la présence ou de l'absence des IgA anti VCA.

	VCA	Nb	IgA R+	IgA R-	Douteux
Patients	IgA +	13	6	4	3
			(46,1%)	(30,7%)	23%
Patients	IgA -	32	19	9	4
			(59,3%)	(28,1%)	(12,5%)
Sujets sains	IgA +	0	-	-	1
Sujets sains	IgA -	32	17	10	5
			(53,13%)	(31,25%)	(15,63)
			$\chi^2 = 0,65$	$\chi^2 = 0,18$	$\chi^2 = 0,25$
			(P = 0,41)	(P = 0,67)	(P = 0,61)

Il n'a aucune différence significative pour la présence des sérums rubéole + entre les patients IgA VCA +, IgA VCA --, sujets sains IgA VCA -

IgA anti EA :

Les IgA anti rubeoleuses n'ont été recherchées que chez les sujets d'âge ≤ 30 ans dans le groupe A en fonction de la présence ou de l'absence des IgA anti EA.

Tableau 12 : Réponse en IgA anti rubéoleuses chez les sujets IgG Rubéole + de moins de 30 ans en fonction de l'état clinique et de la présence ou de l'absence des IgA anti EA.

	IgG R+	IgA EA	IgA R+	IgA R-	Douteux
Patients N=45	IgA +	6	2	3	1
			(33,3%)	(50%)	(16,6%)
Patients N=45	IgA -	39	23	10	6
			(59%)	(25,6%)	(15,3%)
Sujets sains N=32	IgA -	32	17	10	5
			(53,1%)	(31,2%)	(15,6%)
			$\chi^2=5,99$ (p=0,05)		

Il y a une différence significative entre les résultats IgA R+ en fonction des IgA EA+ou IgA EA - .

DISCUSSION

Le virus Epstein-Barr est associé de façon constante au cancer du nasopharynx (NPC) de type II et III (Zur Hausen et al 1970, Henle et al 1973, de Thé 1982). Nos résultats montrent la présence d'IgG anti VCA chez tous les patients atteints de NPC mais aussi chez tous les sujets sains à l'exception d'un enfant de 12 ans. Les résultats concernant les sujets sains s'expliquent par le fait qu'à 11-15 ans 80 à 89% des enfants en Algérie ont déjà rencontré le virus. Ce cancer à la différence des NPC des régions à haut risque où il n'apparaît principalement qu'après 30 ans, touche au Maghreb les enfants, les adolescents, jeunes adultes aussi bien que les sujets âgés de plus de 30 ans.(Cammoun et al 1974, Djennaoui 1991).

Des différences ont été observées entre les variants EBV présents dans le Sud est asiatique et ceux étudiés en Afrique du Nord.(Lung et al 1992, Bouzid et al 1994, Bouzid et al 1998, Busson et al 2004). Sbih-Lammali (1996) ne relève pas de différence significative, selon l'âge dans l'expression du gène EBV et des protooncogènes. Deux études effectuées en Tunisie retrouvent moins de tumeurs p53 positives et une quantité plus importantes de protéine LMP1 chez le jeune patient par rapport à des patients âgés de plus de 30 ans.(Khebir A et al 2000, Khebir A et al 2005).

Il existe par contre une différence très nette de la réponse de l'hôte. On observe une absence ou un taux faible des IgA anti VCA et anti EA chez les enfants et jeunes adultes par rapport aux patients âgés de plus de 30 ans. Cette différence signalée dès 1985 est observée dans toutes les études effectuées dans notre pays. (Bouguermouh 1985, Stolzenberg et al 1996, Melouli 1999). Le résultat des titrages effectués dans cette étude est éloquent:

Tableau 13 : Titrages des IgA anti VCA en fonction de l'âge

1985	Age	Notre étude		
		Groupe A	Groupe A	%
	≤ 30 ans	48,8	31	39,1
	> 30 ans	84	97,3	80,3

Nous n'avons pas retrouvé d'IgA anti VCA chez les sujets sains en 1985. Ils sont présents dans 2,85% et 2,70% des cas chez les sujets sains examinés dans cette étude. Les IgA anti EA ne sont pas détectés chez les sujets sains examinés au cours de cette étude. Ils apparaissent dans seulement 12,7% et 23,3% chez les jeunes d'âge ≤ 30 ans. Ils sont fréquents chez les adultes âgés de >30 ans. (79,2%).

J et W Henlé avaient souligné l'importance des IgA anti VCA et anti EA dans le diagnostic du NPC. Les auteurs chinois avaient montré l'intérêt de la recherche de ces anticorps dans le diagnostic précoce de la tumeur maligne au cours d'une enquête séro-épidémiologique portant sur 39.000 sujets dans la région de Guangxi. Les IgA anti EA seraient plus spécifiques que les IgA anti VCA. (Ooka et al, 1991). Certains auteurs cités par Busson et al(2004) émettent des doutes sur la grande spécificité de ces tests dans le cadre d'une enquête séro-épidémiologique

Il faut toutefois souligner l'intérêt de ce titrage dans le suivi de la maladie puisque les IGA anti EA baissent ou disparaissent après un traitement contre la tumeur mais réapparaissent 6 à 8 mois avant la récurrence (de Vathaire et al, 1988). Ce test paraît peu utile chez les jeunes patients qui sont peu nombreux à présenter des sérums IgA EA positifs. Il semble nécessaire de mettre au point un test performant chez l'enfant et le jeune adulte.

Nous avons recherché les IgA anti DNase chez les jeunes sujets du groupe A et dans les deux tranches d'âge du groupe B. Les IgA anti DNase sont présentes à 100% chez les patients et absentes chez les sujets sains. Des résultats pratiquement identiques sont rapportés par Stolzenberg et al (1996) qui retrouve 99% de patients positifs à la dilution au 1/2 que nous avons utilisée et 92% au 1/10. Seuls 2% de sujets sains ont présenté un sérum positif au 1/2 et 92% à la dilution au 1/10. Melouli H dans une thèse présentée en 1999 confirme que tous les patients quel que soit leur âge produisent des anticorps anti DNase. Ce test peut donc être utilisé pour un diagnostic précoce et un suivi du NPC. Il indique en outre que l'enfant est en mesure de produire des IgA contre un antigène au même titre que l'adulte.

Pour apporter une preuve supplémentaire de ce que les patients d'âge ≤ 30 ans IgA VCA— et IgA EA— produisent des IgA au même titre que les autres sujets contre des infections chez qui persistent durant une longue période des immunoglobines spécifiques nous avons recherché les IgA anti rubéoleuse dans les deux tranches d'âge étudiées aussi bien chez les patients que les sujets sains. Le tableau suivant indique la même circulation du virus rubéoleux et EBV à un âge précoce.

Tableau 14 : Détection des IgG antirubéoleuses et des IgG antiVCA EBV selon l'âge.

Age	Rubéole		EBV
	(1970)	(1998)	(1985)
1 – 15 ans	80	89	94,5
16 – 35 ans	92,9	90	99 - 100

La prévalence des IgG anti VCA aux tranches d'âge indiquées sur le tableau 14 a été confirmée par des études plus récentes sur un nombre d'échantillons plus limité.

Les anticorps IgA + antirubéoleux sont pratiquement retrouvés au même niveau chez les patients IgA VCA +, IgA VCA –, EA + et EA–. Ils sont dépistés plus fréquemment chez les sujets IgA VCA – que chez les sujets IgG VCA +.

Ces résultats semblent indiquer que l'enfant et le jeune adulte ne paraissent pas IgA immuno déficients. Des études en cours (thèse d'état : Mélouli) tentent de déterminer les causes de l'absence de détection des IgA VCA et EA chez certains patients atteints de NPC.

La recherche de tests plus performants permettant un diagnostic plus précoce et le suivi des NPC fait l'objet d'études dans de nombreux laboratoires. Les protéines précoces représentent une cible privilégiée (Sbih-Lammali 2007). Les anticorps contre la thymidine kinase, la protéine Zebra paraissent intéressants (Dardari et al 2000, Busson et al 2004).

BIBLIOGRAPHIE

Ablashi D, Allal L, Armstrong G, Bouguermouh A, Pearson G, Levine P et al (1981). Some characteristics of nasopharyngeal carcinoma in Algeria. Grundmann et al. (eds) Cancer Campaign, 5, 157-167. Gustav Fischer Verlag.

Armstrong G, Ablashi DV, Pearson G, Krueger G, Easton J.M, Bouguermouh A, Allal L, Prasad U, Connelly R. (1981). Comparison of Epstein-Barr virus Antigens in nasopharyngeal carcinoma from intermediate and Low Risk populations. Grundmann et al (eds) Cancer Campagn, 5 169-177. Gustav Fischer Verlag.

Bouguermouh A (1985) : Thèse de DEMS. Université d'Alger

Bouguermouh A, Bouguermouh I, Fatnassi S. (1970). Introduction à une enquête immuologique sur la rubéole à Alger. Arch. Inst. Pasteur Algérie. 48 193-1996.

Bouزيد M, Djennaoui D, Dubreuil C, Bouguermouh A, Ellouz D, Abdelwahab J, Decaussin G, Ooka T. (1994). Epstein-Barr virus genotypes in NPC biopsies from North Africa. Int.j. cancer 56 1-6.

Bouزيد M, Sheng W, Buisson M, Bouguermouh A, Morand p, Seigneurin JM, Ooka T.(1998). Different distribution of H1-H2 Epstein Barr virus variant in oropharyngeal virus and in biopsies of Hodgkin's disease and in nasopharyngeal carcinoma from Algeria. Int. j.Cancer 77,205-210 (author errata in int. J. Cancer 1999 80 485)

Busson P, Ooka T, Corbex M. (2004). Carcinomes nasopharyngés associés au virus Epstein-Barr. Del'épidémiologie à la thérapeutique et au dépistage. Medecine/sciences . 20 453-457.

Dardari r, Khyati M, Benider A, Jouhadi H, Kahlain A, et al. (2000). Antibodies to Epstein-Barr virus transactivator protein (Zebra) as avaluable biomarker in young patients with nasopharyngeal carcinoma. Int. J. Cancer. 86 71-75

Lung M, and Chang G. (1992). Detection of distinct Epstein-Barr virus genotypes in NPC biopsies from southern chinese and caucasiens. Int. J. Cancer 52 34-37

De Vathaire F, Sancho-Garnier H, Pieddeloup C, et al (1988). Prognostic value of EBV markers in the clinical management of nasopharyngeal carcinoma (NPC): a multicenter follow-up study. Int. J. Cancer 42-76.

De Thé G. (1982). Epidemiology of Epstein-Barr Virus and associated diseases in man. The Herpesviruses edited by Roisman Plenum Press pp 25-103.

Morris G.E, Coleman J.M, Best B.B, Benevato and Nahmias A.J. (1985). Persistence of serum IgA antibodies to Herpes simplex, Cytomegalovirus and Rubella detected by ELISA. J. Med. Virol. 16. 343-349.

Djennaoui D (1991): Le carcinome du Nasopharynx. Etude Epidémiologique – Facteurs Etiologique. Thèse de DEMS. Université d'Alger

Henle G and Henle W. (1976). Epstein-Barr virus specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. Int. J. cancer. 17 1-7.

Ooka T, de Turenne-Tessier M, Stolzenberg MC. (1991). Relationship between antibody production of Epstein-Barr virus (EBV) early antigens and various EBV related diseases. Epstein-Barr virus immunopathology. Springer Semin. Immunopathol 13 233-247

Roitt I, Brostoff J, Male D, (2001) Immunology Sixth edition

Sbih-Lammali, Djennaoui D, Belaoui H, Bouguermouh A, Decaussin G and Ooka T. (1996) Transcriptional Expression of Epstein-Barr virus genes and protooncogenes in North African Nasopharyngeal carcinoma. J. Med. Virology. 49 7-14

Stolzenberg MC, Debouze S, NG m, Shen J, Choy D, Bouguermouh A, Chan kh, Ooka T. (1996). Purified recombinant EBV desoxyribonuclease diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. Int. J. Cancer. 66. 337-341.

Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt's tumors and anaplastic carcinoma of the nasopharynx. Nature 228 1056-1058.

**SEROPREVALENCE DES ANTICORPS ANTI-POLIOVIRUS
CHEZ DES NOURRISSONS A LA VEILLE DU RAPPEL DE 18
MOIS PAR LE VPO DANS LE CENTRE DE VACCINATION DE
STAOUELI**

M. SEGHIER, A. CHOUCANE, D. ANES-BOULAHBAL et S. BOURAOUDE

Laboratoire des Entérovirus. Institut Pasteur d'Algérie

RESUME

Les avantages du vaccin polio oral (VPO) ont fait de lui le vaccin de choix par de nombreux pays, en particulier par ceux en voie de développement, comme le moyen de prévention contre la poliomyélite. Cependant, les taux de séroconversion après 3 prises vaccinales sont nettement meilleurs dans les pays développés et approchent les 100% pour les 3 sérotypes.

Une étude pilote dans un centre de vaccination chez des enfants correctement suivis a montré des taux de séroconversion très satisfaisants, de 100% pour le sérotype 2, 97,6% pour le sérotype 1 et de 93,4% pour le sérotype 3. Toutefois, les titres des anticorps peuvent être bas 12 mois après la dernière prise vaccinale.

SUMMARY

The advantages of the oral polio vaccine (OPV) made him the choice vaccine by many countries, in particular by developing one, as the means of prevention against the poliomyelitis. However, the seroconversion rates after 3 vaccine doses are distinctly better in the developed countries and approach the 100% for the 3 sérotypes.

A pilot survey in a vaccination center at correctly consistent children showed very satisfactory seroconversion rates, of 100% for the sérotype 2, 97,6% for the sérotype 1 and 93,4% for the sérotype 3. However, the serum titers of antipoliiovirus antibodies can be low 12 months after the last vaccine dose.

INTRODUCTION

Les Poliovirus au nombre de 3 sérotypes (1, 2 et 3), responsables de la Poliomyélite, appartiennent au genre Entérovirus de la famille des Picornaviridae et l'immunité naturelle induite est spécifique de type. La transmission des poliovirus se fait principalement par voie orale-fécale. L'intestin est le site principal de la multiplication de ces virus. Pour prévenir la maladie, un vaccin polio oral (VPO) vivant atténué et un vaccin polio inactivé (VPI) sont disponibles. Le VPO induit une immunité locale qui inhibe la réplication du Poliovirus au niveau des muqueuses intestinales, ce qui réduit l'élimination des virus dans les selles et diminue leur transmission. Dans les régions où les poliovirus sauvages sont endémiques, pour arrêter leur circulation, le VPO est le vaccin de choix. Par ailleurs, ces virus vaccinaux vivants sont éliminés dans les selles des vaccinés, se retrouvent dans la nature et entre en compétition avec les virus sauvages. Cette mise en circulation artificielle des poliovirus vaccinaux permet une vaccination naturelle des personnes non vaccinées, en particulier de l'entourage immédiat des vaccinés ou de revacciner les individus déjà vaccinés.

La séroconversion et la séroprévalence des anticorps anti-polio, après vaccination par le VPO, sont diversement appréciées et dépendent respectivement du sérotype et du niveau socio-économique de la population cible, comme cela était rapporté dans les études cliniques de différents pays (1). En effet, les réponses peuvent être différentes si les vaccins sont administrés sous forme monovalente, chaque sérotype seul, ou sous forme trivalente. La réponse humorale est nettement plus élevée contre les sérotypes 1 et 3 dans la forme monovalente que dans la forme trivalente. Pour palier à ce déséquilibre, une formulation a été établie pour permettre une séroconversion simultanée et équilibrée vis à vis des trois sérotypes. Celle la plus utilisée est de 10 :1 :6 (10^6 , 10^5 et $10^{5,5}$ DICT₅₀) respectivement pour PV1, PV2 et PV3. Quant à la séroprévalence, après 3 prises vaccinales de VPO, le taux est nettement plus élevé dans les pays développés, il se rapproche de 100% (2, 3) que dans les pays en développement (1).

Le but de notre étude est d'estimer les taux de séroprévalence des anticorps anti-polio d'une cohorte d'enfants, après 3 prises vaccinales par le VPO. Ces enfants sont pris en charge par un centre de vaccination territorialement compétent, comme il en existe plusieurs qui couvrent tout le pays. Tous ces centres fonctionnent selon le même principe à savoir, toutes les naissances qui leur sont rattachées géographiquement leur sont déclarées et les enfants sont convoqués automatiquement au moment prévu de la vaccination. Avec cette organisation, le taux de couverture de la vaccination de routine pour le VPO a atteint 88% pour les 3 prises vaccinales en 2005 (sources Programme Elargi de Vaccination MSPRH).

MATERIEL ET METHODES

Groupe d'étude

Pour recruter les enfants ayant reçu 3 doses vaccinales de VPO, le choix s'est porté sur ceux âgés d'environ 18 mois et devant recevoir le rappel vaccinal par le VPO. Il s'agit de nourrissons suivis, convoqués par le centre vaccinateur de leur répartition géographique et munis de leur carnet de vaccination et ayant effectivement reçu les doses vaccinales précédentes (naissance, 3^{ème} mois, 4^{ème} mois et 5^{ème} mois). Nous avons opté pour le centre vaccinateur de la localité de Staouéli pour sa proximité, 6 km de notre institut. La vaccination par le VPO est programmée deux fois par semaine.

Les échantillons de sérum

Du sang veineux (1 à 3ml) est prélevé de façon aseptique juste avant la prise vaccinale, par l'équipe du centre de vaccination. Un consentement par écrit des parents et/ou tuteur légal est recueilli. Le tube de sang est placé dans une glacière 2 à 3 heures, temps nécessaire pour son envoi au laboratoire des Entérovirus de l'Institut Pasteur d'Algérie. Le sérum est séparé par centrifugation et gardé à -20°C jusqu'à son examen.

Titrage des anticorps par séro-neutralisation

Un test de neutralisation en microméthode est pratiqué pour la recherche des anticorps neutralisants et protecteurs, selon les recommandations de l'OMS. Brièvement, 50 µl de chaque échantillon de sérum sont dilués de 1/2 en 1/2 dans les puits de microplaques. Des dilutions de sérum de 1/8 à 1/1024 sont utilisées en première intention. Si les titres sont > 1024, des dilutions plus fortes sont effectuées. Certains échantillons sont examinés en double pour la reproductibilité du test. 50µl de poliovirus de référence Sabin type 1, type 2 et type 3, contenant 100 DICT₅₀/50µl sont ajoutés séparément aux dilutions de chacun des sérums. Les microplaques sont incubées 2 heures à 36°C pour la neutralisation des virus. Des cellules L20B (cellules transgéniques de souris portant le récepteur cellulaire spécifique des poliovirus) sont ajoutées dans chaque puits à raison de 100µl à la concentration de 2.10⁵ cellules/ml. Les microplaques sont incubées à 36°C pour au moins 5 jours et examinées quotidiennement pour la lecture des effets cytopathiques (ECP). Le titre d'un sérum correspond à l'inverse de la dilution qui protège 50% des cultures contre un ECP. Des contrôles de cellules, de virus et d'un sérum positif sont inclus dans chaque test. Le titre d'un sérum est calculé selon la méthode de Kärber. Un titre d'anticorps est considéré protecteur contre la poliomyélite s'il est ≥ 8.

RESULTATS

174 enfants sont enrôlés dans l'étude, 7 sont exclus pour quantité de sérum insuffisante. La fréquence des prélèvements est de 8 par semaine en moyenne.

Des anticorps neutralisants protecteurs sont détectés dans 97,6%, 100% et 93,4% des enfants contre les sérotypes poliovirus 1, 2 et 3 respectivement. Les taux de séroconversion contre les poliovirus réunis : les 3 sérotypes ensemble ou deux à deux, sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Taux de séroconversion vis à vis des différents sérotypes pris individuellement et en association.

Poliovirus	Sérotypes						
	1	2	3	1+2+3	1+2	1+3	2+3
Séroconversion %	97,6	100	93,4	91,6	6	0	2,4

Les titres moyens géométriques des anticorps sont de 1253,56 pour le PV sérotype 1, 296,26 pour le PV sérotype 2 et 93,53 pour le PV sérotype 3. Les titres les plus élevés ont été enregistrés avec le sérotype 1 tandis que les titres les plus faibles le sont avec le sérotype 3.

DISCUSSION

Dans l'étude de séroprévalence des anticorps contre la Poliomyélite, la recherche des anticorps protecteurs par neutralisation du virus constitue la méthode de choix. Ces anticorps reflètent l'immunité d'une population et déterminent sa protection contre la maladie. Bien que les taux de séroconversion après 3 doses de VPO trivalent approchent les 100% dans les pays industrialisés (4, 5), les résultats obtenus dans notre étude montrent que la séroconversion est de 100% pour le sérotype 2, elle est de 97,6% pour le sérotype 1 et de 93,4% pour le sérotype 3. Ces taux peuvent paraître meilleurs que ceux enregistrés dans les pays en voie de développement (1). Ils seraient peut-être la résultante de 4 doses de VPO et non pas 3, puisque l'une d'elles est administrée à la naissance. En effet, les IgG maternelles sériques qui passent à l'enfant ont une demi-vie de 1 mois environ et n'empêchent pas le VPO de se multiplier dans l'intestin et de sensibiliser le système immunitaire du nouveau-né, ce qui induit une réponse immune semblable à des enfants plus âgés (6).

Les titres des anticorps relativement bas, en particulier pour le PV sérotype 3, matérialisés par les moyennes géométriques, pourraient être expliqués par la prise en charge différée de la recherche des anticorps, puisque elle a été effectuée 13 mois après la 3^{ème} vaccination par le VPO. Dans des études précédentes de séroprévalence, en comparant les réponses immunes des schémas vaccinaux, vaccins inactivés et atténués seuls et/ou en association, ont montré que les titres des anticorps sont élevés juste après la 3^{ème} prise vaccinale, puis amorcent une diminution durant les 2 années qui suivent pour se stabiliser au-delà de cette période.

BIBLIOGRAPHIE

1. Patriarca P.A., Wright P.F. and John T.J. Factors Affecting the Immunogenicity of Oral Poliovirus Vaccine in Developing Countries: Review. *Reviews of Infectious Diseases* 13, 1991; 926-939).
2. McBean A.M., Thoms M.L., Albrecht P., Cuthie J.C., Bernier R. and the field staff and coordinating committee. Serological response to oral polio vaccine and enhanced-potency inactivated polio vaccines. *Am. J. Epidemiol.* 1988 ;128 : 615-628)
3. Modlin J.F., Halsey N.A., Thoms M.L., Meschievitz C.K., Patriarca P.A. and the Baltimore Area Polio Vaccine Study Group. Humoral and mucosal immunity in infants inducted by three sequential inactivated poliovirus vaccine-live attenuated oral poliovirus vaccine immunization schedules. *J. Infect. Dis* 1997;175 (Suppl 1): S228-34.),
4. Faden H, Modlin JF, Thoms ML, McBean AM, Ferdon MB, Ogra PL. Comparative evaluation of immunization with live attenuated and enhanced-potency inactivated trivalent poliovirus vaccines in childhood: systemic and local immune responses. *J Infect Dis.* 1990 Dec;162(6):1291-1297)
5. T Jacob John, Immune response of neonates to oral poliomyelitis vaccine. *British Medical Journal* Vol. 289 6 October 1984).
6. Faden 1993 et de Bottiger M.A. A study of the sero-immunity that has protected the Swedish population against poliomyelitis for 25 years. *Scand. J. Infect. Dis.* 1987 ;19 : 595-601.)

FLAMBEES EPIDEMIQUES DE MENINGITE ASSOCIEES AU COXSACKIEVIRUS B5 EN ALGERIE EN 2002 ET 2003

M. SEGHIER, A. CHOUCANE, S. BOUDJADJA et S. BOURAOUDE
Laboratoire des Entérovirus. Institut Pasteur d'Algérie

RESUME

Les entérovirus non polio sont une cause majeure des méningites à liquide clair d'origine virale. Leur circulation augmente pendant les saisons chaudes dans les pays tempérés, ce qui peut engendrer des poussées épidémiques de méningite virale.

En Algérie, en 2002 et 2003, une augmentation de la prévalence des méningites a été observée dans diverses régions du pays. Pour le diagnostic virologique, un isolement viral a été effectué à partir des échantillons de LCR et de selles. Une nette prédominance du Coxsackievirus B5 a été retrouvée.

D'autres EVNP isolés n'ont pu être identifiés par les méthodes antigéniques. La biologie moléculaire prend toute sa place actuellement dans l'identification des EVNP.

SUMMARY

Non polio enteroviruses (NPEV) are now the most common cause of viral aseptic meningitis. Their circulation increases during the hot seasons in the temperate countries, which can generate viral meningitis outbreak.

In Algeria, in 2002 and 2003, an increase of the meningitis prevalence has been observed in various regions of the country. Virus isolation was performed from cerebrospinal fluid and stools for a viral diagnosis. The Coxsackievirus B5 is the most virus detected.

Other NPEV isolats have cannot be identified by the antigenic methods. Currently, the molecular biology takes one important place in the identification of the NPEV.

INTRODUCTION

Les Coxsackievirus de sérotype B appartiennent au genre des Entérovirus, de la famille des Picornaviridae. Les Entérovirus Humains (EVH) sont au nombre de 64 sérotypes selon la nouvelle classification basée essentiellement sur les séquences des génomes viraux (1). Ils sont répartis en 4 groupes : les EVH des groupes A à D formés par les Poliovirus (3 sérotypes), les Echovirus (28 sérotypes), les Coxsackievirus A (23 sérotypes), les Coxsackievirus B (6 sérotypes) et les Entérovirus types 68 à 71 (4 sérotypes). Les EVH ont été incriminés dans un nombre très varié de syndromes du moins sévère (rhum banal) à une encéphalite chronique, selon le statut immunitaire des sujets infectés. Ils sont reconnus comme une cause majeure de fièvre aiguë isolée et de méningite virale à liquide clair (2, 3). Les EVH sont ubiquitaires, ils sont disséminés par voie fécale-orale dans la population. La prévalence de la survenue des maladies à entérovirus, en particulier des poussées épidémiques de méningites, est augmentée au cours de la période chaude sous les climats tempérés, ce qui coïncide avec leur circulation accrue pendant cette saison (4). Bien que des poussées épidémiques de méningite associées à un seul sérotype aient été souvent rapportées (5, 6), d'autres sérotypes peuvent être retrouvés en même temps à une moindre fréquence (7). Le sérotype prédominant peut varier annuellement, ou d'une région à une autre et même au cours de la même année.

Les signes cliniques d'une méningite virale peuvent mimer ceux d'une méningite bactérienne. Le diagnostic clinique d'une méningite à entérovirus basée sur la biologie du LCR est difficile quand une pléiocytose est absente, un phénomène qui a été variablement rapporté dans 3 à 40% des patients (7). Les leucocytes varient d'une à plusieurs milliers cellules par mm³, mais le plus souvent restent <1000. Bien que les monocytes soient généralement les cellules les plus nombreuses, la prédominance des neutrophiles non altérés est courante, surtout au début de la maladie. Chez la plupart des patients, les protéines dans le LCR sont dans les limites de la normale, mais dans un petit pourcentage, leur taux peut être bas ou au contraire élevé. Le taux de glucose est habituellement normal mais peut être diminué (7). La détection des virus par isolement sur cellules sensibles, technique nécessitant du temps et ne donnant qu'un % de résultat positif, et actuellement l'outil de biologie moléculaire PCR sont les seules méthodes fiables pour poser un diagnostic virologique des méningites.

En Algérie, des flambées épidémiques locales de méningite à liquide clair ont été notifiées dans différentes régions du pays notamment à Ouargla, Médéa, Tipaza, Oran et Alger en 2002 (8) et Batna, Khenchela en 2003 (9). Les cas ont été enregistrés pendant la période estivale et ont concerné particulièrement les enfants de moins de 15 ans (REM 2003 2002). La recherche d'une étiologie virale a été motivée surtout par les résultats des examens cytologiques et biochimiques des LCR dont, malheureusement, nous n'avons reçu que quelques données éparses.

MATERIEL ET METHODES

Les prélèvements :

Un total de 489 échantillons, répartis en 370 LCR et 119 selles, de patients hospitalisés pour méningite à liquide clair, prélevés dans des tubes stériles et des récipients au moins propres respectivement, ont été adressés au laboratoire, à partir des régions épidémiques au cours des années 2002 et 2003 durant la même période, de juin à octobre pour une recherche d'entérovirus (Tableau 1). Les échantillons de selles et de LCR sont collectés et envoyés dans l'heure qui suit, dans des conditions réfrigérées (glacière et ice boxes) au laboratoire, sinon ils doivent être conservés à une température d'au moins -20°C en attendant leur acheminement. Le LCR étant un prélèvement monomicrobien en cas d'infection, est inoculé directement sur des cellules pour l'isolement. Les selles par contre sont traitées pour éliminer les contaminants avant l'inoculation des cellules.

Traitement des échantillons de selles :

Approximativement 2 à 3g de selles, sont mis en suspension dans 9ml de PBS et de 1 ml de formol additionnés d'antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine) et agités 20mn vigoureusement (agitateur). Après une centrifugation de 20mn à $1500g$ à $+4^{\circ}\text{C}$, les surnageants sont recueillis. Ces derniers aussi bien que les LCR sont partagés, une partie va être utilisée pour l'isolement du virus, et le reste est conservé à -70°C pour des études ultérieures moléculaires ou autres.

Tableau 1 : Distribution par localité des prélèvements reçus

Année	Région	Nombre LCR	Nombre selles
2002	Oran	111	86
	Azzazga	32	0
	Boufarik	04	3
2003	El-Kettar	117	0
	Azzazga	79	09
	Batna	10	18
	Oum el Bouaghi	06	0
	Ras el oued	04	0
	Médéa	04	0
	BBA	03	3

Isolement des virus :

Les prélèvements sont inoculés à des cellules confluentes préparées au préalable dans des tubes pour culture cellulaire. Les isolements sont effectués sur des cellules RD (cellules de rhabdomyosarcome humain) et des cellules KB (cellules de lignée continue d'origine cancéreuse de la bouche humaine), cultivées dans du milieu de croissance constitué par le milieu minimal essentiel de Eagle (EMEM) additionné de 10% sérum de veau fœtal (SFV). Après une bonne confluence des cellules, le milieu de croissance est éliminé et remplacé par du milieu de survie (EMEM additionné de 2% de SFV). 200 µl du prélèvement traité sont ajoutés dans les tubes pour isolement. Les cellules sont incubées à 36°C et examinées quotidiennement durant 14 jours à la recherche d'un effet cytopathogène (ECP) caractéristique des entérovirus, qui sont des virus cytolitiques. Le surnageant cellulaire des cultures montrant un ECP, culture positive, est recueilli pour une identification virale par le test de neutralisation par des antisérums spécifiques.

Test de neutralisation :

Les surnageants de culture avec un ECP positif d'entérovirus sont identifiés par neutralisation en microméthode. Les antisérums utilisés sont ceux de RIVM, constitués en pool et comprenant en tout 45 entérovirus, et ceux dirigés contre les coxsackievirus B de façon monospécifique, fournis respectivement par l'OMS et l'Institut Cantacuzène de Roumanie.

RESULTATS

Au total 147 LCR et 89 prélèvements de selles ont été reçus au laboratoire et examinés en 2002 dont 37 et 31 respectivement, ont donné un isolement positif. Les ECP produits sur cellules sont typiques des Entérovirus. En 2003, le nombre des prélèvements était plus important, du moins pour les LCR avec 223 échantillons. Seuls 25 isolats ont été obtenus.

Les résultats des prélèvements positifs détaillés par année et par localité sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Distribution des prélèvements positifs par année et par localité

Année	Région	Nombre LCR	LCR positifs	Nombre selles	Selles positives
2002	Oran	111	22 (19.8%)	86	29 (33,7%)
	Azzazga	32	14 (43.75%)	0	
	Boufarik	04	2 (50%)	3	2 (75%)
2003	El-Kettar	117	17 (14,5%)	0	
	Azzazga	79	7 (8,9%)	09	1
	Batna	10	1	18	1
	O. Bouaghi	06	0	0	
	Ras el oued	04	0	0	
	Médéa	04	0	0	
	BBA	03	0	3	0

Les souches isolées à partir des LCR et des selles en 2002 et 2003 sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3

Année	Région	LCR positifs		Selles positives	
		Cox B5	Autres EVNP	CoxB5	Autres EVNP
2002	Oran	16	6	23	6
	Azzazga	6	8		
	Boufarik	2	0	2	0
2003	El-Kettar	9	8		
	Azzazga	7	0	1	0
	Batna	1	0	1	0

Dans un seul cas, un coxsachievirus B5 a été isolé dans le LCR et le prélèvement de selles d'un même patient.

DISCUSSION

De juin à octobre pour les deux années de suite 2002 et 2003, des flambées épidémiques de méningite ont été enregistrées dans différentes régions du pays. 489 prélèvements de patients présentant des signes cliniques et biologiques de méningite à liquide clair ont été adressés au laboratoire. Les échantillons se répartissent en 370 LCR et 119 selles prélevés respectivement dans des tubes stériles et des récipients au moins propres au cours de ces périodes, pour une recherche d'entérovirus. Si l'isolement d'un entérovirus à partir d'un LCR signe sans ambiguïté l'étiologie viral, son isolement à partir des selles dans un contexte épidémiologique particulier conforte sa présomption étiologique. Concernant les ages des patients, qui n'étaient pas toujours indiqués, ces flambées épidémiques ont touché particulièrement des enfants de moins de 15 ans avec quelques adultes, dont un homme de 43 ans. Les arguments en faveur d'une étiologie virale, comme la formule cellulaire et les données des analyses biologiques du LCR (protéïnorachie, glucose...) ou la culture stérile bactérienne, sont rarement mentionnés. Parce que les entérovirus ne peuvent pas être tous isolés sur une même lignée cellulaire, leur isolement nécessite l'utilisation d'au moins deux types cellulaires, dans ce cas les cellules KB sont permissives pour les sérotypes Coxsackie B mais pas ou peu pour les autres sérotypes (Echovirus et Coxsackie A). A l'inverse, les cellules RD qui sont permissives pour les Echovirus et Coxsackie A ne le sont pas ou très peu pour les Coxsackie B qui sont incriminés dans les méningites virales au Maghreb (10). Il faut noter que la plupart des EVNP ont été impliqués dans les méningites à liquide clair, plus particulièrement les Echovirus 30, 9, 6, 11 et 13 et les Coxsackie B 5 au cours d'épidémies (11, 12, 13, 14). En Algérie, les isollements pour le diagnostic des méningites à liquide clair avec une forte suspicion virale ne sont pas régulièrement pratiqués, du moins ces dernières années.

Le pourcentage des isollements positifs des LCR qui est de 25% en 2002 est un taux appréciable comparé aux résultats positifs des isollements des LCR en général (14). Ce taux s'explique en partie par une participation active du laboratoire, sollicité par les services demandeurs pour la conservation et d'acheminement dans des conditions adéquates des prélèvements pour l'isolement viral. En 2003, le taux d'isolement est de 11,2%. Le nombre le plus important (117/223) nous a été adressé par le laboratoire d'El-Kettar après étude bactériologique. Afin de garder toute les chances à l'isolement viral il est recommandé de prélever une partie de l'échantillon avant l'étude bactériologique et de le conserver à une température négative (-20°C ou mieux à -80°C) avant de l'envoyer pour examen. La nette circulation des Coxsackie B5, en 2002 et 2003, matérialisée par un isolement dominant de ce sérotype, aussi bien dans les LCR que dans les selles, suggère fortement leur implication dans la genèse de ces flambées

épidémiques. Dans un seul cas le Coxsackie B5 a été isolé dans le LCR et dans les selles d'un même malade. D'autres isolats présentant un ECP caractéristique des Entérovirus ont été mis en évidence, sans pouvoir identifier le sérotype, excepté un Coxsackie B3 et un Echovirus 6. En effet, l'identification sérotypique des EV a ses limites. En premier lieu, les pools d'antisérums utilisés de part le monde (RIVM : The National Institute for Public Health and the Environment : Netherlands et LBM : Lim-Benyesh-Melnick) et dirigés contre ces virus, ne peuvent pas permettre la reconnaissance de tous les isolats cliniques, notamment les variants génétiques. Deuxièmement, des EVNP non typables antigéniquement, caractérisés par l'ECP, sont de plus en plus rencontrés (15). Troisièmement, les progrès des techniques de biologie moléculaire, qui ont fourni aux laboratoires de diagnostic de nouvelles alternatives pour l'identification de ces virus, ont réduit considérablement la disponibilité des antisérums. (16, 17, 18). Actuellement, pour une épidémiologie plus pertinente en matière d'entérovirus, le séquençage d'une partie ou de la totalité des séquences codant pour les antigènes majeurs est indispensable (19).

BIBLIOGRAPHIE

1. Hyypia T., Hovi T., Knowles N. J., and Stanway G. 1997. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J. Gen. Virol.* 78:1–11.
2. Rotbart H. A. 1995. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin. Infect. Dis.* 20:971–981.
3. Rotbart HA. Viral meningitis. *Semin Neurol.* 2000; 20(3):277-92.).
4. Moore M. 1982. Enteroviral disease in the United States, 1970-1979. *J. Infect. Dis.* 146:103-108 biblio).
5. Berkovich S. and S. Kibrick. 1964. ECHO II outbreak in newborn infants and mothers. *Pediatrics* 33:534-540.
6. Dietrich S. and Schreier E. 2001 Aseptic meningitis in Germany associated with echovirus *BMC Infectious Diseases*, 1:14.
7. Wildin S. and T. Chonmaitree. 1987. The importance of the virology laboratory in the diagnosis and management of viral meningitis. *Am. J. Dis. Child* 141:454-457. biblio).
8. *R.E.M., Vol XIII, 2002*
9. *R.E.M. , Vol XIV, 2003*
10. Bahri O., Rezig B., Ben Nedjma-Oueslati B., Ben Yahia A., Ben Sassi J., Hogga N., Sadraoui A. and Triki H. 2005. Enteroviruses in Tunisia : virological surveillance over 12 years (1992-2003). *Journal of Medical microbiologie*, 54, 63-69.
11. Trallero G., Casas I., Tenorio A., Echevarria J.E., Castellanos A., Lozano A. and Brena A. Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988–97). 2000. *Epidemiol Infect.*; 124: 497–506).
12. Outbreaks of aseptic meningitis associated with echoviruses 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity-United States, 2003. *MMWR* 2003;52:761-4.
13. Viral meningitis associated with increase in echovirus type13. *Commun Dis Rep CDR Wkly* 2000, 10:277-280.
14. Gorgievski-Hrisoho M., Schumacher J.D., Vilimonovic N., Germann D. and Matter L. 1998. Detection by PCR of enteroviruses in cerebrospinal fluid during a summer outbreak of aseptic meningitis in Switzerland. *J Clin Microbiol*, 36:2408-2412.
15. Norder H., Bjerregaard L., Magnius L., Lina B., Aymard M., and Chomel J. J.. 2003. Sequencing of 'untypable' enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *J. Gen. Virol.* 84:827– 836.

16. Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R. and Pallansch M. A. 1999. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* 73:1941–1948.
17. Casas I., Palacios G. F., Trallero G., Cisterna D., Freire M.C. and Tenorio A. 2001. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J. Med. Virol.* 65:138–148.
18. Caro V., Guillot S., Delpeyroux F. and Crainic R. 2001. Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 82:79–91).
19. Oberste M.S., Maher K., Flemister M.R., Marchetti G., Kilpatrick D.R. and Pallansch M.A. 2000. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of 'untypeable' enteroviruses. *J Clin Microbiol*; 38:1170-4.

STATUT IMMUNITAIRE ANTI- POLIOMYELITE CHEZ DES ENFANTS DE 2 A 15 ANS : ENQUETE NATIONALE SERO-EPIDEMIOLOGIQUE REALISEE EN 1998 EN ALGERIE

M. SEGHIER, S. BOUDJADJA, A. CHOUCANE et S. BOURAOUDE

Laboratoire des Entérovirus. Institut Pasteur d'Algérie

RESUME

Dans l'objectif d'introduire la vaccination contre l'hépatite B en Algérie, une enquête sur le portage de l'Antigène HBs a été effectuée dans la population générale en 1998. En parallèle, la disponibilité des prélèvements sérologiques a permis une évaluation du statut immunitaire des maladies du PEV et par conséquent d'apprécier la véracité des taux de couverture vaccinale. Une étude représentative a été réalisée pour déterminer le statut sérologique contre la poliomyélite chez les enfants âgés de 2 à 15 ans (n=2365 avec 3 tranches d'âge 2-5, 6-10 et 11-15 ans), population cible dans le cadre de la surveillance de la circulation des poliovirus sauvages en vue de l'éradication de la poliomyélite. Outre la vaccination de routine (calendrier vaccinal), des vaccinations supplémentaires ont été introduites dès 1994. Cette situation a fait que les doses vaccinales administrées étaient comprises entre 5 et 9 doses selon la tranche d'âge des enfants. Pour déterminer le taux des anticorps protecteurs, un test standard en micro neutralisation a été utilisé pour la détermination des niveaux des anticorps. Comme démontré dans d'autres études, la séroconversion est plus fréquente pour le poliovirus sérotype 2 suivi du sérotype 1 et enfin le sérotype 3. Les anticorps neutralisants antipolio1, 2, et 3 sont détectés dans les échantillons à 91,85%, 96,41% et 83,41%, respectivement, dans la population cible. Cette séroprévalence montre un niveau d'immunité relativement élevé, eut égard au nombre de doses administrées. Un taux de couverture vaccinal élevé doit être impérativement maintenu jusqu'à l'éradication totale de la poliomyélite.

Mots clés : Poliomyélite, Vaccin Polio Oral, séroprévalence.

SUMMARY

In the objective to introduce the vaccination against the B hepatitis in Algeria, an investigation on the HBs antigen portage has been done in the general population in 1998. In parallel, has serological withdrawal availability permitted an assessment of the immunity status of the EPI illnesses and therefore to appreciate the veracity of the vaccine cover rates. A representative study was carried out in order to determine the serological status against poliomyelitis at the children aged of 2 at 15 years (n= 2365 with 3 age groups 2-5, 6-10 and 11-15 years), population targets in the setting of the surveillance of the circulation of the wild poliovirus in view of the poliomyelitis eradication. Besides the routine vaccination (vaccine calendar), some supplementary vaccinations have been introduced since 1994. This situation made that of the managed vaccine doses were consisted between 5 and 9 doses according to the age group of the children. To determine the protective anti body rate, a standard micro-neutralization test has been used for determination of antibody levels. As demonstrated in other studies, the seroconversion is more frequent for the poliovirus sérotype 2 follow-up of the sérotype 1 and finally the sérotype 3. The antibodies neutralizing antipolio1, 2, and 3 are detected respectively in the samples to 91.85%, 96.41% and 83.41%, in the population targets. This prevalence shows a relatively elevated immunity level, took into consideration the number of doses managed. A rate of elevated vaccine cover must be maintained imperatively until the total eradication of the poliomyelitis.

INTRODUCTION

La Poliomyélite responsable de paralysie flasque aigue en particulier à l'enfance est due aux poliovirus dont 3 sérotypes sont connus. Ces virus appartiennent au genre entérovirus de la famille *Picornaviridae* (1). Ce sont de petits virus à ARN de polarité positive non enveloppés, ils sont transmis par voie orale fécale d'un individu à l'autre. Bien que l'infection par les poliovirus ne donne pas automatiquement la maladie (1-2% des cas), néanmoins elle reste préoccupante tant sur le plan invalidité individuelle, que sur le coût en santé publique pour la communauté. Les connaissances de la biologie des poliovirus ont permis des avancées importantes dans la prévention de cette maladie par la mise au point de deux types de vaccins trivalents antipoliovirus dont l'efficacité n'est plus à démontrer, l'un inactivé (VPI) (2, 3) et l'autre vivant atténué oral (VPO) (4). Un des objectifs stratégiques de l'OMS est l'éradication de la poliomyélite (OMS 1988) dans toutes les régions du monde aux horizons 2000. L'initiative mondiale de l'introduction massive de la vaccination antipoliomyélitique a permis de faire chuter le nombre des cas de 90 % ; on est passé de plus de 35 000 cas signalés en 1988 à moins de 4 000, aujourd'hui (5). Afin d'arriver à l'objectif fixé, il faut veiller à maintenir un niveau d'immunité élevé dans la population. En Algérie, la vaccination contre les maladies du PEV en général et contre la poliomyélite en particulier a été nettement soutenue depuis le milieu des années 60. Pour évaluer cette vaccination, un statut immunitaire des maladies du PEV a été réalisé au cours de l'enquête séro-épidémiologique nationale, initiée par le Ministère de la Santé Publique et de la Réforme Hospitalière en collaboration avec l'Institut National de la Santé Publique, pour le volet échantillonnage et analyse des données, et l'Institut Pasteur d'Algérie, pour le volet analyse des prélèvements, pour la recherche du taux de portage de l'Antigène HBs dans la population. La valeur de ce taux devait être l'argument décisionnel pour l'introduction ou non de la vaccination contre l'hépatite B.

MATERIEL ET METHODES

Les prélèvements :

L'enquête a concerné la population générale au niveau national (échantillonnage réalisé par l'INSP) par pour une étude du statut immunitaire portant sur les maladies du PEV (poliomyélite, rougeole, diphtérie et tétanos) et l'antigène HBs. Le nombre de personnes considéré est identique dans les deux sexes (sexe ration voisin de 1). Pour les commodités de l'étude, les individus sont répartis en tranches d'âge, au nombre de 10. Enfin, pour une meilleure prise en charge, il a été réalisé un partage du territoire en cinq régions : centre, Ouest, Sud Ouest, Est et Sud Est.

Les sujets recrutés sont les patients se présentant pour une urgence au niveau des hôpitaux, des secteurs sanitaires et urgences des CHU aussi bien pédiatriques que grands enfants et adultes. Sont exclus de cette étude tous les patients présentant une atteinte pouvant influencer l'immunité (néoplasie, traitement immunosuppresseur, corticothérapie au long cours, fièvre éruptive, personnes ou ayant reçu des gammaglobulines ou autres produits sanguins dans les 6 mois précédant l'enquête).

Les échantillons recueillis sur place ont été traités et les sérums adressés dans des conditions stériles à l'Institut Pasteur d'Algérie où ils ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Pour la poliomyélite, seules les tranches d'âge 2-5, 6-10 et 11-15 ans, totalisant 2391 enfants, ont été concernées. Ce choix a été dicté surtout en référence au programme de l'éradication de la poliomyélite portant sur la surveillance et l'investigation virologique des PFA survenant chez les enfants de moins de 15 ans.

Technique de laboratoire :

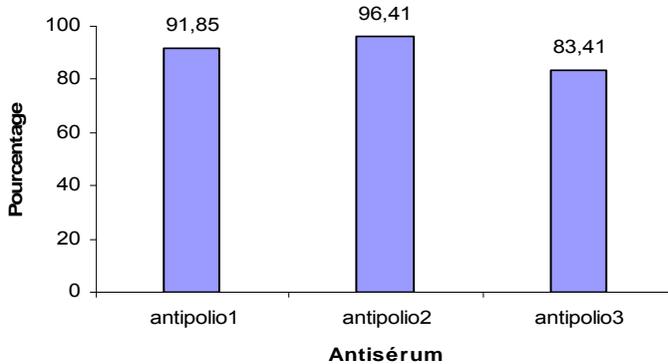
Le titre en anticorps déterminé par le test de neutralisation est considéré comme le meilleur reflet du niveau de protection acquise après une exposition naturelle à la maladie ou après vaccination. Le test est effectué en microméthode selon les recommandations de l'OMS (6). Brièvement, les échantillons de sérum stériles sont dilués de $\frac{1}{2}$ en $\frac{1}{2}$. Les dilutions 1/4 à 1/64 sont déposées dans les puits de microplaques (96 puits) en présence de 100 DICT₅₀ (Doses infectieuses en Culture de Tissus) des trois sérotypes poliovirus vaccinaux (Sabin1, Sabin2 et Sabin3). Après un temps de contact suffisant, des cellules HEp2 (cellules cancéreuses du larynx humain) sont ajoutées et les microplaques sont incubées à 36°C. Une lecture quotidienne est effectuée durant 5 jours de suite et les ECP (Effets cytopathiques) sont notés. Les titres neutralisants, calculés par la méthode de Kärber, sont exprimés comme l'inverse de la dilution de sérum donnant une absence d'ECP dans 50% des puits. Le taux d'anticorps est considéré protecteur si le titre est strictement supérieur à 4.

RESULTATS

Sur un total de 2391 enfants recrutés dans notre étude, 2365 sérums ont été analysés. Les sérums de 26 enfants n'ont pas pu être étudiés pour soit hémolyse du sérum soit insuffisance ou non réception de ce dernier.

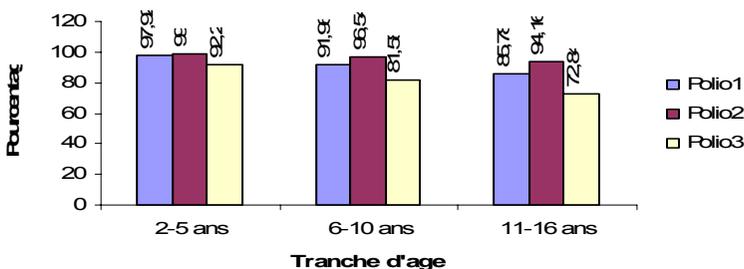
Les séroprévalences vis-à-vis des 3 sérotypes poliovirus 1, 2 et 3 sont respectivement 91,85%, 96,41% et 83,41% (figure 1). 77,34% présentent des anticorps contre les trois sérotypes réunis, alors que 12,86% sont immunisés contre les sérotypes 1 et 2 réunis, 3,8% contre les sérotypes 2 et 3 et seulement 1% contre les sérotypes 1 et 3. Il est à noter que seulement 0,7% des enfants ne sont pas protégés contre les 3 sérotypes poliovirus réunis.

Figure 1 : Taux de séroprévalence des anticorps antipoliomyélitiques : enfants de 2 à 15 ans en Algérie



Au niveau de chacune des 3 tranches d'âge étudiées, la prévalence des anticorps antipoliavirus 2 est toujours supérieure à celle des anticorps antipolio 1 qui est supérieure à celle du polio 3 (figure 2). La comparaison des trois tranches d'âge entre elles montre une séroprévalence décroissante des anticorps antipoliavirus avec l'augmentation de l'âge des enfants.

Figure 2 : Taux de séroprévalence des anticorps antipolio selon les tranches d'âge en 1998 en Algérie



DISCUSSION

L'efficacité des vaccins disponibles et l'importance des données biologiques réunies sur le poliovirus ont permis à l'Organisation mondiale de la santé (OMS) de lancer en 1988 un programme de vaccination visant à éradiquer la poliomyélite paralytique pour l'an 2000 (7). Depuis, des progrès considérables ont été réalisés en vue d'améliorer la couverture vaccinale mondiale.

La politique avant-gardiste vaccinale de l'Algérie, le vaccin polio inactivé a été utilisé en association avec le DTCoq dès la moitié des années 60 et le vaccin polio oral a été intégré dans le calendrier national de vaccination au début des années 70, fait qu'elle adhéra par la suite parfaitement à cet objectif. Pour cela, il a été décidé d'installer, en 1992, une Commission Nationale d'Eradication de la Poliomyélite qui a élaboré et diffusé un plan d'action (instruction n°459 MSP/DP/SDSMI dans lequel les principales stratégies étaient l'amélioration du système de surveillance de tous les cas suspects de poliomyélite et l'amélioration de la couverture vaccinale. En effet, des consolidations de la vaccination par un système de vaccination d'appoint (Journées Nationales de Vaccination, JNVs) ont été organisées en deux phases à un mois d'intervalle, touchant les enfants de 5 ans et moins, successivement en 1994, 1995, 1996 et 1997 avec des taux de couverture vaccinale moyens de 75%, 85,5%, 89,5% et 92% respectivement (8). D'un autre côté, ceux de la couverture de routine, pour les mêmes années, étaient respectivement de 75%, 74%, 77% et 79%. Le calendrier vaccinal de routine a été renforcé dès 1997 par une dose de vaccin à la naissance en plus de celles administrées à 3, 4, 5, 18 mois et 6 ans.

La présente étude avait pour objectif d'évaluer la vaccination par le VPO contre la poliomyélite à l'échelle Nationale par l'estimation du statut immunitaire des enfants de moins de 15 ans, mais aussi indirectement d'évaluer la fiabilité des données du programme élargi de vaccination (PEV) en matière de couverture vaccinale. Le nombre de prises vaccinales varie selon la tranche d'âge considérée. En effet, celle allant de 11 à 15 ans est sensée avoir reçu uniquement la vaccination de routine, au nombre de 5 doses, car tous les enfants de cette tranche d'âge avaient plus de 5 ans en 1994. Dans la tranche d'âge moyenne, 6-10 ans, touchée par les JNV, le nombre de doses reçu est variable, il diminue avec l'augmentation de l'âge. Il varie entre 5 et 9 prises vaccinales, au total, avec la vaccination de routine. Enfin pour la tranche d'âge la plus jeune 2 à 5 ans, la tendance est inversée, puisque le nombre de prise vaccinale est plus important chez les plus âgés et oscille entre 6 et 8 prises.

Les résultats obtenus ont montré des taux de séroprévalence de 91,85%, 96,41% et 83,41% vis-à-vis des trois sérotypes poliovirus 1, 2 et 3 respectivement, en réponse à des nombres de doses vaccinales au minimum de 5 à un maximum de 9. Tout d'abord nous constatons une meilleure séroconversion, par ordre décroissant, contre le sérotype 2, suivi du sérotype 1 et le sérotype 3 enfin. La raison première est qu'il ait été

reconnu très tôt dans le développement des vaccins vivants atténués que les trois virus vaccinaux Sabin possèdent des caractéristiques différentes de croissance. Spécialement, le type 2, quand administré en association avec les deux autres sérotypes, tend d'exclure leur développement, particulièrement après la première dose. Le ratio de la formulation, qui est de 10 : 1 : 6 pour respectivement Sabin 1, Sabin 2 et Sabin 3, dans le mélange des vaccins (trivalents) donne l'avantage au sérotype 1 car plus épidémiogène, expliquerait en partie la supériorité de la réponse immune à ce dernier par rapport au sérotype 3.

En ce qui concerne les taux de séroconversion (ou de séroprévalence), de nombreuses variations ont été rapportées dans différentes études (9). L'expérience générale montre que les taux de séroprévalence dans les pays en voie de développement sont souvent inférieurs (Sabin1 72%, Sabin2 95% et Sabin3 65%) à ceux des pays industrialisés (100% pour les 3 Sérotypes) après 3 doses (10, 11). Une analyse formelle de ces données est difficile étant donné les différences majeures qui existent dans l'étude des populations. Cependant, certains facteurs contribuant à la mauvaise réponse dans les pays en voie de développement peuvent être suggérés, portant tant sur le vaccin lui-même que sur l'hôte et son environnement (12). Les facteurs liés au vaccin sont essentiellement sa stabilité thermique en veillant à la chaîne de froid car vaccin vivant (thermolabile), le volume suffisant de la dose administrée et le respect de l'intervalle entre les doses. Les facteurs liés à l'hôte portent sur les différences des niveaux des anticorps maternels acquis de façon passive et par l'allaitement, le statut nutritionnel des enfants, et la présence des infections entériques concurrentes.

En comparant les taux de séroprévalence à l'intérieur des trois tranches d'âges, si le profil des réponses vis-à-vis des trois sérotypes est respecté avec plus de réponses contre Sabin 2, puis Sabin1 et en dernier Sabin3, il en résulte une meilleure réponse dans la tranche d'âge la plus jeune suivie de la moyenne et enfin la plus âgée. Ces données reflètent parfaitement la prise en charge du programme d'éradication de la poliomyélite. Il était tout à fait attendu que les réponses les plus faibles soient enregistrées dans la tranche où les âges sont plus avancés, qui non seulement n'a pas été touchée par les JNV, débutées en 1994, où tous les enfants avaient plus de 5 ans, mais aussi pour laquelle la couverture vaccinale ne dépassait pas une moyenne de 75% (Données MSPRH). A l'inverse, les réponses les plus élevées sont retrouvées dans la tranche d'âge la plus jeune et sont justifiées par la redynamisation du programme d'éradication de la poliomyélite, intervenue en 1994. Ce programme avait pour objectif, outre la surveillance de la circulation des poliovirus sauvages, l'amélioration de la vaccination de routine et le renforcement de la vaccination en masse par des JNV qui se sont succédées quatre années de suite. Ces vaccinations supplémentaires, au fil du temps, ont touché tous les enfants de la première tranche d'âge (2-5 ans) et une bonne partie des enfants de la tranche d'âge 6-10 ans, ce qui place cette dernière en deuxième position en matière de séroprévalence, en toute logique.

En résumé, les résultats de cette étude ont confirmé, en premier lieu, que les réponses immunes vis à avis des différents sérotypes sont comparables aux études antérieures faites par différents auteurs à travers le monde. En second lieu, même si les taux de séroprévalence sont satisfaisants chez la population infantile, cependant eut égard au nombre de doses reçues, au moins 5 doses par enfants, ces taux auraient été plus élevés.

BIBLIOGRAPHIE

1. Knipe DM, Howley PM. Fields, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. Fields Virology (4th Ed.) Lippincott Williams & Wilkins 2001.
2. Salk J.E. Persistence of immunity after administration of formal-treated poliovirus vaccine. *Lancet*, ii 1960; 715-723.
3. Salk J, van Wezel AL, Stoeckel P, van Steenis G, Schlumberger M, Meyran M, Rey JL, Lapinleimu K, Bottiger M, Cohen H. Theoretical and practical considerations in the application of killed poliovirus vaccine for the control of paralytic poliomyelitis. *Dev Biol Stand.* 1981; 47:181-98.)
4. Sabin A.B. Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *J Infect Dis.* 1985 Mar; 151(3):420-36.)
5. WHO/EPI/GEN/97.03. Polio Le commencement de la fin. Genève 1998.
6. WHO: Manual for the virological investigation of polio. WHO/EPI/GEN/97.01. 44-51. 1997.
7. Wright P.F, Kim F.R., de Q.C., Robertson S.E., Scott R.M., Ward N.A. and Henderson R.H. Strategies of global eradication of poliomyelitis by the year 2000. *N. Engl. J. Med.* 1991; 325:1774-1779.
8. La lettre de la prévention, Spécial Polio, Février 1996, numéro 05.
9. I. Mastroeni, AM Patti, A Fabrizi, AL Santi, AM Manduca, N Vescia et al.: Immunity status against poliomyelitis in persons 13-14 years old living in Rome. *Vaccine* 1997; 15: 747-750).
10. von Magnus H. and Petersem I. Vaccination with Inactivated Poliovirus Vaccine and Oral Poliovirus Vaccine in Denmark. (1984) *Reviews of Infectious Diseases* Vol. 6 ; Supplement 2 ; May-June 1984 ; S471-S474).
11. Faden H, Modlin JF, Thoms ML, McBean AM, Ferdon MB, Ogra PL. Comparative evaluation of immunization with live attenuated and enhanced-potency inactivated trivalent poliovirus vaccines in childhood: systemic and local immune responses. *J Infect Dis.* 1990 Dec;162(6):1291-1297)
12. Patriarca P.A., Wright P.F. and John T.J. Factors Affecting the Immunogenicity of Oral Poliovirus Vaccine in Developing Countries: Review. *Reviews of Infectious Diseases* 13, 1991; 926-939.

Helicobacter pylori : SEROPREVALENCE DES FACTEURS DE VIRULENCE CagA et VacA ET DIVERSITE DES SOUCHES EN ALGERIE

F.Kias^(1,2), F.Mouffok^(1,2), F.Taleb^(1,2), B.Touchene⁽¹⁾, Z.Guechi⁽¹⁾, A.Bouhade⁽¹⁾, H.Berrah⁽¹⁾.

(1) : Laboratoire Algérien de recherche sur Helicobacter

(2) : Institut Pasteur d'Algérie.

RESUME

Helicobacter pylori est une bactérie Gram Négatif spiralée colonisant la muqueuse gastrique ; sa virulence dépend de plusieurs facteurs notamment CagA et VacA considérés comme étant les plus importants (3, 11) et dont la prévalence varie selon la région géographique (8,12).

Notre étude a porté sur 210 positifs sérums prélevés chez des malades adultes (152 gastrites et 58 ulcères) ; les résultats démontrent une très grande diversité de nos souches vis-à-vis du CagA et du VacA.

SUMMARY

Helicobacter pylori, is a curved, spiral Gram-negative bacteria wich colonise the gastric mucosa. Its virulence depend on different factors, CagA and VacA are the major ones (3). The prevalence of these factors is variable according to the geographical location.

210 positives sera were collected in Algerian adults (58 duodenal ulcers and 152 gastritis); the results show a large diversity in Algerian *H.pylori* strains according The CagA and the VacA statute.

The aim of our study is to determinate these factors in subjects infected by *Helicobacter pylori* and evaluate the importance in duodenal ulcers and in gastritis.

INTRODUCTION

Helicobacter pylori est une bactérie associée à plusieurs pathologies duodéno-gastriques de diversité variable (4).

La virulence de cette bactérie dépend de plusieurs facteurs dont l'activité uréasique et la mobilité qui sont communes à toutes les souches *Helicobacter pylori*, ainsi que d'autres facteurs dont la présence varie d'une souche à l'autre notamment l'Antigène du groupe sanguin Lewis, le CagA (cytoxin associated gene A), et le VacA (vaccuolating cytotoxin A) (4).

Ces deux derniers font l'objet de plusieurs études et sont considérés comme étant les plus impliqués dans la virulence de cette bactérie (3).

En réalité le Cag est une protéine qui permet de classer les souches en deux catégories : celles qui possèdent cet îlot de pathogénicité complet et fonctionnel et celles qui en sont partiellement ou totalement dépourvues (13).

Il s'agit en fait d'une protéine de poids moléculaire allant de 120 à 140 kDa, à laquelle sont associées plusieurs fonctions qui lui confèrent un caractère pro-inflammatoire supérieur aux souches qui en sont dépourvues et qui est en corrélation avec l'issue clinique de l'infection. (14).

Le VacA est une protéine formée de six monomères de 88 kD chacun dont le rôle le plus connu est la formation de vacuoles cytoplasmiques et l'induction de la mort des cellules épithéliales par apoptose (14).

La prévalence du CagA et du VacA varie suivant la zone géographique (8,12), et la variabilité de leur présence est associée à des cas cliniques différents. (3,9).

L'objectif de notre étude est de déterminer la prévalence de ces deux facteurs en Algérie chez les sujets adultes et d'évaluer l'importance de leurs implications suivant les signes cliniques.

MATERIEL ET METHODES

Matériel :

L'étude a porté sur 210 sérums positifs récoltés entre Janvier 2000 et décembre 2004 chez des personnes âgées entre 17 ans à 80 ans tous sexes confondus, et dont 58 souffrent d'ulcère et 152 présentant une gastrite.

Le diagnostic est effectué par Western Blot « Helicoblot 2.1 GENELABS » : il s'agit d'une méthode qualitative pour la détection des IgG de *H.pylori* dans le sérum humain correspondant aux différents antigènes de la bactérie.

La méthode permet la mise en évidence des anticorps dirigés contre des protéines bien spécifiques de la bactérie tout en indiquant s'il s'agit d'une ancienne infection ou d'une infection en cours.

Les coffrets présentent 36 bandelettes sur lesquelles une migration des protéines de *Helicobacter pylori* est préalablement effectuée, ces protéines réagissent au contact des anticorps, la réaction Antigène-Anticorp (Ag-Ac) se manifeste par l'apparition d'une bande à l'endroit de la protéine concernée.

Méthodes :

Dans chaque coffret il y a 04 plaques de 09 puits chacune. On place une bandelette dans Chaque puits, il faut prévoir une bandelette pour le témoin positif et une autre pour le témoin négatif.

La première étape consiste à tremper les bandelettes dans la solution de lavage pendant 05 minutes, après les avoir vidés les puits reçoivent les sérums dilués dans une solution de dilution. Les bandelettes sont incubées 01 heure à température ambiante et sous agitation, elles sont ensuite lavées 03 fois afin d'éliminer tout IgG non fixé par les antigènes.

Après les 03 lavages elles sont trempées dans le conjugué : solution contenant des anti-IgG humains marqués qui vont se lier aux complexes Ag-IgG déjà formés, une incubation d'une heure est nécessaire suivi de 03 lavages ; les bandelettes sont par la suite mises au contact du révélateur qui va permettre l'apparition des bandes correspondant aux complexes Ag-IgG-antilig* formés (le marquage est symbolisé par « * ») et donc aux Antigènes portés par chaque souche.

La réaction est arrêtée par une solution d'arrêt, les bandelettes sont rincées à l'eau distillée, séchées puis interprétées.

Au moment de l'interprétation des résultats certaines conditions sont nécessaires pour affirmer la séropositivité d'un malade :

- Présence de la bande 116kD (CagA) avec une ou plusieurs de ces bandes : 89 kD (VacA), 37 kD, 35kD, 30kD (UreA) et 19.5kD ensembles.
- Présence de l'une des bandes : 89 kD, 37 kD ou 35 kD.
- Présence des deux bandes 30 kD et 19.5 kD en même temps.

Le « MIC » Marqueur d'Infection en cours informe uniquement sur l'état de l'infection : infection en cours ou ancienne infection.

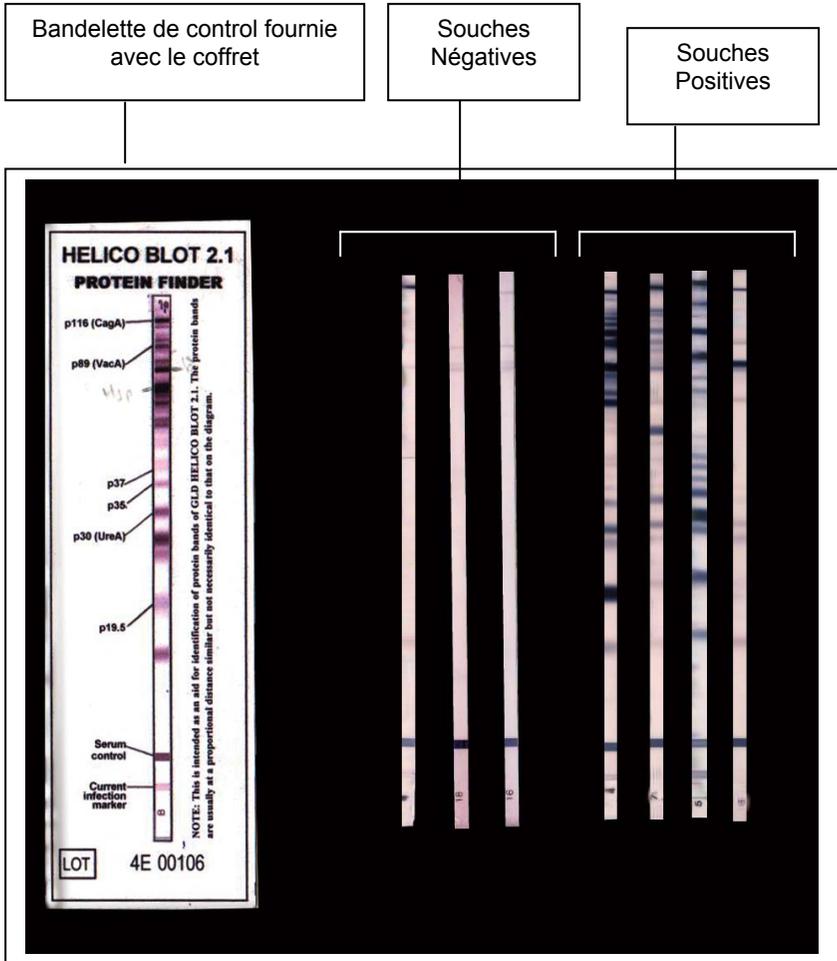


Fig 1 : Profil des anticorps (IgG) chez des patients H.pylori positifs et H.pylori négatifs

RESULTATS

1. Profils protéiques des souches *H.pylori* vis-à-vis du CagA et du VacA :

L'étude de la répartition des souches *H.pylori* vis-à-vis des deux facteurs CagA et VacA nous a permis de constater qu'il y a quatre différents groupes qui se détachent, avec prédominance de certains par rapport aux autres comme on peut le voir dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Répartition des souches *H. pylori* selon leurs profils vis-à-vis des deux facteurs CagA et VacA

CagA+ VacA+	CagA+ VacA-	CagA- VacA+	CagA- VacA-
67/210	84/210	18/210	41/210

Une grande diversité des souches peut donc être constatée, avec la prédominance de certains profils notamment (CagA+ VacA+) et (CagA+ VacA-) tel qu'il est représenté ci-dessous :

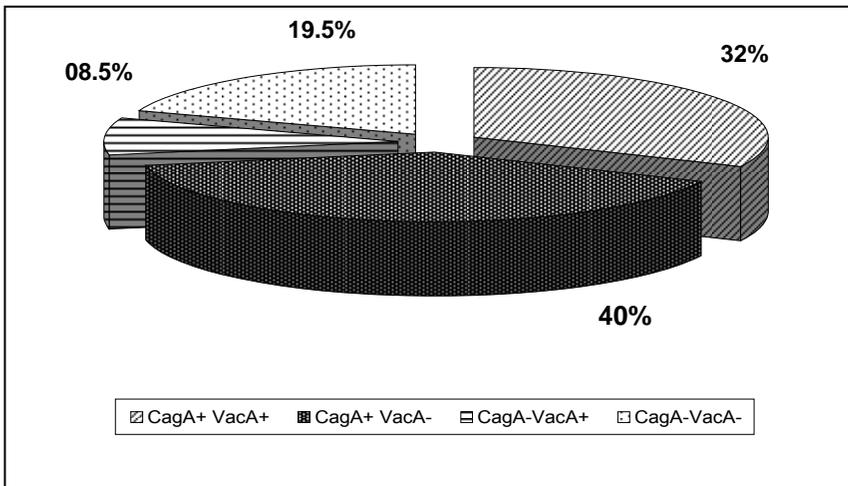


Figure 1 : Profil des souches *H.pylori* en Algérie

2. Comparaison des résultats à ceux du Bassin Méditerranéen et ceux du Continent Asiatique :

Une comparaison des résultats avec ceux du Bassin Méditerranéen et ceux du Continent Asiatique a été effectuée, la représentation graphique ci-dessous montre une variation de ces résultats suivant la région géographique (8).

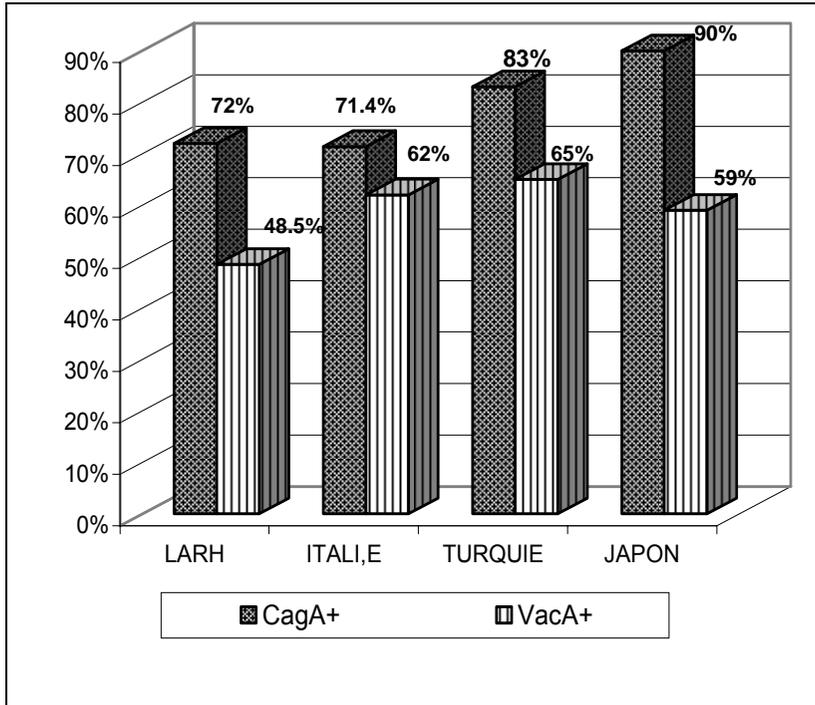


Figure 2 : Comparaison des résultats Algériens à ceux du bassin Méditerranéen et ceux du continent Asiatique (1,5.7) ($P < 0.001$).

3. Répartition des résultats suivant les signes clinique :

Suivant qu'il s'agisse d'ulcère ou de gastrite l'implication des deux facteurs (CagA et VacA) dans les résultats cliniques a été étudiée et représenté ci-dessous :

Tableau 2 : l'implication des deux facteurs (CagA et VacA) par rapport aux données cliniques.

	CagA+	VacA+
Gastrites	101/152	59/152
Ulcères	50/58	26/58

La représentation graphique montre donc que les deux facteurs sont impliqués de façons différentes selon le cas.

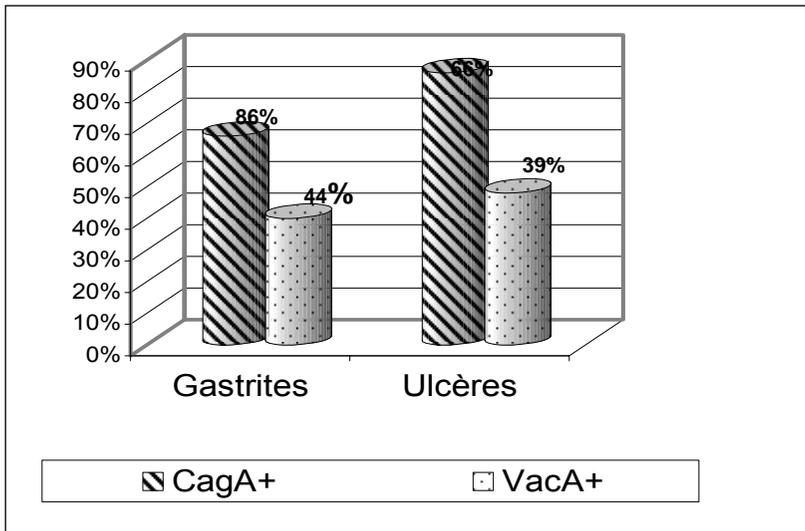


Figure 3 : Répartition des résultats en fonction des signes cliniques ($p < 0.001$)

DISCUSSION

Nous constatons que la technique utilisée « Western Blot » permet de connaître le profil protéique de chaque souche et ce sans passer par les méthodes invasives ce qui lui donne une importante place dans le diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori* (9).

Pour ce qui est des deux facteurs de virulence recherchés il est actuellement sur que leurs implications provoquent des pathologies d'ordres variables pouvant aller jusqu'à l'adénocarcinome gastrique (2), d'où la nécessité de les dépister chez tout patient présentant une infection à *Helicobacter pylori*.

D'après les résultats obtenus au cours de notre étude la répartition du profil protéique vis-à-vis du Cag A et du Vac A montre une très grande diversité des souches Algériennes avec une prédominance du profil CagA+ retrouvé chez 72% des souches contre le profil VacA+ qui n'est retrouvé que chez 48.5% des souches.

On note également que le profil CagA- VacA- ne se manifeste que rarement avec un taux de 19%, Donc plus de 80% des souches présentent au moins l'un des deux facteurs de virulence ce qui signe l'existence de pathologies évolutives plus ou moins graves.

La comparaison des résultats obtenus au cours de cette étude montre que les souches algériennes présentent une similitude avec celles du bassin Méditerranéen notamment pour l'îlot de pathogénicité CagA (6) alors que celles du continent Asiatique sont plus importantes aussi bien pour le Cag A que pour le VacA.

Sur le plan clinique nous avons constaté que l'îlot de pathogénicité CagA est impliqué beaucoup plus dans les cas d'ulcères que ceux de gastrites ($p < 0.004$) ce qui est confirmé par les données bibliographiques (3,10).

Le VacA par contre se manifeste de façon presque identique dans les deux cas (39% dans le cas de gastrites / 44% dans le cas d'ulcères).

CONCLUSION

L'importance de la technique est évidente vu qu'elle permet la mise en évidence de plusieurs facteurs connus pour leur virulence notamment CagA et VacA .De plus la mise en évidence de ces facteurs peut indiquer indirectement la présence de *Hp* si la culture est négative.

L'expression de ces deux facteurs montre une diversité des souches *H.pylori* en Algérie avec une importante implication de l'îlot de pathogénicité CagA chez les malades souffrant d'ulcère.

Cette expression varie également selon la zone géographique concernée.

En conclusion les résultats de cette étude confirment ceux cités dans les autres études (3, 4, 8, 10).

Des études plus poussées notamment du profil génétique des souches Algériennes doivent être envisagées, afin de mieux diagnostiquer les différents cas ainsi que pour déterminer l'implication de ces deux facteurs dans la gravité de la virulence.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abasiyanik MF, Sander. E, BA Salih. 2002. Helicobacter pylori anti-CagA antibodies: Prevalence in symptomatic and asymptomatic subjects in Turkey. Canadian Journal of gastroenterology August 2002, Volume 16, Number 8: 527-532.
2. Basso D, Navaglia F, Brigato L, Piva M G, A Toma, E Greco, F Di Mario, F Galeotti, G Roveroni, A Corsini, M Plebani. 1998. Analysis of Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes and serum antibody profile in benign and malignant gastroduodenal diseases. Gut 1998; 43; 182-186
3. Buhling.F., Koch.G., Wex.T., Heimburg.A . 2004. Simultaneous detection and differentiation of anti-Helicobacter pylori antibodies by flow microparticle immunofluorescence assay. Clinical and Diagnostic laboratory Immunology. Janv 2004.p131-136.
4. Fauconnier .A. 1998. Génétique et Biologie Moléculaire de Helicobacter pylori: des approches efficaces pour aborder la pathogénicité de la bactérie. Applied Genetics, free University of Brussels (Belgium). Acta endoscopica volume 28 N° 03 . 1998.
5. Lenzi.C., Pallazzouali.A. Kristoduhullus .S 2004. Prevalence of Cag A+ Helicobacter pylori infection and levels of anti HSP60 antibodies in patients with ischaemic heart disease and control. Helicobacter. Volume 9 N° 5 – 2004 .p 532.
6. Manuela donati,1 sandra moreno,1 elisa storni,1 antonio tucci,2 loris poli,2 Claudia mazzoni,1 ornella varoli,1 vittorio sambri,1 aldo farencena,.1997 .Detection of serum antibodies to caga and vaca and of serum neutralizing activity for vacuolating cytotoxin in patients with helicobacter pylori-induced gastritis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, July 1997, Volume 4 N°4 p.478–482.
7. Michopolos.S., Sotiropoulou.M Petraki.C. 2004. Helicobacter pylori increase matrix metalloproteinase-7 (MP-7) expression in gastric epithelial cells in Cag dependant manner in the antrum but not in the cardia. Helicobacter. Volume 9 N° 5 – 2004 .p 531.
8. Ogura.K., Kanai.F., Maeda.S., Yoshida.H.1997. High prevalence of cytotoxin positive Helicobacter pylori patients unrelated to the presence of peptic ulcers in Japan.
9. Omero Alessandro Paoluzi, Pina Rossi, Carla Montesano, Sabrina Bernardi, Emanuela Carnieri, Orazio Paolo Marchione, Paolo Paoluzi (2001). Discrepancy Between Polymerase Chain Reaction Assay and Western Blot Analysis in the Assessment of CagA Status in Dyspeptic Patients. Helicobacter. Volume 6 Issue 2 Page 130-135, June 2001

10. Siman.H.J., Engstrand . L., Berglund.G. 2005. Evaluation of western Blot CagA seropositivity in *Helicobacter pylori* seropositive and seronegative subjects. Clinical and Biological Diagnostic Laboratory Immunology. Feb 2005. p 304-309.
11. S.N.Akopyants, Kersulyte D., Berg D.E. 1995. Cag II, a new multigene locus associated with virulence in *Helicobacter pylori*. *Gut* 37 (abstract 1).
12. V.O.Rechetnikov, S.Akurilovich,S.A.Krotov. 2004. Prevalence of CagA serpositivity among different ethnic groups in Russia. abstract 04.28 *Helicobacter* volume 9 N°5 2004.
13. Monica Contuas,. Agnes Labigne. Quels sont les facteurs de virulence de *Helicobacter pylori*. *Gasstroenterologie clinique et biologique* .Mars 2003.
14. Lanzavecchia, S Bellon,P.L Dallai.R ,. Rappuali.R (1998).Three dimentional reconstitution of metal replicas of *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin. *J. Struct. Biol* 121, 9-18

TESTS DIAGNOSTIQUES DE L'INFECTION DE HELICOBACTER PYLORI CHEZ L'ENFANT

F. Mouffok ^(1,2) F. Taleb ^(1,2) F. Kias ^(1,2) Z. Guechi ⁽¹⁾, A. Bouhadeb ⁽¹⁾,
B. Touchene ⁽¹⁾.

(1) : Laboratoire Algérien de recherche sur *Helicobacter*

(2) : Institut Pasteur d'Algérie.

RESUME

Dans le cadre de notre étude sur le rôle de *Hp* dans l'étiologie des infections gastro-duodénales, un certain nombre de tests diagnostiques ont été utilisés chez l'enfant comme chez l'adulte surtout que les études épidémiologiques ont clairement établi que dans notre pays, l'enfant s'infecte très tôt. Notre étude consiste à utiliser un certain nombre de tests et ensuite de les comparer aux autres techniques utilisées en anathomo- pathologie et aux résultats des tests rapides à l'uréase soit par pronto-dray, soit par C13, UBT.

Les résultats obtenus sont intéressants d'une part parce qu'ils confirment la situation épidémiologique de cette affection, d'autre part, ils nous permettent d'avoir une idée sur la stratégie future à adopter et éventuellement la démarche à suivre dans le contexte du diagnostic de routine chez l'enfant.

SUMMARY

Within the framework of our study on the role of *Hp* in the etiology of the gastro duodenal infection, a certain number of diagnostic tests used available for adult and children generally are not different especially that the epidemiology studies established clearly in our country the child infects himself early.

Our study consists to use a variety of tests and then to compare them with the other technique used in anathomopathology and the results of raped Urease tests (RUT) by pronto dry, C13 or Urea breath (UBT).

The results obtained are interesting because they confirm the epidemiologie situation of this infection and it make it us to have and idea on the future strategy to adopt and the step to be followed in the context of the diagnosis of routine in the child.

INTRODUCTION

H.pylori est responsable de gastrite et est associé à l'ulcère gastrique et duodénal chez l'enfant. L'infection est fortement liée aux conditions de vie de la petite enfance (promiscuité, faible niveau d'hygiène). En Algérie comme dans les pays en voie de développement, la séroprévalence de l'infection *H.p* est très élevée. L'estimation de la contamination chez les enfants malades et l'étude des caractéristiques des bactéries isolées seront déterminantes dans par la mise en évidence des particularités chez l'enfant.

Le but de notre travail est d'étudier les tests diagnostiques utilisés en bactériologie, les évaluer par rapport aux autres tests utilisés en anatomo-pathologie et aux tests rapides à l'uréase et envisager leur utilisation en routine en fonction de leurs avantages et de leurs inconvénients.

MATERIELS ET METHODES

Matériels :

Notre étude prospective, menée de 2002 à 2005 sur 275 enfants âgés de 0 à 16 ans chez lesquels nous avons réalisés 212 biopsies, 190 prélèvements de sang, et 66 prélèvements de selles. Ont été exclus les patients ayant pris des antibiotiques et/ ou des antiseptiques durant les 4 semaines précédentes (1,2).

Méthodes :

Culture :

Les biopsies prélevées au niveau de l'antra et du fundus sont placées dans des tubes secs et transportés le jour même vers le laboratoire. A partir de 2 biopsies bien dilacérées, on effectue une coloration de gram en vue de l'examen direct, des cultures sur milieux sélectif et non sélectif, incubées pendant 3 à 12 j jours en atmosphère micro aéroophile. L'identification du germe a été faite par examen microscopique, avec recherche de l'oxydase, la catalase et l'uréase. On termine par l'étude de la sensibilité des souches identifiées vis à vis des antibiotiques.

Sérologie :

La recherche des anticorps anti-*H.pylori* a été effectuée par technique ELISA (Platélie *H.pylori* : IgG Biorad).

Recherche des antigènes dans les selles :

Test ELISA à l'aide des anticorps polyclonaux anti *H.pylori* (HpSA Méridian). Les résultats sont ensuite comparés aux autres tests diagnostiques effectués.

L'analyse statistique repose sur le test du KHI2 et le test de Student.

RESULTATS

Les résultats sont rapportés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Résultats des tests utilisés au laboratoire de bactériologie.

Tests diagnostiques	n	Test positif	%
Culture	212	123	58
Sérologie	190	154	81
Ag .HpSA	66	25	38

Les résultats pour la culture sont de 58%, la sérologie de 81% et la recherche d'antigènes dans les selles est de 38%.

DISCUSSION

Afin d'évaluer nos résultats, nous les avons comparés aux autres tests. Le tableau 2 rapporte les résultats de ces tests :

Tableau 2 : Valeurs des tests avant traitement chez l'enfant.

	n	Hp+ %	Se (IC 95%)	Sp (IC 95%)	VPP	VPN
Histologie	212	99	100 (96- 00)	76 (62-86)	86 (77-92)	100 (90-100)
Serologie*	190	81	80 (71 - 87)	94 (81-98)	97 (90-99)	68 (55-79)
TRU	44	73	81 (62-92)	100 (46-100)	100 (83-100)	45 (18-75)
Culture	212	58	56 (48-64)	100 (95-100)	100 (95-100)	40 (31-49)
HpSA	66	38	37 (25-51)	100 (80-100)	100 (80-100)	35 (22-49)

* : (vs UBT)

L'histologie avec une sensibilité de 100% est le meilleur test et ceci est conforme aux données de la littérature (2, 4,5). Les faibles résultats obtenus avec la culture et l'HpSA sont probablement dus aux conditions de conservation et de transport de ces prélèvements. En effet, les résultats obtenus pour la culture chez l'adulte sont de 65% mais les biopsies sont placées immédiatement après le prélèvement dans des bonbonnes d'azote pour stockage et transport (4, 9). Jusqu'au moment de leur ensemencement ; alors que chez les enfants, ce sont les parents qui étaient chargés d'emmener le prélèvement au laboratoire. Vu que la bactérie est extrêmement sensible, on peut penser qu'une partie des bactéries ont pu souffrir de cette situation. La culture reste cependant un très bon examen puisqu'elle permet de revoir le traitement en cas d'échecs thérapeutiques et de tester la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques utilisés pour le traitement (3, 6, 7).

Le test rapide à l'uréase a une bonne sensibilité et une bonne spécificité ; c'est quand même un test invasif. La recherche d'antigènes dans les selles effectuée sur une quantité faible de prélèvements n'a pas été bonne, contrairement à ce qu'affirment certains auteurs (7, 8). Ceci peut s'expliquer par la qualité des réactifs utilisés ou l'interférence de substances consommés et non avoués par les intéressés. Les résultats qui seront obtenus avec un test en perspective UBT répondront à cette question.

La sérologie avec une sensibilité de 94% reste contestée et ne peut qu'être appliquée aux études épidémiologiques même si c'est un examen facile et non invasif (3, 5). La possibilité d'en apprécier la séroconversion entre sérum précoce et sérum tardif pourrait être envisagé surtout si l'on tient compte de la séroprévalence élevée chez l'enfant (Conférence F.Mégraud ORAN avril 2006). En définitive, les tests diagnostiques chez l'enfant sont plus difficiles à interpréter que chez l'adulte. L'étude moléculaire des souches serait la bienvenue. La mise en place d'un diagnostic au laboratoire doit tenir compte de tous ces facteurs en plus du coût et de facilité de mise en œuvre (9, 10). Les résultats de la recherche des antigènes dans les selles ne sont pas satisfaisants mais cela s'explique par beaucoup de problèmes d'ordre technique tels que acheminement des prélèvements, qualité des réactifs, interactions médicamenteuses (7, 10).

CONCLUSION

Le diagnostic au laboratoire repose essentiellement sur l'anatomo – pathologie. La confirmation sera faite par l'étude indispensable des souches isolées et la recherche de leur statut antibiotique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wewer V, Kalach N. *Helicobacter Pylori* infection in pediatrics. *Helicobacter* 2003. 8(supp 1).61-67.
2. Mégraud F, Delchier J: Méthodes de diagnostic de l'infection à *H.pylori*. Le point de vue du microbiologiste et du clinicien. *La lettre de l'infectiologue* ; 1996 ; tome XI p 17 ,
3. Mitchell H , Mégraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection, *Helicobacter* 2002, volume 7 Supplement 1p 8 -13.
4. Roma-Giannikou E, Shcherbakov P. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics..*Helicobacter* 2002 volume 7 Supplement 1 p 50-55.
5. Mégraud F. Non-invasive diagnostic test for *Helicobacter pylori* in children. Evaluation in a multicentric European study. *Gut . Abstracts of Scientific Presentations* 2002 p A81
6. Korman JD .Avantages et à inconvénients des différentes méthodes de diagnostic de l'infection *H pylori* .*Gastro. Entrol.Clinical.Biol* . 2003 ,27,p 380-390.
7. Gottrand F. Tests diagnostiques et traitement de la gastrite à *Hélicobacter pylori* chez l'enfant. *Archives de pédiatrie*. 2001 ; 8suppl.2396-398.
8. Ozçay F, Kocak N, et all. *Hélicobacter pylori* infection in turkish children .Comparison of diagnostic tests, evaluation of eradication rate. *Helicobacter* 2004 Jun,9 (3); 242-248.
9. Moubri M, Larras R, Berrah H,BouhadeF A ,Mouffok F, Gueichi Z, Touchène B Therapeutic strategy of *Helicobacter pylori* in Algerian children . *Helicobacter* 2006 Sep, number 4, vol. 11; p 415-421.
10. Konstantopoulos N., Ruessmann H, et all . Monoclonal EIA for detection of *H.pylori* antigen in stool post-treatment in children. *Gut. Abstracts of Scientific Presentation* .2002.p A81.

INDUCTION DE L'ARTHRITE RHUMATOÏDE CHEZ LE RAT WISTAR PAR LE COLLAGÈNE TYPE II

ARRAR L, DERRADJI Y, ROUBA K, HANACHI N, CHAREF N, BOURICHE H, BOUMERFEG S et BAGHIANI A.

Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ferhat Abbas de Sétif, 19000 Algérie

RESUME

L'arthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune touchant les articulations. Les modèles animaux de cette maladie ont participé à la compréhension de son étiologie et physiopathologie ainsi qu'à la recherche de nouveaux traitements. L'arthrite induite chez le rat par le collagène type II est l'un de ces modèles les plus représentatifs de la maladie humaine du fait qu'elle remplit la majorité des critères fixés par l'association américaine de rhumatologie.

Dans notre travail, nous avons induit, par le collagène type II chez le rat, une arthrite chronique qui s'est étalée sur 60 jours et qui se caractérise par : (1) une atteinte symétrique des articulations des pattes postérieures de la majorité des animaux traités, avec un gonflement de 130% de leur volume initial au sommet de la maladie (21^{ème} jour), (2) une perte du poids du groupe malade avoisinant 15%, (3) une augmentation de la vitesse de sédimentation de 4 fois celle des témoins, (4) une intense infiltration leucocytaire de la membrane synoviale et de la moelle osseuse révélée par des coupes histologiques montrant une destruction nette du cartilage et de l'os avec déformation de l'articulation et une activation des ostéoclastes. Ces signes sont caractéristiques de la maladie humaine.

Enfin, nous pensons disposer maintenant d'un modèle animal de l'arthrite nous permettant d'examiner les effets de certains médicaments anti-inflammatoires et des extraits de plantes naturelles utilisées dans la médecine traditionnelle algérienne.

SUMMARY

Rheumatoid arthritis (RA) is an auto-immune disease affecting joints. Animal models of this disease have participated to understand its etiology and physiopathology as well as to search new treatments. Collagen type II induced arthritis in rats is the more representative of the human disease among these models because it fulfills the majority of the criteria fixed by the American Rheumatology Association (ARA). In this study, we have induced arthritis in rat, using collagen type II. The disease is well developed within 60 days and is characterized by: (1) symmetric joints involvement of the hind paws where the swelling reaches 130% of the initial volume at the maximum of the disease (day 21), (2) lose of 15% of body weight in the arthritic group, (3) increase in red blood cell sedimentation rate to reach 4 times the control value, (4) intense leukocytes infiltration of the synovial membrane and bone marrow leading to cartilage and bone destruction and joint deformation. These signs evoke those of human disease. Finely, the model developed in this study could serve to examine effects of anti-inflammatory drugs and extracts of medicinal plant used in folk medicine in Algeria.

INTRODUCTION

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une atteinte inflammatoire polyarticulaire, le plus souvent symétrique, pouvant évoluer vers une destruction articulaire et périarticulaire (VAILLANCOURT, 1990). L'AR touche 1% à 3% de la population mondiale. Malgré que l'étiologie exacte du déclenchement reste à déterminer, des évidences se sont accumulées sur la participation de l'immunité innée et acquise dans la physiopathologie de l'AR. Le complément (HIETALA *et al.*, 2002) et le neutrophile (WIPKE et ALLEN, 2001) composantes essentielles de l'immunité innée sont indispensables au développement du modèle animal de l'arthrite. L'immunité acquise cellulaire et humorale, représentée respectivement par les lymphocytes T auto-réactives et les auto-anticorps, est essentielle pour l'installation et le maintien de la maladie chez les arthritiques. En effet, STUART *et al.* (1988) ont montré que ces deux composantes sont capables de transférer l'arthrite à l'animal. D'autre part, l'élimination des lymphocytes T auto-réactives ou le blocage de la production des anticorps empêche le développement du modèle animal de l'arthrite (ZHANG *et al.*, 2002).

Localement au niveau de l'articulation, l'ostéoblaste contrôle l'activation et la prolifération des ostéoclastes dans le processus de maintenance et réparation de l'os (BOLON *et al.*, 2004). La nature inflammatoire de l'articulation perturbe cet équilibre en faveur de l'ostéoclaste. Les macrophages (CD14+) activés par le RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) se différencient en ostéoclastes et contribuent à la résorption de l'os (DANKS *et al.*, 2002). Dans L'arthrite induite chez les souris déficientes en RANKL, l'os est protégé de l'érosion mais le cartilage est dégradé ce qui indique une différence dans le mécanisme de dégradation de ces deux tissus (PETTIT *et al.*, 2001).

Le traitement et la prévention de l'arthrite rhumatoïde dépendent en grande partie de l'accumulation des connaissances concernant les facteurs génétiques et environnementaux déclanchant la maladie, ainsi que les effecteurs immunologiques qui y participent. Pour cela, des modèles animaux ont commencé à être décrits depuis la description de la maladie humaine (WAKSMAN, 2002).

Actuellement il existe un grand nombre de modèles ressemblant plus au moins à la maladie humaine et qui ont été obtenus par une variété de procédés. Différentes huiles ont été utilisées pour induire l'arthrite chez les rats Dark agouti (DA), l'espèce de rats la plus susceptible. On cite l'huile de paraffine (Adjuvant incomplet de Freund; AIF) (SVELANDER *et al.*, 2001), l'avridine (PRAKKEN *et al.*, 1997), le squalène (CARISON *et al.*, 2000), et le puissant arthritogène, le pristane (HANSSON *et al.*, 2002). Le mécanisme exact par lequel les huiles induisent l'arthrite n'est pas connu, l'hypothèse de l'accumulation dans l'articulation est à présent écartée. Une étude réalisée avec le squalène radioactif à montrée son accumulation dans les nodules lymphatiques où il active

non spécifiquement les lymphocytes T ce qui déclenche l'arthrite (HOLM *et al.*, 2002). Les modèles d'arthrite induite par l'huile ont, dans la majorité des cas, été utilisés pour étudier l'association du facteur génétique à l'étiologie de la maladie (LORENTZEN *et al.*, 1998). Cette association est aussi étudiée à l'aide d'animaux transgéniques porteurs d'allèles de l'HLA humain (COPE, 2003).

L'arthrite induite par le collagène type II, proposée par TRENTHAM et al (1977), est actuellement considéré comme le meilleur modèle animal de la l'arthrite humaine (WAKSMAN, 2002). Ce modèle est réalisé par immunisation des rats par le collagène type II; composante majeure du cartilage articulaire. La maladie obtenue est plus chronique et destructrice du cartilage et de l'os que celle obtenue par les adjuvants à base d'huile (exception faite pour le pristane). Elle touche un grand nombre d'animaux même les espèces résistantes aux huiles et aux parois bactériens: rats Wistar (TRENTHAM *et al.*, 1977; STUART *et al.*, 1988), souris (BÄCKLUND *et al.*, 2003), singe Rhésus (HART, 1998).

Les anticorps développés contre le collagène jouent un rôle important dans l'initiation de la maladie, ils ont été utilisés pour transférer passivement la maladie à des animaux non immunisés: rats (STUART et DIXON, 1983), souris (KAGARI *et al.*, 2002; NANDAKUMAR *et al.*, 2003). Ces anticorps s'accumulent dans l'articulation en se fixant sur le cartilage et activent le complément ce qui attire les phagocytes. Ces derniers libèrent leur cytokines et protéinases créant un site inflammatoire et conduisant par conséquent à la destruction du cartilage et l'os articulaire (STUART *et al.*, 1988).

Dans le présent travail, nous avons provoqué chez le rat Albino Wistar, par le collagène II, une arthrite évoquant l'arthrite rhumatoïde humaine par divers critères de l'inflammation articulaire chronique comme la vitesse de sédimentation, la perte du poids, la lourdeur du mouvement, la déformation des articulation, l'infiltration leucocytaire et la formation du pannus.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Les rats Albino Wistar pesant de 200 à 300 g (Institut Pasteur d'Algérie) sont mis en adaptation pendant une semaine avant l'expérimentation dans l'animalerie du Département de Biologie de Sétif avec un accès libre à l'eau et la nourriture standard (concentré pour rats, Groupe Avicole El-Kseur, Bejaia).

Induction de l'arthrite :

L'arthrite a été induite chez les rats Albino Wistar selon le modèle proposé par TRENTHAM *et al.* (1977) avec légères modifications. Le collagène type II (CII) est dissout (2.5mg/ml) dans l'acide acétique 0.1M pendant une nuit à 4 °C puis 100µl de cette solution sont émulsifiés avec le même volume d'adjuvant complet de Freund (ACF). Le mélange est immédiatement administré par injection intradermique à la base de la queue et à quatre points sur le dos des rats après anesthésie et épilation. Après sept jours de la première injection, une injection de rappel de 200µg de CII préparé de la même façon a été effectuée (CAMPO *et al.*, 2003). Le groupe témoin a subi le même traitement mais en utilisant l'acide acétique seul.

Mesure du volume de l'œdème :

Le volume des quatre pattes de chaque rat est mesuré par le pléthysmomètre (UGO basile, Allemagne) le jour de l'induction de l'arthrite et chaque 4 jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Pour assurer la reproductibilité des résultats les pattes du rat sont immergées dans le compartiment de mesure jusqu'à ce que le niveau du liquide atteigne l'axe de la cheville pour les pattes postérieures et le poignet pour les pattes antérieures (HILDEBRANDT *et al.*, 2000). Le volume de l'œdème est obtenu par soustraction du volume initial des pattes du rat (SELLOUM *et al.*, 2003).

Mesure du poids corporel :

Le poids corporel est mesuré à l'aide d'une balance d'un gramme de précision avant le début de l'expérimentation ce qui permet de répartir les rats en groupes de poids homogène puis à intervalles réguliers de l'expérimentation.

La vitesse de sédimentation des globules rouges :

La vitesse de sédimentation (VS) des globules rouges est réalisée à intervalles réguliers dans des microtubes en utilisant 1ml de sang rétro-orbital récupéré dans 222 μ l de citrate de sodium 5%. La sédimentation est mesurée en mm après une heure (HILDEBRANDT *et al.*, 2000).

Réalisation des coupes histologiques :

Les pattes sont disséquées au-dessus de la cheville et du poignet, fixées dans 10% formol pendant une semaine, puis décalcifiées dans l'acide formique 5% avec changement de bains jusqu'à une décalcification complète (CAMPO *et al.*, 2003). Les étapes suivantes: inclusion, coupe, et coloration (BENSALEM-BENDJELLOUL, 1998) sont effectuées au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique, CHU de Sétif. L'analyse des coupes histologiques a porté sur les critères d'inflammation synoviale, intégrité du cartilage, érosion de l'os, infiltration de la moelle osseuse et d'inflammation extra articulaire (BOYLE *et al.*, 2001).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les premiers signes significatifs du développement de l'arthrite ne commencent à apparaître qu'au bout de 14 jours de la première injection. Ce temps correspond à environs sept jours de l'apparition des anticorps spécifiques (réponse primaire) (ROITT *et al.*, 1985). L'arthrite typique a touché 70% (7/10) des rats et les articulations impliquées sont essentiellement les articulations distales des pattes postérieures: cheville, articulations métatarso-phalangiennes et inter-phalangiennes. Le genou est également affecté chez certains rats. Le gonflement touche en premier lieu la cheville et les tissus qui l'entourent, puis se propage pour atteindre toute la patte qui devient rouge et ankylosée. Les métatarso-phalangiennes et les inter-phalangiennes ne sont atteintes que tardivement donnant un maximum de gonflement de la patte.

Volume de l'œdème :

Le volume des quatre pattes de chaque rat est mesuré par le pléthysmomètre le jour de l'induction de l'arthrite et la différence entre cette mesure et les mesures ultérieures représente le volume de l'œdème. L'augmentation du volume d'œdème du groupe arthritique par rapport au normal ne devient significative qu'au 14^{ème} jour ($p = 0.05$) puis elle augmente très rapidement pour atteindre un maximum au 21^{ème} jour où les pattes gagnent 130.05% ($p = 0.01$) de leur volume initial en comparaison avec le groupe normal dont les pattes ne gagnent que 20.73% de leur volume initial suite à la croissance normale. Le gonflement diminue ensuite graduellement pour disparaître finalement au bout de 60 jours laissant des articulations déformées. Néanmoins, il reste significatif jusqu'au 30^{ème} jour ($p = 0.01$) (Cf. Figure 1).

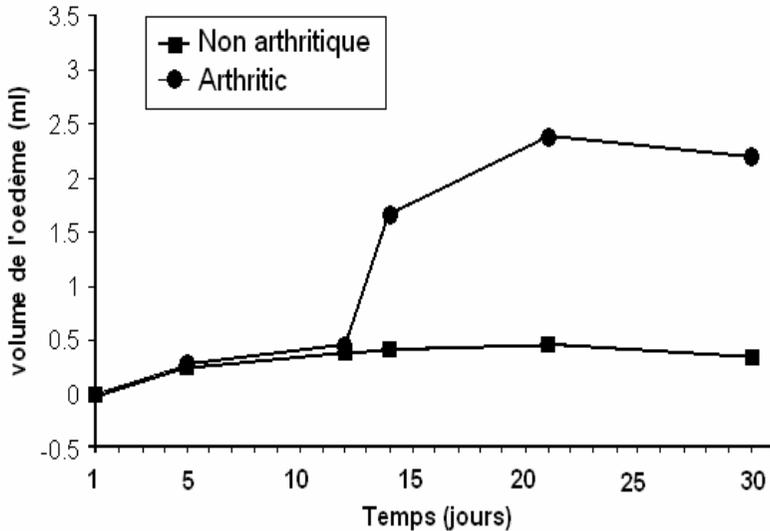


Figure 1 : Volume de l'œdème en ml de gonflement

Poids corporel :

Les rats arthritiques ne supportent plus la peine causée par le déplacement sur leurs pattes oedémateuses et nous avons remarqué qu'ils atteignent difficilement la nourriture. Ce qui, en plus de l'inflammation généralisée, a influencé énormément le poids du groupe. Les rats du groupe malade ont perdu jusqu'à 8.68% de leur poids initial au bout de 30 jours ($p = 0.05$) en comparaison avec le groupe normal qui lui a gagné 6.42 % de son poids (Figure 2), ceci donne une différence nette de 15,1%.

Vitesse de sédimentation des globules rouges :

L'inflammation s'est répercutée aussi sur la vitesse de sédimentation des globules rouges qui augmente légèrement dès la déclaration de l'arthrite au 14^{ème} jour. Elle arrive ensuite à un maximum le jour 21, dépassant de 4 fois celle du groupe témoin ($p = 0.01$). Ensuite la VS commence à revenir à la normale avec la diminution de l'intensité de l'arthrite, mais elle reste néanmoins élevée jusqu'au 30^{ème} jour

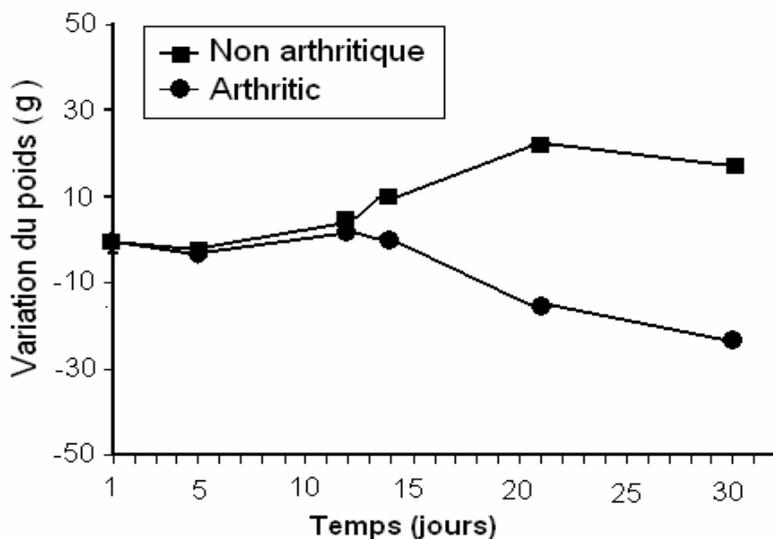


Figure 2 : Changement du poids corporel (poids – poids initial).

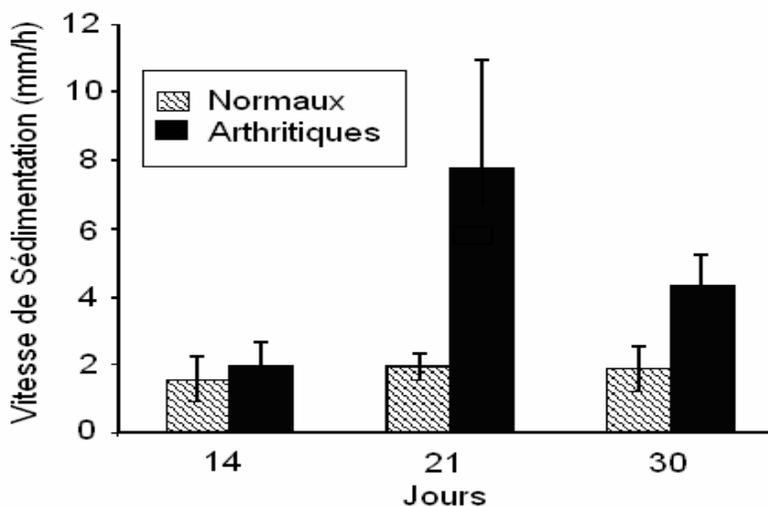


Figure 3 : Vitesse de sédimentation (une heure). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM.

Histopathologie :

Chez le rat arthritique, la prolifération de la membrane synoviale est bien visible. On constate même la formation d'un "pannus" qui ressemble beaucoup à celui observé dans la maladie humaine (BROSTOFF *et al.*, 1993) (Figure 4a, b). On note également l'insertion du pannus formé dans la cavité articulaire pour arriver au contact direct avec le cartilage et l'os. Des régions de dégradation du cartilage et de l'os sont très visibles (Figure 4c, d). Cette observation explique bien les raisons de la lourdeur remarquée dans le mouvement des rats arthritiques

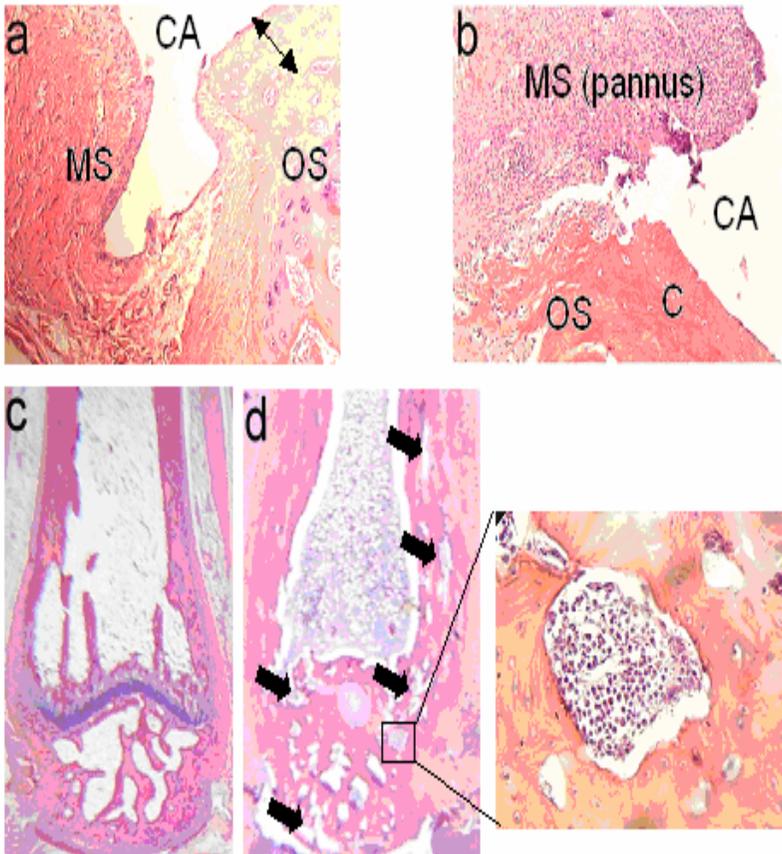


Figure 4 : Formation du pannus et dégradation du cartilage et de l'os. (a) témoin non arthritique, (b) dégradation du cartilage et érosion de l'os cortical (grossissement à 100X). (c) témoin non arthritique, et (d) perte de l'os trabéculaire sous l'action des ostéoclastes avec grossissement 400X de la région encadrée.

Infiltration des leucocytes :

L'œdème et les médiateurs inflammatoires attirent les leucocytes qui infiltrent les tissus articulaires et péri-articulaires. L'infiltration leucocytaire touche la membrane synoviale (Figure 5b). La membrane non arthritique contient elle aussi quelque leucocytes (Figure 5a). Parmi les leucocytes infiltrantes on observe des monocytes et un grand nombre de polynucléaires. La moelle osseuse non arthritique contient des amas de globules rouges facilement identifiables par leur forme en lentilles mais pas de cellules inflammatoires (Figure 5c, e). Par contre, celle des arthritiques renferme en plus des globules rouges des leucocytes et des ostéoclastes qui prolifèrent et s'activent sous les conditions inflammatoires de l'articulation (BOLON *et al.*, 2004) (Figure 5d, f).

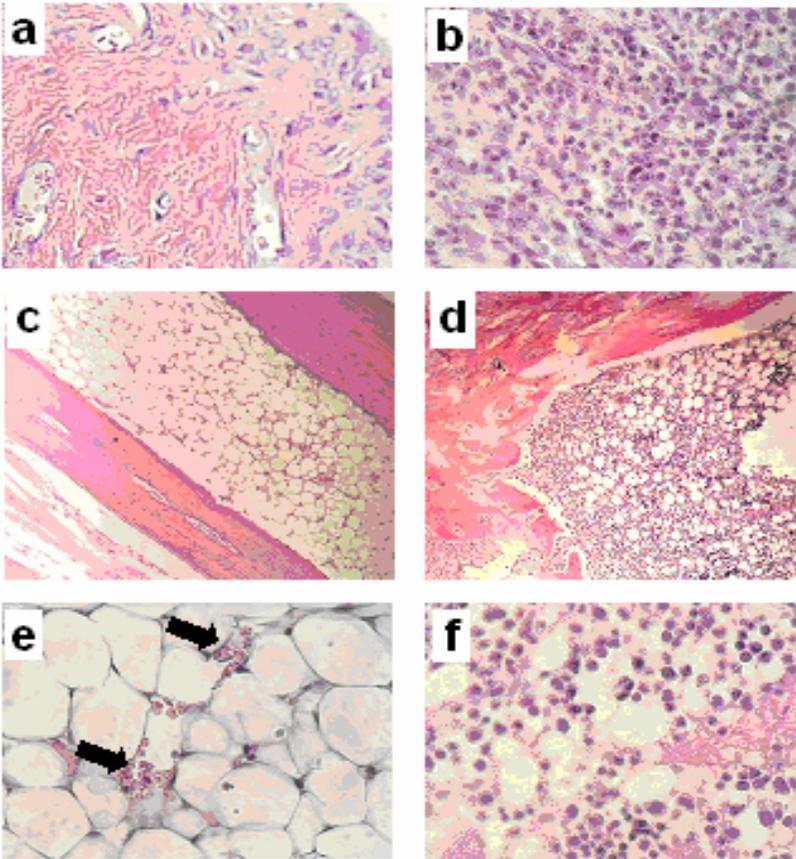


Figure 5 : Prolifération et infiltration cellulaire : en (a), (c) et (e) témoin non arthritique. En (b) prolifération de la synoviale et son infiltration par les leucocytes (grossissement 100X). En (d) et (f) prolifération des ostéoclastes et invasion de la moelle osseuse (grossissement 100X et 400X respectivement).

CONCLUSION

Les modèles animaux développés pour les maladies humaines constituent un outil d'une grande importance dans les études étiologiques, physiopathologiques et thérapeutiques. Dans notre travail, nous avons réussi à provoquer la maladie chez les rats Albino Wistar et suivre son développement. La maladie remplit la plupart des critères d'inclusion fixés par l'association américaine de rhumatologie pour le diagnostic de l'arthrite chez l'homme, ce qui rend ce modèle un outil de valeur dans notre laboratoire pour les futures études de certains aspects de l'arthrite et des effets des extraits de plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle.

REMERCIEMENTS

Ce travail est financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS) et par l'Agence Nationale pour le Développement de la Recherche en Santé (ANDRS). Les auteurs remercient infiniment le service d'anatomie pathologique du CHU de Sétif.

BIBLIOGRAPHIE:

1. Bäcklund, J., Nandakumar, K. S., Bockermann, R., Mori, L. and Holmdahl, R. 2003. Genetic control of tolerance to type II collagen and development of arthritis in an autologous collagen-induced arthritis model. *J. Immunol.* 171, 3493-3499.
2. Bensalem-Bendjelloul, M. 1998. Techniques histologiques théorie et pratique. Office des publications universitaires. pp 6-41.
3. Bolon, B., Morony, S., Cheng, Y., Hu, Y-L. and Feige, U. 2004. Osteoclast numbers in Lewis rats with adjuvant-induced arthritis: identification of preferred sites and parameters for rapid quantitative analysis. *Vet. Pathol.* 41, 30-36.
4. Boyle, D. L., Kowaluk, E. A., Jarvis, M. F., LEE, C., Bhagwat, S. S., Williams, M. and Firestein G. S. 2001. Anti-inflammatory effects of ABT-702, a novel non-nucleoside adenosine kinase inhibitor, in rat adjuvant arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 495-500.
5. Brostoff, J., Scandling, G. K., Male, D., Roitt, I. M. 1993: Immunologie clinique. Ed. Université de Boeck. Belgique. P: 325.
6. Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., Ferlazzo, A., M., Altavilla, D. and Calatroni, A. 2003. Efficacy of treatment with glycosaminoglycans on experimental collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Res. Ther.* 5, R122-R131.

7. Carison, B. C., Jansson, A. M., Larsson, A., Bucht, A. and Lorentzen, J. C. 2000. The endogenous adjuvant squalene can induce a chronic T-cell-mediated arthritis in rats. *Am. J. Pathol.* 156, 2057-2065.
8. Cope, A. P. 2003. Exploring the reciprocal relationship between immunity and inflammation in chronic inflammatory arthritis. *Rheumatology.* 42, 716-731.
9. Danks, L., Sabokbar, A., Gundle, R. and Athanasou, N. A. 2002. Synovial macrophages-osteoclast differentiation in inflammatory arthritis. *Ann. Rheum.* 61, 916-921.
10. Hart, B. A., Bank, R. A., De Roos, J. A. D. M., Brok, H., Jonker, M., Theuns, H. M., Hakimi, J. and Te Koppele, J. M. 1998. Collagen-induced arthritis in Rhesus monkeys: evaluation of markers for inflammation and joint degradation. *Br. J. Rheumatol.* 37, 314-323.
11. Hansson, A-S., Lu, S. and Holmdahl, R. 2002. Extra-articular cartilage affected in collagen-induced, but not pristane-induced, arthritis models. *Clin. Exp. Immunol.* 127, 37-42.
12. Hietala, M. A., Jonsson, I-M., Tarkowski, A., Kleinau, S. and Pekna, M. 2002. Complement deficiency ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *J. Immunol.* 169, 454-459.
13. Hildebrandt, G., Jahns, J., Hindemith, M., Spranger, S., Sack, U., Kinne, R. W., Madajsterba, P., Wolf, U. and Kamprad, F. 2000. Effects of low dose radiation therapy on adjuvant induced arthritis in rats. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (8), 1143-1153.
14. Holm, B. C., Svelander, L., Bucht, A. and Lorentzen, J. C. 2002. The arthritogenic adjuvant squalene does not accumulate in joints, but give rise to pathogenic cells in both draining and non-draining lymph nodes. *Clin. Exp. Immunol.* 127, 430-435.
15. Kagari, T., Doi, H. and Shimozato, T. 2002. The importance of IL-1 β and TNF- α , and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J. Immunol.* 169, 1459-1466.
16. Lorentzen, J. C., Glaser, A., Jacobsson, L., Galli, J., Fakhrai-rad, H., Klareskog, L. and Luthman, H. 1998. Identification of rat susceptibility loci for adjuvant-oil-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 6383-6387.
17. Nandakumar, K. L., Svensson, L. and Holmdahl, R. 2003. Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes. *Am. J. Pathol.* 163(5), 1827-1836.

18. Pettit, A. R., Ji, H., von Stechow, D., Müller, R., Goldring, S. R., Choi, Y., Benoist, C. and Grvallese, E. M. 2001. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in serum transfer model of arthritis. *Am. J. Pathol.* 159, 1689-1699.
19. Prakken, B. J., Van Der Zee, R., Anderton, S. M., Van Kooten, P. J. S., Kuis, W. and Van Eden, W. 1997. Peptide-induced nasal tolerance for a mycobacterial heat shock protein 60 T cell epitope in rats suppresses both adjuvant arthritis and nonmicrobially induced experimental arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 3284-3289.
20. Roitt, L., Brostoff, J. and Male, D. 1985. Immunology. Gower Medical Publishing. London.
21. Schrier, D., Gilbertsen, R. B., Lesch, M. and Fantone, J. 1984. The role of neutrophils in type II collagen-induced arthritis in rats. *Am. J. Pathol.* 117, 26-29
22. Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C. and Boudoukha, C. 2003. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp. Toxic. Pathol.* 54, 313-318.
23. Stuart, J. M., Watson, W. C. and Kang, A. H. 1988. Collagen autoimmunity and arthritis. *FASEB J.* 2, 2950-2956.
24. Svelander, L., Holm, B. C., Bucht, A. and Lorentzen, J. C. 2001. Responses of the rat immune system to arthritogenic adjuvant oil. *Scand. J. Immunol.* 54, 599-605.
25. Trentham, D. E., Townes, A. S. and Kang, A. H. 1977. Autoimmunity to type II collagen : an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.* 146, 857-869.
26. Vaillancourt, G. 1990. Arthrites et rhumatisme. Les Presse de l'Université de Montréal. pp 27-43.
27. Waksman, B. H. 2002. Immun regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis. *Scand. J. Immunol.* 56, 12-34.
28. Wipke, B. and Allen, P. M. 2001. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of murine model of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 167, 1601-1608.
29. Zhang, H-G., Yang, P., Xie, J., Liu, Z., Liu, D., Xiu, L., Zhou, T., Wang, Y., Hsu, H-C. and Mountz, J. D. 2002. Depletion of collagen II-reactive T Cells and Blocking of B cell activation prevents collagen II-induced arthritis in DBA/1j mice. *J. Immunol.* 168, 4164-4172.

ENQUETE SUR LA TUBERCULOSE BOVINE DANS DEUX ABATTOIRS D'ALGERIE

SAHRAOUI N⁽¹⁾, YALA D⁽²⁾, OUZROUT R⁽³⁾, GUETARNI D⁽¹⁾ & BOULAHBAL F.⁽²⁾

- (1) Université Saad DAHLAB, Blida, Algérie.
(2) Service de la tuberculose et des mycobactéries, Institut Pasteur d'Algérie.
(3) Centre universitaire d'El Tarf

RESUME

En Algérie, la situation de la tuberculose bovine est mal connue. Elle est fréquemment suspectée aux abattoirs. Cette suspicion doit être complétée par les examens de laboratoire.

Dans la présente étude, nous rapportons les résultats d'une enquête réalisée durant la période d'août à novembre 2007. Sur un total de 7250 carcasses bovines examinées, 260 présentaient des lésions suspectes de tuberculeuses, soit une prévalence de 3,58%.

La distribution des lésions montre une atteinte des ganglions respiratoires principalement avec un taux de 76,92%. L'examen microscopique des 260 pièces analysées a montré une positivité de 28,85%. L'isolement et l'identification des isolats ont permis de confirmer 134 cultures positives, soit un taux de 51,54%. Parmi ces dernières, 86,57% sont des souches de *Mycobacterium bovis* et 13,43% des souches atypiques.

Par conséquent, bien que le programme d'éradication existe depuis plusieurs années, la maladie sévit encore en Algérie.

Mots clés : Tuberculose bovine, abattoir, microscopie, culture, identification, *Mycobacterium bovis*.

INTRODUCTION

La tuberculose bovine est l'une des maladies les plus répandues et les plus dévastatrices dans les pays en développement, notamment en Afrique (DELAFOSSÉ, 1995 ; BÉNKIRANE, 1998 ; BONSU, 2000). Son impact économique (grandes pertes par saisies en abattoirs et diminution de la production laitière) et son importance sur la santé publique ont conduit au développement de programmes de contrôle et d'éradication dans de nombreux pays.

En Algérie, en plus d'un programme pluriannuel d'assainissement des bovins lancé depuis 1995 et de sa position de maladie à déclaration obligatoire (décret exécutif n°95_66 du 22/02/1995), les récents rapports de l'OIE montrent des taux d'infection de 0,49 % et 0,39%, enregistrés en 2001 et en 2003, respectivement (OIE, 2004).

La tuberculose bovine est une maladie très contagieuse causée par une bactérie appelée *Mycobacterium bovis*. La maladie peut affecter presque tous les mammifères incluant l'homme. La bactérie responsable infecte les ganglions lymphatiques et se propage ensuite à d'autres organes comme les poumons. La tuberculose évolue lentement chez l'animal atteint. Les symptômes généraux sont la faiblesse, la perte d'appétit et de poids et une fièvre variable. Quand les poumons sont très affectés, on peut observer de façon intermittente des quintes de toux.

De nos jours, c'est souvent à l'abattoir que la tuberculose est détectée. La découverte de lésions granulomateuses caractéristiques dans les ganglions lymphatiques ou dans certains organes lors de l'inspection des carcasses animales est une indication de la présence de la maladie (ARTOIS et al. 2000).

Dans la présente étude, nous nous proposons de faire une enquête par la recherche de l'agent causal de la maladie et l'identification des spécimens provenant de deux abattoirs situés dans la région nord de l'Algérie.

MATERIEL ET METHODES

Animaux :

La présente étude a été menée dans deux abattoirs (Blida et Alger) situés au nord de l'Algérie, durant la période d'août à novembre 2007. Sur un effectif global de 7250 bovins abattus, nous avons mis en évidence des lésions suspectes de tuberculose sur 260 carcasses.

Prélèvements :

A partir des lésions observées, des échantillons ont été prélevés et déposés dans des pots stériles accompagnés d'une fiche de renseignements. Tous les prélèvements sont transportés sous glace au laboratoire national de référence de la Tuberculose et des mycobactéries de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Traitement des échantillons :

Au laboratoire, les spécimens sont sectionnés en petits morceaux en utilisant des lames stériles et des boîtes de Pétri. Les fragments ainsi prélevés sont broyés et homogénéisés avec un mortier et un pilon. L'homogénéisat a servi pour l'examen microscopique et la culture bactérienne.

Examen microscopique :

A l'aide d'une anse de platine rigide, préalablement flambée et refroidie, on prélève une parcelle de l'échantillon. Le contenu de l'anse est étalé en couche mince au centre de la lame. Les frottis sur lames sont confectionnés pour tous les prélèvements, après avoir séché la lame, cette dernière est fixée par trois passages rapides sur la flamme, ensuite le frottis est coloré et lu au microscope optique avec un objectif à immersion (x 100).

Décontamination et mise en culture :

L'homogénéisat a été décontaminé par adjonction de 4ml d'acide sulfurique à 4%, puis neutralisé par NaOH à 6% en utilisant le bleu de bromothymol comme indicateur. La neutralisation a été atteinte par passage de la couleur jaune au vert.

Deux tubes de milieu de Lowenstein- Jensen, l'un enrichi de pyruvate de sodium et l'autre de glycérol ont étéensemencé à raison de 3 ml de la suspension de l'échantillon ainsi traité par tube puis incubés à 37° C pendant 12 semaines. Un suivi hebdomadaire de la croissance des colonies a été faite. Quand la croissance est visible, des frottis sont préparés et colorés selon la technique de Ziehl- Neelsen.

Identification :

Une identification primaire des espèces mycobactériennes est basée sur les délais d'apparition des colonies et leur morphologie. L'identification proprement dite a consisté en la réalisation de trois tests biochimiques (DE KANTOR et al., 1998 ; VESTAL, 1978), à savoir, la réduction des nitrates, l'accumulation de la niacine et l'activité catalasique thermolabile à 68°C (KENT et KUBICA, 1985).

Ces tests ont été effectués pour l'identification des mycobactéries et pour différencier les souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* des souches atypiques.

RESULTATS

L'inspection des 7250 carcasses bovines a montré que 260 carcasses portent des lésions suspectes de tuberculose, soit une prévalence de 3,58%.

Les lésions se localisaient principalement dans les poumons, les ganglions qui les drainent et dans le foie.

La répartition de l'origine des lésions en fonction des prélèvements est rapportée dans le tableau ci- après.

Tableau n°1 : Localisation des lésions.

Localisation des lésions	Carcasses suspectes	
	nombre	(%)
Ganglions	200	76,92
Poumon	41	15,77
Plèvre	4	1,54
Foie	8	3,08
Mésentère	2	0,77
Tête	5	1,92
Total	260	100

Il en ressort que plus de 76% des lésions sont localisées dans les ganglions thoraciques, 15,77% dans les poumons et les 8,23% restantes touchent à la plèvre, le foie, le mésentère et la tête.

La microscopie :

A partir des 260 frottis confectionnés pour examen microscopique, seulement 75 ont été trouvés positifs. Ces résultats sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°II : résultats de la microscopie.

Microscopie	Frottis confectionnés à partir de lésions suspectes	
	n	(%)
Positive	75	28,85
Négative	185	71,15
Total	260	100

Les résultats de la microscopie montrent que le pourcentage des frottis positifs est inférieur à celui des frottis négatifs (28,85 %) vs (71,15 %).

2) Culture bactérienne :

Les résultats de la culture bactérienne après 3 mois d'incubation sont rapportés dans le tableau n°III :

Tableau n°III : résultats des cultures bactériennes

Culture	Lésions analysées	
	n	%
Positive	134	51,54
Négative	106	40,77
Contaminée	20	7,69
Total	260	100

Au total, nous avons isolé 134 cultures positives (51,54%) contre 106 négatives (40,77%). 20 cultures ont été contaminées, soit 7,69%.

3) Identification biochimique :

Les résultats de l'identification biochimique sont rapportés dans le tableau n°IV.

Tableau n°IV : résultats de l'identification biochimique

Souches isolées	Cultures bactériennes positives	
	N	%
<i>M bovis</i>	116	86,57
MNT	18	13,43
Total	134	100

Les cultures et les tests biochimiques ont permis d'identifier 86,57 % des souches à *M. bovis* et 13,43 % des souches aux mycobactéries non tuberculeuses (MNT).

DISCUSSION

En Algérie, la situation de la tuberculose bovine reste inconnue. Seuls, les cas positifs de dépistage sont rapportés dans les statistiques du ministère de l'Agriculture. L'OIE rapporte 434 cas de tuberculose bovine dépisté par IDR pour l'année 2003. Aucune donnée épidémiologique n'a, à ce jour, été publiée. Par conséquent, le véritable statut de la population bovine à l'égard de la tuberculose reste inconnu et les présents résultats ne pourront faire l'objet d'une comparaison avec d'autres études.

A l'inspection des carcasses, il en ressort que la distribution des lésions montre que 76,92% ont principalement concernés les ganglions thoraciques. Une observation similaire a été faite par TEKLU (2004) qui rapporte que 84% des lésions se trouvent dans les ganglions thoraciques et les poumons, la prédominance des lésions tuberculeuses dans les voies respiratoires est expliquée par la transmission de la maladie par voie respiratoire ; cette dernière est considérée comme la principale voie de transmission (O'REILLY et DABORN, 1995).

La bacilloscopie a révélé un pourcentage de BAAR de 28,85% qui est insuffisant. Ces résultats ne sont pas étonnants, du moment que l'examen microscopique n'est pas sensible et il n'est positif que si le prélèvement contient plus de 10^4 /ml (CARBONNELLE et al., 2003). Par ailleurs, l'examen direct est considéré comme le test le moins sensible pour la détection des BAAR par rapport à toutes les méthodes de diagnostic (BARON et al., 1994 ; CERNOCH et al., 1994). Mais, malgré la faible sensibilité connue à cette méthode de diagnostic, nos résultats sont comparables à ceux rapportés par DIGUIMBAYE (2006) pour des prélèvements d'abattoirs où le taux est de 21%.

Pour la **culture bactérienne**, nous avons obtenu 51,54% cultures positives, 40,77% cultures négatives et 7,69% cultures contaminées. Nos résultats sont faibles par rapport à ceux rapportés par DIGUIMBAYE (2006) qui a obtenu 65,7% cultures positives, 27,3% cultures négatives et 7% cultures contaminées.

Toutefois, le faible taux de cultures positives pourrait s'expliquer par l'absence de mycobactéries viables dans les lésions tuberculeuses complètement calcifiées. En effet, dans ce type de lésions, le bacille tuberculeux est non viable et les cultures sont négatives (GRACY, 1986 ; QUINN et al., 1994). L'absence de la croissance des cultures sur certains spécimens présentant des lésions au moment de l'inspection peut être expliqué par la présence d'autres affections causées par d'autres germes non tuberculeux appartenant toujours à la famille des actinomycétales, tel que *Nocardia* (TEKLU et al., 2004).

L'**identification biochimique** a révélé que 86,57% des souches isolées appartiennent à *Mycobacterium bovis* et 13,43% aux Mycobactéries non tuberculeuses. Nos résultats sont différents de ceux rapportés par DIGUIMBAYE (2006) où 41,66% des souches isolées appartiennent à *M bovis* et 58,33% aux MNT.

CONCLUSION

La présente étude a permis de mettre en évidence la présence de lésions suspectes de tuberculose sur 3,58 % des carcasses examinées dans deux abattoirs de la région centre. La culture a montré que seulement 51,54 % sont positives et l'isolement a révélé que 86,57 % des souches appartiennent à *Mycobactérium bovis*.

Par conséquent, l'enquête montre bien que les bovins, en Algérie, sont plutôt touchés par la tuberculose que par les autres mycobactérioses.

L'examen bactériologique a un grand intérêt tant pour la santé humaine que animale et reste le meilleur moyen pour le diagnostic de la tuberculose.

Ces éléments contribuent à une meilleure compréhension de la situation de la tuberculose bovine en Algérie.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARTOIS M. ; LOUKIADIS E. ; GARIN-BASTUJI B. ; HARS J. 2000.
2. Projet article Tuberculose faune sauvage, Bull. Epidemio. AFSSA. Réalisé dans le cadre d'un mémoire de stage professionnel de l'école nationale des services vétérinaires, dans l'unité de pathologie infectieuse et épidémiologie à l'école nationale vétérinaire.
3. BARON E.J., PETERSON L.R., FINEGOLD S.M., 1994.
4. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 9th Ed. Mosby-Yearbook Inc., Missouri, 590-631.
5. BENKIRANE A, (1998) : Short communication : Bovine tuberculosis in Africa. FAO, Animal Production and Health Division, Rom. ARM/RMZ 90, 54-56.
6. BONSU O.A. ; Laing E., Akanmoriu B.D., 2000. prevalence of tuberculosis in cattle in the Dangme –West district of Ghana public health implications, Acta Trop. 76 (2000), pp. 9-14.
7. CARBONNELLE B., DAILLOUX M., LEBRUN L., MAUGEIN J., PERNOT C., 2003. Mycobactéries et mycobactérioses- Cahier de formation de biologie médicale n° 29 p 37-45.
8. CERNOCH P.L., Enns R.K., Saubolle M. A Wallace F.J. 1994. Laboratory diagnosis of the mycobactérioses. ASM Press, Iowa, 1-36.
9. DE KANTOR I., Kim S.J. Frieden T. Loszjo A. Luelmo F., Norval P.V.Rieder H. Valenzuela P. Weyer K.1998. Laboratory services in tuberculosis control, parts I –III. World Health Organization, Geneva, 101-125.
10. DELAFOSSE, A., Traore, A., Kone, B., (1995): Isolation of pathogenic mycobacterium strains in cattle slaughtered in Bobo-Dioulasso, Burkina Fasso. Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux. 48:4, 301-306.
11. DIGUIMBAYE-DJAIBE C. 2006. la tuberculose humaine et animale au Tchad : Contribution à la mise en évidence et caractérisation des agents causaux et leur implication en santé publique. Thèse d'état. pp 51-58
12. GRACY, 1986. Meat hygiene, 8th Ed. Bailliere Tindall, Eastbourne, 350-360.
13. KENT P.T., KUBICAG.P. 1985. public health mycobacteriology- a guide for the level III laboratory. U.S. Departement of health and human Services publication, Atlanta, Ga.

14. O'REILLY LM. , DABORN C.J, 1995. The epidemiology of *M bovis* infection in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis.*, 76(1), 1-46.
15. Office International des Epizooties (OIE), 2004. Bovine tuberculosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris, France: OIE;2004.
16. QUINN P.J. Larter M.E. Markey b Larter G.R. 1994. Clinical veterinary microbiology. Mosby- YearBook, Europe Ltd. London, 156-169.
17. TEKLU A., ASSEGED B., YIMER E., GEBEYEHU M., WOLDESENBET Z.,2004. Tuberculous lesions not detected by routine abattoir inspection: the experience of the Hossana municipal abattoir, southern Ethiopia.Rev.sci. tech.Off. int. Epiz.,2004, 23(3),957-964.
18. VESTAL A.L. 1978. Procedure for isolation and identification of mycobacterium. United states Department of H ealth, Education and Welfare, Public Health Service. Atlanta, 4-23.

