

REVUE TUNISIENNE DE BIOLOGIE CLINIQUE

المجلة التونسية للبيولوجيا السريرية

Volume 20, Numéro 1, Janvier - Février - Mars - Avril 2013

SOMMAIRE

• Editorial

S. Gargouri Fourati

• Articles originaux

✓ *Application du test de génération de thrombine à l'évaluation de l'hypercoagulabilité induite in vitro par des cellules cancéreuses.*

M. Sassi, G. Gerotziafas, T. Chakroun, V. Galea, H. Hassine, I. Elalamy

✓ *Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches d'Escherichia coli productrices de β -lactamases à spectre étendu à l'Hôpital Militaire de Tunis*

MS. Asli, T. Jaouadi, A. Agrebi, F. Barguellil

✓ *Etude des haplotypes associés à la mutation F508del dans une population Tunisienne*

S. Oueslati, S. Hadj Fredj, M. Boudaya, C. Sahli, H. Siala, A. Bibi, T. Messaoud

• Pratique quotidienne

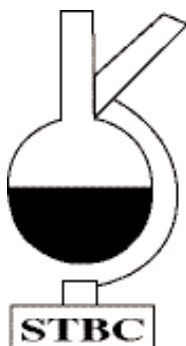
✓ *Infection du liquide d'ascite causée par streptococcus Pneumoniae chez un patient cirrhotique*

S. Sammoud, MS. Asli, MR. Bouali, F. Barguellil

✓ *Prevalence of vitamin D deficiency among the Jordanian population*

K. B. Al-Jaabari, M. M. Queisi, S. Al-Zaben, M. B. Abu-Zaid, S. O. Amarin

• Activités de la Société et nouvelles professionnelles



REVUE TUNISIENNE DE BIOLOGIE CLINIQUE

المجلة التونسية للبيولوجيا السريرية

ORGANE DE LA SOCIÉTÉ TUNISIENNE
DE BIOLOGIE CLINIQUE

Comité de Direction :

S. Hmida
F. Ben Hassine
T. Messaoud
F. Messaadi
M.H. Ben Aribia
G. Merdassi

Comité de Rédaction :

Rédacteur en chef :

MC. Ben Rayana

Attachés à la rédaction :

S. Besbes
L. Slim Saidi
N. Ben Romdhane
A. Elkadhi
N. Nabli

Comité de lecture :

A. Amor, A. Ayadi, H. Babba,
R. Barbouch, F. Barguelli,
E. Belhassen, S. Ben Ammar,
M.A. Ben Amor, K. Ben Romdhane,
Y. Brahem, E. Chaker, W. Douki,
M. Elloumi, M. Feki, S. Feki,
C. Fendri, N. Fnina, I. Ghedira,
Y. Gorgi, N. Gritli, M. Hassine,
A. Hedhili, S. Hmida, M. Jeddi,
N. Kaabachi, M. Kortas, C. Mazigh,
T. Messaoud, R. Mrad, M.F. Najjar,
B. Nsiri, A. Slim, L. Slim, Z. Tabka,
A. Trabelsi

Consultants étrangers :

V. Blatton (Belgique),
L. Chabraoui (Maroc), J-L. Dhondt
(France), M. Ferrari (Italie),
J.C. Forrest (Canada), M. Germanos
(Liban), P. Gillery (France),
J. Hickes (USA), A. Legrand
(France), JF. Lesesve (France),
M. Muller (Autriche),
P. Mura (France)

Adresse : RTBC/STBC

Résidence Tunis Carthage - Appartement C10

Borj Baccouche - 2027 - Ariana Tunisie

Tél/Fax : (+216) 71 709 647

E-mail : contact@stbc.org.tn

chiheb.rayana@rns.tn

SOMMAIRE

	Pages
• Editorial	3
<i>S. Gargouri Fourati</i>	
• Articles originaux	5
✓ Application du test de génération de thrombine à l'évaluation de l'hypercoagulabilité induite in vitro par des cellules cancéreuses <i>M. Sassi, G. Gerotziafas, T. Chakroun, V. Galea, H. Hassine, I. Elalamy</i>	
✓ Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches d'<i>Escherichia coli</i> productrices de β- lactamases à spectre étendu à l'Hôpital Militaire de Tunis <i>MS. Asli, T. Jaouadi, A. Agrebi, F. Barguelli</i>	
✓ Etude des haplotypes associés à la mutation F508del dans une population Tunisienne <i>S. Oueslati, S. Hadj Fredj, M. Boudaya, C. Sahli, H. Siala, A. Bibi, T. Messaoud</i>	
• Pratique quotidienne	28
✓ Infection du liquide d'ascite causée par <i>Streptococcus pneumoniae</i> chez un patient cirrhotique <i>S. Sammoud, MS. Asli, MR. Bouali, F. Barguelli</i>	
✓ Prevalence of vitamin D deficiency among the Jordanian population <i>K. B. Al-Jaabari, M. M. Queisi, S. Al-Zaben, M. B. Abu-Zaid, S. O. Amarin</i>	
• Activités de la Société et nouvelles professionnelles	38

Rev Tun Biol Clin 2013 ; 20 (1) : 3-4

S. GARGOURI FOURATI

Le paludisme en Tunisie : l'alerte ?

L'actualité médicale a été dominée il y a quelques semaines par l'apparition de quelques cas de paludisme évoquant l'éventualité d'une reprise de la transmission de cette parasitose dans notre pays.

Le paludisme est une parasitose causée par des hématozoaires du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par les piqûres de moustiques vecteurs infectés appartenant au genre *Anopheles* qui piquent surtout la nuit. Parmi les cinq espèces de *Plasmodium*, *Plasmodium falciparum* est le plus dangereux.

Le paludisme se manifeste essentiellement par des épisodes fébriles aigus apparaissant habituellement 10 à 15 jours après la piqûre de moustique infectante. Les premiers symptômes à savoir la fièvre, les céphalées et les troubles digestifs peuvent être modérés et difficiles à attribuer au paludisme. Non traité dans les 24 heures, le paludisme à *Plasmodium falciparum* peut évoluer vers une forme sévère souvent mortelle. L'immunité humaine est un facteur important en particulier chez les adultes dans les zones de faible transmission. Elle se développe après des années d'exposition et bien qu'elle ne confère jamais une protection totale, elle réduit le risque d'apparition des formes sévères. C'est pour cette raison que la plupart des décès par paludisme en Afrique surviennent chez de jeunes enfants alors que dans les zones de faible transmission où la population est peu immunisée, tous les groupes d'âge sont exposés.

Le diagnostic et le traitement précoces permettent de réduire l'intensité de la maladie et évitent l'évolution vers les formes graves. Les meilleurs traitements disponibles actuellement en particulier pour le paludisme à *Plasmodium falciparum* sont des associations comportant de l'artémisinine. L'OMS recommande que dans tous les cas présumés, le paludisme soit confirmé par un diagnostic parasitologique basé sur la recherche de *Plasmodium* par la goutte épaisse et le frottis sanguin qui restent les méthodes de référence même si les tests de diagnostic rapide gagnent de plus en plus en spécificité et sensibilité.

L'OMS estime à 3,3 Milliards le nombre de personnes exposées au risque de paludisme. En 2010 environ 216 millions de cas et 660 décès ont été enregistrés dont plus de 40% au Nigéria et en République Démocratique du Congo.

La Tunisie connaît depuis 1979 l'élimination du paludisme qui se définit comme l'interruption de la transmission locale de la parasitose et donc une incidence de zéro cas contractés localement. En dehors de rares cas post-transfusionnels, les cas rapportés en Tunisie jusqu'en 2013 sont tous importés et observés chez des sujets originaires ou ayant séjourné dans des pays impaludés.

Professeur hospitalo-universitaire en Parasitologie
Service de Parasitologie
Hôpital Militaire Principal
D'Instruction de Tunis

L'intensification des échanges de notre pays avec l'Afrique sub-saharienne avec l'apparition de nouvelles lignes aériennes directes s'est accompagnée d'une augmentation de l'incidence annuelle de ces cas importés ; la contamination ayant lieu dans ces pays notamment le Mali et la Côte D'Ivoire. Par ailleurs, la mise en évidence de Plasmodium chez des sujets asymptomatiques et surtout le portage de gamétocytes illustre le risque de reprise de la transmission au vu de la persistance de l'anophélisme en Tunisie et confirme l'intérêt du dépistage systématique chez les populations à risque. La survenue des cas de paludisme d'importation entre juin et octobre coïncidant avec la saison d'activité des anophèles vecteurs augmente le risque potentiel d'un éventuel contact anophèle-Plasmodium.

A côté des cas d'importation, le paludisme des aéroports, forme plus particulière du paludisme autochtone menace en l'absence de l'application des mesures rigoureuses de prévention, la reprise de transmission du paludisme. Dans cette forme c'est le moustique du genre Anopheles infecté par un Plasmodium qui voyage depuis une zone d'endémie jusqu'à un aéroport en zone indemne. La gravité du paludisme des aéroports s'explique par la fréquence de Plasmodium falciparum infectant des individus non prémunis et par un retard de diagnostic, cette étiologie étant rarement évoquée chez un sujet n'ayant pas quitté la Tunisie et n'ayant pas été transfusé. La survenue de cas groupés dans une même zone riveraine d'aéroport doit constituer une alerte permettant d'évoquer le paludisme.

La prévention du paludisme d'aéroport repose sur les mesures de lutte antivectorielle à bord des avions quittant les pays d'endémie par la diffusion d'insecticide dans les cabines et les soutes. Ces mesures doivent s'intégrer dans un programme de surveillance rigoureuse du paludisme afin de minimiser le risque potentiel de la reprise de transmission dans notre pays. Ce programme devrait inclure le dépistage et le traitement des sujets parasités même asymptomatiques originaires ou ayant séjourné dans des zones endémiques, l'actualisation des protocoles thérapeutiques et chimio prophylactiques, la disponibilité des antipaludéens ainsi que la sensibilisation à large échelle des voyageurs et de la population au risque de paludisme.

Application du test de génération de thrombine à l'évaluation de l'hypercoagulabilité induite in vitro par des cellules cancéreuses

M. SASSI^{1,2},
G. GEROTZIAFAS¹,
T. CHAKROUN³,
V. GALEA¹,
H. VHASSINE⁴,
I. ELALAMY¹

Résumé : Les épisodes thrombotiques veineux constituent une complication fréquente et bien connue chez les patients atteints d'un cancer. L'expression constitutive du facteur tissulaire par les cellules cancéreuses est la cause majeure de la capacité procoagulante des cellules cancéreuses. Le test de génération de thrombine offre une mesure globale du potentiel de la coagulation. Il s'est imposé comme un outil d'apport considérable dans la détection des états d'hypercoagulabilité. L'objectif de notre étude était de développer et d'optimiser un modèle expérimental pour caractériser le phénotype procoagulant des cellules IGROV1 issues d'un adénocarcinome humain épithélial de l'ovaire par le biais du test de génération de thrombine. La génération de thrombine a été étudiée in vitro en plasma pauvre en plaquettes additionné de cellules cancéreuses. Nous avons montré que les cellules IGROV1 accélèrent et augmentent la génération de thrombine et que les paramètres chronométriques sont les paramètres les plus sensibles à l'augmentation du nombre de cellules cancéreuses. Ce modèle expérimental nous offre un outil précieux pour l'étude de l'hypercoagulabilité cellulaire induite par le cancer et nous ouvre la porte vers l'évaluation de la sensibilité des cellules cancéreuses aux divers anticoagulants.

Mots clés : Cancer - facteur tissulaire - hypercoagulabilité - test de génération de thrombine.

Thrombin generation assessment : an in vitro characterization of hypercoagulability induced by cancer

- ¹ Service d'hématologie biologique, Hôpital Tenon, Paris-France.
² Laboratoire du Centre de Maternité et de Néonatalogie, Monastir
³ Centre Régional de Transfusion Sanguine, Sousse
⁴ Laboratoire d'hématologie, Hôpital Fattouma Bourguiba, Monastir

Abstract : Thromboembolic events are a major complication in cancer patients. Overexpression of tissue factor is favourable to the development of thrombosis. Thrombin generation test is sensitive to detect hypercoagulable changes in the plasma. The present study has been designed to investigate the capacity of thrombin generation assay to detect the hypercoagulability induced by ovarian cancer cells. We aimed to characterize, in an in vitro model, the procoagulant phenotype of human epithelial ovarian adenocarcinoma cells, IGROV1. Thrombin generation was assessed using Calibrated Automated Thrombogram. IGROV1 cells suspended into platelet poor plasma results in a significant acceleration of thrombin generation and an increase of the Peak and the ETP. The impact of cancer cells on blood coagulation process in human plasma relies upon the number of cells being in contact with human plasma. This experimental system, using thrombin generation assessment,

article original

allows to characterize the “procoagulant fingerprint” of ovarian cancers cells. The sensitivity of thrombin generation assay to detect the procoagulant activity of cancer cells allows to use this assay in pharmacological studies assessing the efficacy of antithrombotic drugs on cancer induced hypercoagulability.

Key Words : Cancer - tissue factor - hypercoagulability - thrombin generation test.

Introduction

Chez les patients atteints de cancer, les épisodes thrombotiques veineux (ETV) constituent une complication fréquente et bien connue (1,2). Les complications thrombotiques sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité élevées et posent de multiples problèmes thérapeutiques chez les patients cancéreux hospitalisés ou en ambulatoire (3). En effet, la thrombose veineuse profonde, du fait du risque d'embolie pulmonaire, représente la deuxième cause de mortalité en oncologie (4). L'expression constitutive du facteur tissulaire (FT) par les cellules cancéreuses est la cause majeure de la capacité procoagulante des cellules cancéreuses (2,5). En effet, les cellules cancéreuses expriment environ 1000 fois plus de FT que les cellules normales correspondantes étant donné que les mécanismes de contrôle de l'expression du FT sont déréglés par les cellules cancéreuses (6). Or, le complexe FT-FVIIa est le détonateur de la coagulation. L'évaluation du processus de la génération de thrombine a été proposée dans l'étude de l'hémostase dans les années 1950 (7). Au milieu des années 1980, Hemker et ses collègues ont revu ce «vieux test ré-actualisé» et ils ont introduit quelques modifications pratiques innovatrices rendant le test plus facile à performer (8,9). Le Calibrated Automated Thrombography (CAT) est la version la plus récente du test de génération de thrombine (TGT). Le TGT offre une mesure globale du potentiel de la coagulation (8). Sa pertinence a été évaluée dans différents domaines. En particulier, le TGT s'est imposé comme un outil d'apport considérable dans la détection des états d'hypercoagulabilité. Dans ce travail, nous nous sommes proposés de mettre au point un modèle expérimental pour étudier in vitro l'hypercoagulabilité induite

par les cellules IGROV1, issues d'un adénocarcinome humain épithélial de l'ovaire, par le biais du TGT. Nous avons optimisé ce modèle expérimental pour caractériser le phénotype procoagulant des cellules IGROV1 et nous avons analysé l'effet des cellules IGROV1 sur les différentes phases et sur les différents paramètres de la génération de thrombine mesurée dans du plasma humain.

Matériels et méthodes

Mise en culture des cellules IGROV1

La lignée des cellules IGROV1 étudiée, a été isolée la première fois à partir d'un carcinome ovarien d'une femme de 47 ans et elle a été entretenue dans des cultures cellulaires et chez des souris (10). Les cellules IGROV1 ont été cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² contenant du milieu RPMI-1640 (Invitrogen, Cergy, Pontoise, France) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen, Cergy, Pontoise, France), 5 mM de glutamine et 50 U/ml de pénicilline-streptomycine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Les boîtes de culture ont été ensuite incubées dans une étuve à 37°C en présence de 100% d'humidité atmosphérique et 5% de CO₂. Quand les cellules ont atteint une confluence d'environ 50%, elles ont été incubées avec la trypsine (3 mn, 37°C), puis mises en suspension dans le milieu RPMI et enfin lavées dans un tampon phosphate salin. Après centrifugation (5 min, 200xg), le culot contenant les cellules IGROV1 a été mis en suspension dans du sérum physiologique (NaCl 9‰).

Recueil du plasma pauvre en plaquettes

Les prélèvements sanguins ont été effectués sur 6 volontaires sains ne prenant aucune médication pouvant interférer avec l'hémostase. Le sang a été collecté par ponction veineuse antécubitale atraumatique dans des

Application du test de génération de thrombine à l'évaluation de l'hypercoagulabilité induite in vitro

tubes Vacutainer® siliconés (Becton Dickinson, Meylan, France) contenant du citrate de sodium (0.129 M, 9 Volumes de sang et 1 Volume d'anticoagulant).

L'obtention d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP) nécessite une double centrifugation du sang total citraté à 2000g/15min. Toutes les expériences ont été effectuées sur chacun des 6 PPP recueillis.

Test de génération de thrombine

- Principe général du test de génération de thrombine dans un plasma pauvre en plaquette

La génération de thrombine a été étudiée dans le PPP in vitro selon la méthode décrite par Hemker et al (11). Le TGT pratiqué sur du PPP est une mesure automatisée et standardisée de la cinétique de la génération de thrombine. Les concentrations du FT et des phospholipides (PL) ajoutés dans le PPP pour la mesure de la génération de thrombine ont été particulièrement standardisées (8). La génération de thrombine est déclenchée par l'ajout d'une solution contenant du CaCl₂ (concentration finale de 16.7 mM) et d'un substrat fluorogénique spécifique de la thrombine (Z-Gly-Gly-Arg-Amino-Méthyl Coumarine, Bachem, Bubendorf, Switzerland). Ainsi, cette méthode nous permet d'analyser l'ensemble des phases de la génération de thrombine (initiation, propagation et inhibition) ainsi que l'intégralité du «travail enzymatique» fait par la thrombine pendant sa présence sous forme active. L'enregistrement et l'analyse de la génération de thrombine sont effectués au moyen d'un fluorimètre et d'un logiciel approprié. Le substrat fluorogénique émet un signal fluorescent lors de son hydrolyse par la thrombine. Le signal fluorogénique généré est donc directement lié à la quantité de thrombine présente dans le milieu. En parallèle avec chaque PPP étudié, on associe un puits où l'on ajoute un calibrant au PPP. En prenant comme référence ce calibrant, le logiciel d'analyse convertit au fur et à mesure le signal fluorescent en nM de thrombine. Le tracé obtenu pour chaque couple (échantillon, calibrant) est appelé «thrombogramme». Les paramètres analysés du thrombogramme sont indiqués sur la figure 1 (12) :

lag-time : temps de latence correspondant à la phase d'initiation de la génération de thrombine, exprimé en

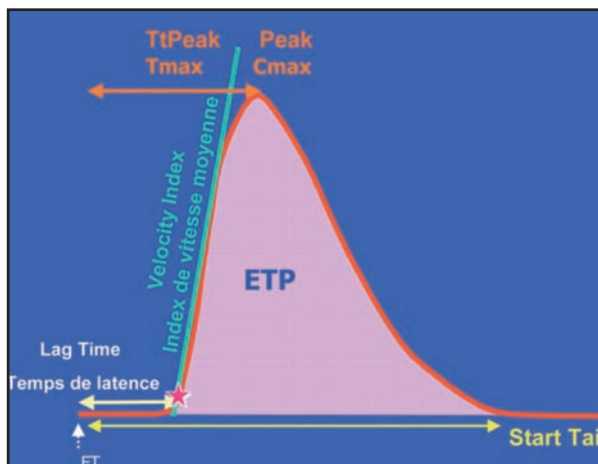


Figure 1. Les paramètres du test de génération de thrombine formant le «thrombogramme» (12)

minutes (min) ttPeak(time to peak) : temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale de thrombine, exprimé en min; Peak : concentration maximale de la thrombine générée, exprimée en nM ;

ETP (Endogenous Thrombin Potential) : aire sous la courbe correspondant au travail enzymatique de la thrombine générée, exprimé en nMxmin.

MRI (Mean Rate Index) : vitesse de la phase de propagation traduisant la vitesse de la génération de thrombine, calculée par la formule : $MRI = \frac{Peak}{(ttPeak - lagtime)}$ et exprimée en nM/min.

Les paramètres chronométriques (lag-time et ttPeak) sont sensibles à la variation de la quantité de FT présente dans l'échantillon étudié ou apporté par le réactif. Cependant, le Peak, le MRI et l'ETP sont influencés par la quantité de phospholipides (PL) présente dans le système expérimental.

- Mise au point du modèle expérimental pour l'étude in vitro de la capacité des cellules IGROV1 à générer la thrombine

Les cellules IGROV1 en suspension dans le sérum physiologique ont été mélangées avec du PPP. Le nombre des cellules IGROV1 dans le PPP a varié de 5 à 250 cellules/ μ l. Le PPP dépourvu de cellules IGROV1, constituant l'expérience «Contrôle», a été testé au même temps que le PPP combiné aux cellules IGROV1. On a éliminé dans notre modèle expérimental toute source exogène de FT et de PL. Dans chaque puits d'une plaque

article original

de microtitration à fond plat de 96 puits, la génération de thrombine a été par la suite déclenchée et mesurée comme décrit précédemment.

Résultats

Effets des cellules IGROV1 sur les différents paramètres du test de génération de thrombine

• Lag-time

Dans l'expérience «Contrôle» (en l'absence de cellules IGROV1), la valeur du lag-time a été de 12.67 ± 2.5 min. L'addition des cellules IGROV1 dans le PPP a entraîné un raccourcissement du lag-time. En effet, à 5 cellules/ μ l, les cellules IGROV1 ont réduit de façon significative le lag-time (4.33 ± 0.5 min) par comparaison à l'expérience «Contrôle» ($p < 0.05$) (Tableau I). En outre, le lag-time a été corrélé négativement ($r = -0.51$) au nombre de cellules IGROV1 rajoutées au PPP avec un effet plateau atteint à partir de 100 cellules/ μ l (Figure 2). Ce plateau correspond à un raccourcissement d'environ 7 fois par rapport à l'expérience «Contrôle» (Figure 3A).

• ttPeak

En présence de 5 cellules/ μ l, le ttPeak a été deux fois plus court (8.01 ± 0.5 min) comparativement à

l'expérience «Contrôle» (16.33 ± 3 min) (Tableau I). Ce raccourcissement du ttPeak a été plus prononcé avec l'augmentation du nombre des cellules avec un plateau atteint à partir de 200 cellules/ μ l correspondant à un ttPeak 4 fois plus court que dans l'expérience «Contrôle» (Figure 3A). Le ttPeak a été, toutefois, moins sensible que le lag-time à la présence des cellules IGROV1 dans le PPP.

• Peak

À 5 cellules/ μ l, les cellules IGROV1 ont induit une augmentation significative du Peak (145 ± 13 nM) par comparaison à l'expérience «Contrôle» (78 ± 10 nM) ($p < 0.05$) (Tableau I). Cependant, l'effet du nombre des cellules sur le Peak a été moins prononcé que sur les paramètres chronométriques (lag-time, ttPeak).

L'augmentation du Peak n'a pas été exacerbée à 10 et à 20 cellules/ μ l par rapport à 5 cellules/ μ l (Tableau I, Figure 2). À 50 cellules/ μ l, le Peak a été augmenté d'environ 2 fois par rapport à l'expérience «Contrôle».

Le Peak n'a pas été significativement modifié à 100 cellules/ μ l par rapport à 50 cellules/ μ l. Les valeurs les plus élevées du Peak ont été atteintes à 250 cellules/ μ l avec une augmentation environ 4 fois supérieure par rapport à l'expérience «Contrôle» (Tableau I). Il n'a pas été observé de plateau pour le Peak avec les nombres étudiés

Tableau I : Effets de la variation du nombre de cellules IGROV1 sur les paramètres du test de génération de thrombine. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm Sd de 6 expériences (* versus 0 cellules/ μ l; $p < 0,05$).

IGROV1 (cellules/ μ l)	lag-time (min)	ttPeak (min)	Peak (nM)	ETP (nMxmin)	MRI (nM/min)
0	$12,67 \pm 2,5$	$16,33 \pm 3$	$78,08 \pm 10$	760 ± 100	$21,33 \pm 8$
5	$4,33 \pm 0,5^*$	$8,01^* \pm 0,5$	$145^* \pm 13$	$1935^* \pm 150$	$39,47^* \pm 5$
10	$3,66 \pm 0,3^*$	$7,01^* \pm 0,4$	$145^* \pm 8$	$1841^* \pm 200$	$43,25^* \pm 3$
20	$2,66 \pm 0,2^*$	$6,34^* \pm 0,5$	$149^* \pm 10$	$1775^* \pm 155$	$40,55^* \pm 8$
50	$2,33 \pm 0,4^*$	$5,67^* \pm 0,3$	$169^* \pm 5$	$1804^* \pm 225$	$50,64^* \pm 8$
100	$1,66^*$	$4,67^* \pm 0,1$	$201^* \pm 15$	$1796^* \pm 176$	$66,77^* \pm 11$
200	$1,66^*$	4^*	$247^* \pm 18$	$1785^* \pm 180$	$105,71^* \pm 18$
250	$1,66^*$	4^*	$319^* \pm 20$	$1926^* \pm 300$	$136,28^* \pm 23$

Application du test de génération de thrombine à l'évaluation de l'hypercoagulabilité induite in vitro

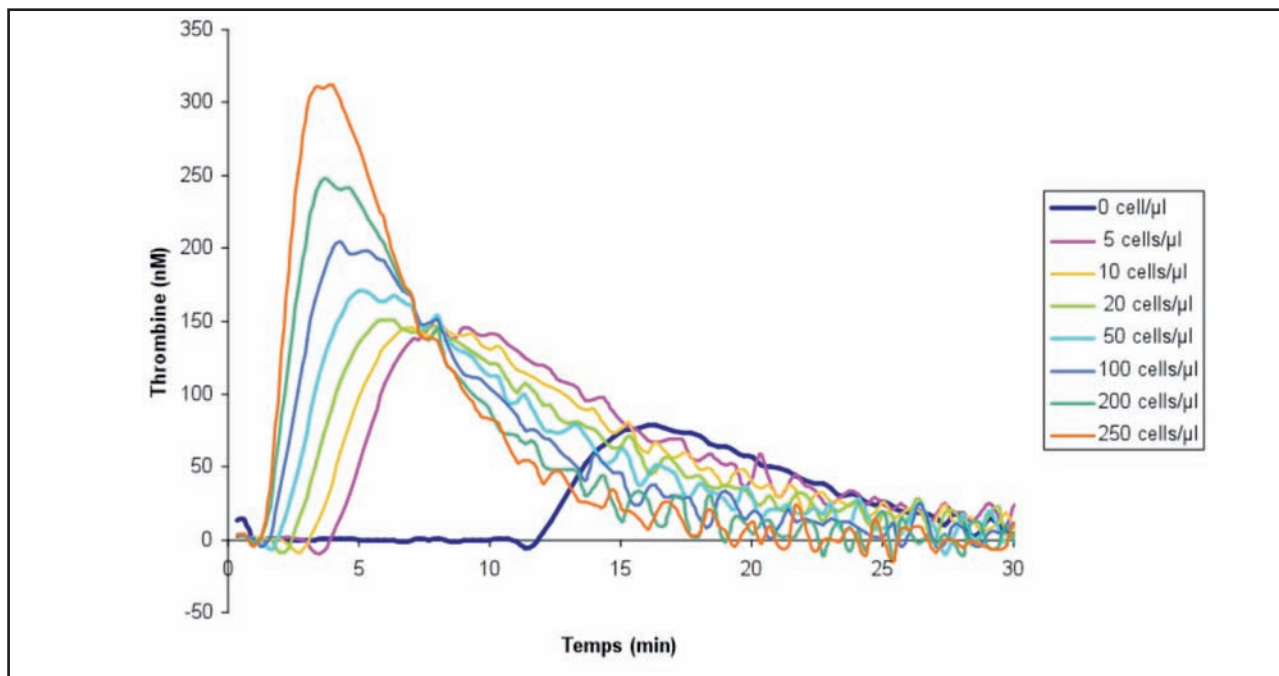


Figure 2 : Thrombogrammes représentatifs d'une expérience parmi les 6 effectuées. Les résultats soulignent l'effet du nombre croissant de cellules IGROV1 sur la génération de thrombine par comparaison aux résultats de l'expérience «Contrôle».

de cellules dans ces évaluations contrairement aux paramètres chronométriques (Figure 3B).

• MRI

Les cellules IGROV1 ont induit une augmentation significative du MRI à 5 cellules/ μ l (39.47 ± 5 nM/min) par comparaison à l'expérience «Contrôle» (21.33 ± 8 nM/min) ($p < 0.05$). Comme pour le Peak, l'augmentation du MRI n'a pas été exacerbée à 10 et à 20 cellules/ μ l par rapport à 5 cellules/ μ l. Le Peak est augmenté de façon importante à 200 cellules/ μ l, par rapport à 50 et à 100 cellules/ μ l. A 250 cellules/ μ l, l'augmentation du MRI a été 6 fois supérieure par rapport à l'expérience «Contrôle» (Tableau I). Comme pour le Peak, il n'a pas été observé de plateau avec les nombres étudiés de cellules (Figure 3C).

• ETP

A 5 cellules/ μ l, l'ETP a été significativement augmenté (1935 ± 150 nMxmin) par comparaison à l'expérience Contrôle (760 ± 100 nMxmin) ($p < 0.05$) (Tableau I).

Lorsque le nombre des cellules IGROV1 a été augmenté, l'ETP n'a pas atteint, en revanche, de valeur plus élevée que celle obtenue avec 5 cellules/ μ l (Figure 3D).

Discussion

Le cancer de l'ovaire, qui est l'exemple d'étude des cellules cancéreuses choisi dans notre travail, est étroitement associé à la survenue des ETV (13). En effet, selon une méta-analyse récente ayant estimé le risque d'ETV en fonction de la localisation du cancer, le risque relatif (RR) le plus élevé a été attribué au cancer de l'ovaire (RR : 6,5%), suivi par le cancer du pancréas (RR : 6,11%) et le cancer du foie (RR : 5,55%) (14). Les cellules IGROV1 en suspension dans le PPP accélèrent la génération de thrombine et augmentent le Peak, le MRI et l'ETP en l'absence de source exogène de FT et de PL. Tout d'abord, les paramètres chronométriques sont raccourcis en fonction du nombre croissant de cellules

article original

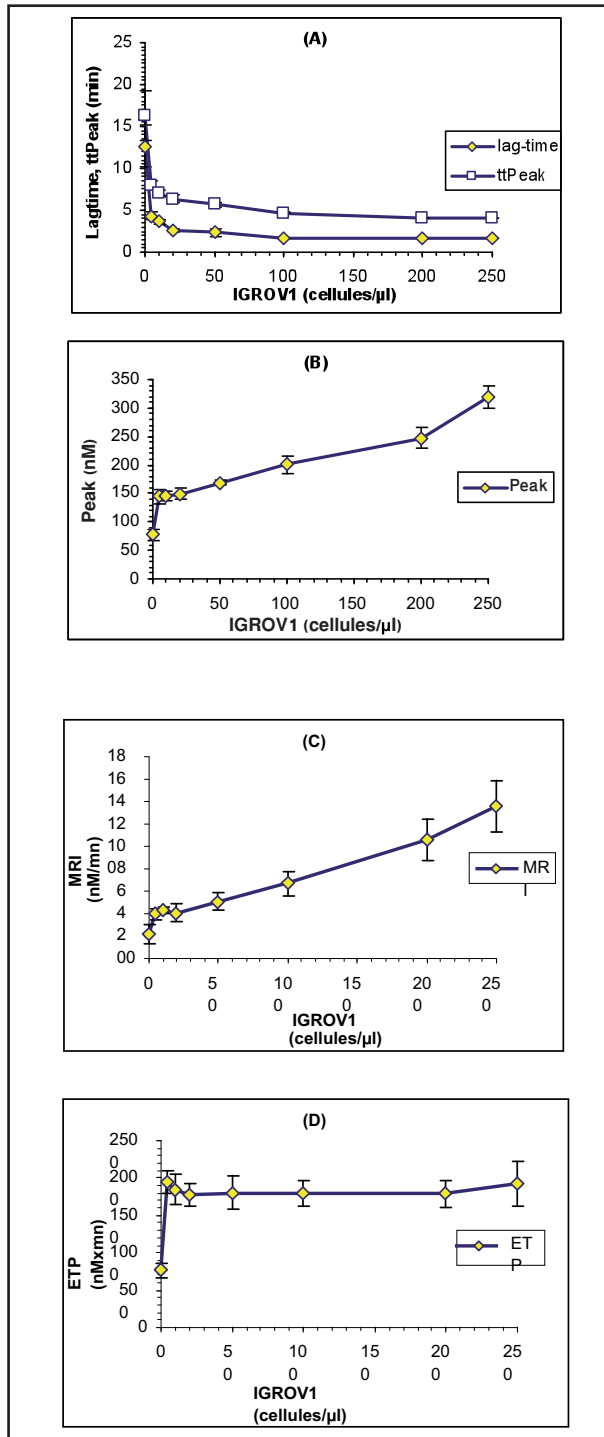


Figure 3 : Influence des cellules IGROV1 sur les paramètres du thrombogramme. (A) lag-time et ttPeak; (B) Peak; (C) MRI; et (D) ETP. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm Sd (n=6).

dans le plasma jusqu'à l'atteinte d'un plateau. Or, la concentration du FT affecte la phase d'initiation de la génération de thrombine ce qui expliquerait que la réduction du lag-time en présence d'un nombre croissant de cellules cancéreuses serait due à une expression importante en FT. Cette expression accrue en FT explique l'effet significatif observé en présence de seulement 5 cellules/μl. Nos résultats sont en accord avec ceux de Debaugnies et al (15). Ces auteurs ont évalué le profil procoagulant de sujets ayant un cancer nouvellement diagnostiqué par le biais du TGT dans des conditions expérimentales variées afin de bien étudier l'impact du FT et des PL en excès retrouvés dans le plasma des patients cancéreux sur les différents paramètres du TGT. Lorsque des PL exogènes sont additionnés seuls au PPP, les auteurs ont retrouvé un raccourcissement significatif du lag-time par comparaison aux sujets normaux ce qui suggère que du FT endogène est présent en forte concentration dans le plasma des patients cancéreux. L'addition d'anti-FT a entraîné un allongement de la phase d'initiation de la génération de thrombine et donc une prolongation du lag-time. L'expression constitutive accrue du FT par les cellules cancéreuses est la cause majeure d'hypercoagulabilité associée au cancer (2,5).

Le Peak, le MRI et l'ETP augmentent en présence de cellules IGROV1. Or, ces paramètres sont dépendants de la quantité de PL anioniques apportée par le système étudié et qui constituent ainsi la surface catalytique sur laquelle se forment les complexes enzymatiques de la coagulation. Ceci suggère la présence de PL procoagulants dérivant probablement des cellules IGROV1.

Debaugnies et al (15), en ajoutant cette fois du FT exogène dans le milieu réactionnel, ont retrouvé une augmentation significative du Peak, du MRI et de l'ETP dans le plasma des patients cancéreux ce qui évoque des taux élevés de PL endogènes circulant dans leur plasma. Les travaux de Debaugnies et al (15) suggèrent alors que le plasma des patients cancéreux nouvellement diagnostiqués contient un excès de FT et de PL circulant probablement sous forme de microparticules (MP) dérivant des cellules cancéreuses. Les MP FT+ ont été détectées à des taux élevés dans différents types de cancer (16,17).

Application du test de génération de thrombine à l'évaluation de l'hypercoagulabilité induite in vitro

Dans le même sens, Zwicker et al. (18) ont retrouvé un taux élevé de MP FT+ circulantes mesurées par cytométrie en flux dans le cas de différents types de cancers y compris les cancers ovariens. En outre, Davila et al. (19) ont montré que l'hypercoagulabilité induite par les cellules cancéreuses in vitro et in vivo est associée essentiellement aux MP relarguées. Cette hypercoagulabilité liée aux MP dépend complètement du FT et de la phosphatidylsérine étant donné qu'elle est abolie par l'ajout d'anti-FT et d'annexine V dans le milieu réactionnel (19).

Nos résultats sont donc en accord avec les données de la littérature (20). Ils soulignent, tout particulièrement, un raccourcissement du lag-time dû à une surexpression du FT et une augmentation du travail enzymatique de la thrombine due probablement à la présence de PL procoagulants en excès dans le milieu réactionnel.

Conclusion

La physiopathogénie des troubles hémostatiques décrits au cours du cancer est particulièrement complexe et elle traduit les multiples connexions de cette pathologie avec les systèmes de l'inflammation et de l'hémostase (21).

Le cancer pourrait en fait être simulé à un «volcan thrombotique» avec deux principaux acteurs : le FT sur-exprimé par les cellules cancéreuses et la phosphatidylsérine présente à la surface des plaquettes activées. Rappelons que les plaquettes activées et les cellules tumorales émettent des MP particulièrement riches en FT et en phosphatidylsérine. Ces MP se trouvant alors en grandes quantités dans la circulation amplifient et entretiennent ce «volcan thrombotique». Un tel contexte thrombotique exerce un impact négatif sur la qualité de vie des patients, déjà altérée par la maladie cancéreuse elle-même et par les effets indésirables des traitements anticancéreux. Notre étude a contribué à la mise au point d'un modèle expérimental pour la caractérisation du phénotype procoagulant des cellules IGROV1 d'un adénocarcinome ovarien humain. Ce modèle expérimental d'étude in vitro des cellules cancéreuses pourrait constituer un outil précieux pour l'évaluation de l'effet de divers antithrombotiques sur l'hypercoagulabilité cellu-

laire induite par le cancer et pour l'adaptation de la prise en charge anticoagulante des patients cancéreux en fonction du type histologique du cancer.

Références

1. Sallah S, Ahmad O, Kaiser HE. Pathogenesis of thrombotic disorders in patients with cancer. *In Vivo* 2000; 14 (1):251-3.
2. Ruf W, Yokota N, Schaffner F. Tissue factor in cancer progression and angiogenesis. *Thromb Res* 2010 ;125 (2):S36-8.
3. Noble S, Pasi J. Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis. *Br J Cancer* 2010;102 (1):S2-9.
4. Sallah S, Wan JY, Nguyen NP. Venous thrombosis in patients with solid tumors: determination of frequency and characteristics. *ThrombHaemost* 2002; 87: 575-9.
5. Garniera D, Milsomb C, Magnusa N et al. Role of the tissue factor pathway in the biology of tumor initiating cells. *Thromb Res* 2010; 125: S44-S50.
6. Milsom C, Rak J. Tissue factor and cancer. *PathophysiolHaemostThromb* 2007-08; 36:160-76.
7. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res* 2011; 127 (suppl 3): S21-5.
8. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, Le Flem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment : the influence of the tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal value of thrombogram-thrombinoscope assay. *Thromb J* 2005; 3: 16.
9. Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *Br J Hematol* 2005; 130, 653-61.
10. Castelli R, Porro F et Tarsia P. The heparins and cancer : a review of clinical trials and biological properties. *Vasc Med* 2004; 9: 205-13.
11. Hemker HC, Willems GM, Beguin S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *ThrombHaemost* 1986; 56 (1):9-17.
12. Gerotziafas GT. Le test de génération de thrombine. Un test utile pour la recherche et nécessaire pour une exploration moderne de l'hémostase. *BIOTRIBUNE* 2007 ;24.

article original

13. Tateo S, Mereu L, Salamano S et al. Ovarian cancer and venous thromboembolism risk. *Gynecol oncol* 2005; 99: 119-25.
14. Iodice S, Gandini S, Lohr M, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Venous thromboembolic events and organ-specific occult cancers : a review and meta-analysis. *J ThrombHaemost* 2008; 6: 781-8.
15. Debaugnies F, Azerad MA, Noubououssié D et al. Evaluation of the procoagulant activity in the plasma of cancer patients using a thrombin generation assay. *Thromb Res* 2010; 126: 531-35.
16. Tesselaar M, Romijn F, Van Der Linden IK, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis. *J ThrombHaemost* 2009; 7:1421-3.
17. Zwicker JI. Predictive value of tissue factor bearing microparticles in cancer associated thrombosis. *Thromb Res* 2010;125 (Suppl 2): S89-S91.
18. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res* 2009;15 (22): 6830-40.
19. Davila M, Amirkhosrvi A, Coll E et al. Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J ThrombHaemost* 2008; 6: 1517-24.
20. Duchemin J, Pan-Petes B, Arnaud B, Blouch MT, Abgrall JF. Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *ThrombHaemost* 2008; 99: 767-73.
21. Elalamy I, Verdy E, Gerotziapas G, Hatmi M. Physiopathogénie de la maladie thromboembolique veineuse au cours du cancer. *Pathologie Biologie* 2008 ; 56 :184-94.

Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches d'*Escherichia coli* productrices de β - lactamases à spectre étendu à l'Hôpital Militaire de Tunis

MS. ASLI,
T. JAOUADI,
A. AGREBI,
F. BARGUELLIL

Résumé : La résistance aux lactamines due aux BLSE est en augmentation sur toute la planète en particulier chez les entérobactéries. Les nouvelles enzymes fréquemment communautaires telles que CTX-M sont responsables d'une «pandémie» mondiale et parallèlement la part d'*E. coli* croit parmi les espèces représentées.

Notre étude rétrospective s'est intéressée à 64 souches d'*Escherichia coli* productrices de BLSE isolées au laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital Militaire de Tunis, entre octobre 2009 à décembre 2010. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été faite par la méthode de diffusion en milieu gélosé et complétée par la mesure des CMI par bandelettes E-test. Les bêtalactamases ont été recherchés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des gènes TEM, SHV, CTX-M et CTX-M du groupe 1.

Les souches sont isolées à partir du service de néonatalogie de l'hôpital Militaire de Tunis (17%), de réanimation (16%), suivis des services de pédiatrie (14%), des urgences (9%) et (23%) des souches des consultations externe. Les *E. coli* étudiées sont isolées des ECBU (73%), suivi des hémocultures (11%), pus et prélèvements rectaux (6%). Vingt souches ont été isolées en 2009 et 44 en 2010. La résistance des souches étudiées était de 61% à l'amoxicilline+acide clavulanique, de 53% à l'acide nalidixique, de 48% à l'ofloxacine, de 45% à la ciprofloxacine, 81% à la gentamicine, de 31% au chloramphénicol, une faible résistance à la céfoxitine 3% et aucune résistance pour l'imipénème. Toutes les souches étudiées présentaient un test de double synergie positif. Les CMI obtenues pour les différents antibiotiques sont élevées sauf pour l'imipénème. Le gène *bla*CTX-M a été détectée dans 95% des souches étudiées, 87% étaient positifs pour les gènes *bla*CTX-M du groupe 1. Les gènes *bla*TEM (9%) et *bla*SHV (4%) ne sont pas significatifs dans les souches d'*Escherichia coli* étudiées. Nous avons noté la présence de souches multirésistantes qui hébergent deux ou trois gènes de résistance *bla*TEM, *bla*SHV et *bla*CTXM-1, cette association peut être trouvée au sein d'une même région de multirésistance souvent observée avec les souches productrices de CTX-M-15. Notre étude confirme les résultats constatés par d'autres auteurs à savoir la prédominance des BLSE de type CTX-M (probablement M-15) La résistance aux β - lactamines s'accompagne d'une corésistance à d'autres antibiotiques ce qui rend souvent les schémas thérapeutiques traditionnellement utilisées pour le traitement inefficaces. Une meilleure connaissance de l'épidémiologie de la résistance permettra d'améliorer la prise

Service de Microbiologie-
Hôpital Militaire de Tunis

en charge thérapeutique des patients tout en réduisant la prescription d'antibiotiques à large spectre.

Mots clés : *Escherichia coli* - BLSE - Epidémiologie-CTX-M.

Phenotypic and molecular characteristics of *Escherichia coli* strains producing ESBLs isolated in the Military Hospital of Tunis

Summary : Betalactam resistance due to ESBL is increasing all over the world especially in *Enterobacteriaceae*. The new frequently community enzymes such as CTX-M are responsible for a global "pandemic" and at the same time the part of *E. coli* increase among the species represented.

Our retrospective study concern a 64 strains of *Escherichia coli* producing ESBLs isolated in the laboratory of Microbiology of the Military Hospital of Tunis, from October 2009 to December 2010. The study of antibiotic sensitivity was done by the method of diffusion in agar and supplemented by measuring the MIC by E-test strips. Betalactamases were detected by PCR using primers specific genes TEM, SHV, CTX-M and CTX-M group 1.

The strains were isolated from the neonatal unit of the Military Hospital of Tunis (17%), intensive care (16%), followed by pediatric service (14%), emergency (9%) and 23% of strains in external consultations. The *E. coli* studied were isolated from urine cultures (73%), followed by blood cultures (11%), pus and rectal swabs (6%). Twenty strains were isolated in 2009 and 44 in 2010. The resistance of the strains studied was 61% with amoxicillin + clavulanic acid, 53% to nalidixic acid, 48% to ofloxacin, 45% to ciprofloxacin, 81% to gentamicin, 31% to chloramphenicol, low resistance to cefoxitin 3% and no resistance to imipenem. All the strains studied had a double positive synergy test. MICs obtained for the different antibiotics are high except for imipenem. The *bla*CTX-M gene was detected in 95% of the strains studied, 87% were positive for *bla*CTX-M genes in group 1. *Bla*TEM genes (9%) and *bla*SHV (4%) are not significant in *Escherichia coli* strains studied. We noted the presence of multidrug-resistant strains that harbor two or three resistance genes *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*CTXM-1, this association can be found in the same region of multidrug resistance often observed with strains producing CTX-M-15. Our study confirms the results found by other authors, namely the prevalence of ESBL CTX-M (probably M-15) Resistance to β -lactam antibiotics is associated with co-resistance to other antibiotics which often makes regimens traditionally used for the treatment ineffective. A better understanding of the epidemiology of resistance will improve the therapeutic management of patients while reducing the prescription of broad spectrum antibiotics.

Keywords : *Escherichia coli* ESBL - Epidemiology - CTX-M.

Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches d'*Escherichia coli*

Introduction

Les taux de résistance bactérienne aux antibiotiques sont en augmentation à travers le monde [1]. Les bactéries peuvent acquérir cette résistance par des mécanismes génétiques qui permettent de mieux comprendre l'épidémiologie de la résistance et les facteurs responsables de la sélection des souches résistantes. Les bêta-lactamases sont la principale cause de la résistance aux β -lactamines chez toutes les bactéries à Gram-négatives. Ces deux dernières décennies, de nombreuses études ont montré l'augmentation, de part le monde, des infections à entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE).

Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes qui hydrolysent aussi bien les pénicillines que les oxyimino- céphalosporines (céfotaxime, céftazidime, céftriaxone...) et les monobactams (aztréonam). Les céphamycines (céfotétan, latamoxef) et les carbapénèmes (imipénème, ertapénème, méropénème) restent actifs alors que les activités des fluoroquinolones de deuxième génération (ciprofloxacine), des céphalosporines de quatrième génération (céfépime, céfpirome) et celles des associations bêta-lactamines/inhibiteurs de bêta-lactamases sont variables [2]. Ces enzymes sont codées soit par les chromosomes et sont spécifiques d'une espèce bactérienne soit par des plasmides, des transposons, et les intégrons, qui facilitent leur propagation dans le monde bactérien. L'augmentation de la fréquence relative des entérobactéries productrices de BLSE a été observée aussi bien dans les centres de soins qu'en dehors. Parmi ces entérobactéries, *Escherichia coli* (*E. coli*) est un germe très important. Son habitat est le colon humain où il est le plus abondant germe aérobie-anaérobie facultatif. Sa survie est extrêmement difficile dans l'environnement. Il est responsable de 90% des infections urinaires communautaires et il est l'un des germes majeurs des infections urinaires nosocomiales. D'autre part cette bactérie a connu ces dernières années une fulgurante augmentation du niveau de résistance aux antibiotiques. De plus, l'implication des souches d'*E. coli* BLSE dans les infections humaines et animales est croissante [3,4].

A l'hôpital militaire de Tunis, établissement de 615 lits, dont 50 lits en USI la maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes, demeure difficile à contrôler comme dans beaucoup d'autres structures sanitaires.

Cette étude a pour objectifs :

- d'étudier la résistance aux antibiotiques des *Escherichia coli* producteurs de β - lactamases à spectre étendu
- de caractériser les différents types de Bêta-lactamases produites par les souches d'*Escherichia coli* isolées

Matériels et méthodes

Cette étude porte sur 64 souches d'*E. coli* BLSE isolées de prélèvements à visée diagnostique, entre octobre 2009 et décembre 2010 (Tableau I). Les données des patients étudiés (âge, sexe, durée et antécédents d'hospitalisation, provenance, site anatomique d'isolement) ont été recueillies en prospectif dans le cadre du programme de surveillance de l'incidence des BMR à partir du laboratoire de bactériologie. Une seule souche a été retenue par patient.

1- Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'identification des souches a été réalisée avec les cartes GN et l'automate VITEK® 2 compact (Bio-Mérieux®) ou par les galeries API 20 E (Bio-Mérieux®). Les antibiogrammes ont été réalisés par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Muller-Hinton (Biorad®) avec les disques d'antibiotiques (Biorad®). L'étude de la sensibilité aux Antibiotique est réalisée selon les normes préconisées par le CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute).

- **Antibiogramme par diffusion au milieu gélosé :** réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton(MH), avec un inoculum de 10^6 UFC /ml (0,5 McFarland). Les disques d'antibiotiques testés étaient : amoxicilline (25 μ g), amoxicilline + acide clavulanique (20+10 μ g), ticarcilline (75 μ g), pipéracilline (75 μ g), ticarcilline + acide clavulanique (75+10 μ g), Pipéracilline + tazobactam (75+10 μ g), céfalotine (30 μ g), céfoxitine (30 μ g), céfotaxime (30 μ g), céftazidime (30 μ g), céfépime (30 μ g), céfpirome (30 μ g), aztréo-

article original

Tableau I : caractéristiques des souches isolées d'*Escherichia coli*

Prélèvements Services	ECBU	Hémocultures	Prélèvement rectal	Prélèvement Trachéal	Pus	Prélèvement auriculaire	Prélèvement gastrique	Total
Externe	20	1			-			21
Néonatalogie	1	4	3	1	-	1	1	11
Réanimation	6	3	-	1	-	-	-	10
Pédiatrie	9	-	-	-	-	-	-	9
UGO	3	-	-	-	-	-	-	3
Cardiologie	3	-	-	-	-	-	-	3
Endocrinologie	2	-	-	-	-	-	-	2
Gynécologie	1	-	-	-	1	-	-	2
Gastroentérologie	1	-	-	-	-	-	-	1
Chirurgie viscérale		-	-	-	2	-	-	2
Total	46	8	3	2	3	1	1	64

nam (30 µg), imipénème (10 µg), gentamicine (10 µg), tobramycine (10 µg), nétilmicine (30 µg), amikacine (30 µg), ofloxacine (5µg), acide nalidixique (30µg), péfloxacin (5µg), ciprofloxacine (5µg), tétracycline (30µg), chloramphénicol (30 µg), colistine (50 µg) et nitrofurantoïne (300µg), nitroxtoline (20 µg), triméthoprime-Sulfaméthoxazole (1,25+23,75µg).

Chaque disque est distant de l'autre de 3 cm.

L'incubation est réalisée à 37°C pendant 18 h. L'activité anti- bactérienne de chaque antibiotique est interprétée après mesure des diamètres d'inhibition.

- Test de synergie en milieu gélosé avec les disques contenant l'acide clavulanique

Ce test est réalisé pour la détection de la production des BLSE en déposant des disques contenant différents types de bêtalactamines (céfotaxime, céftriaxone, céftazidime et aztréonam) placés à l'opposé du disque contenant une association d'amoxicilline + acide clavulanique (20+10 µg). Après incubation à 37 °C pendant une nuit, la présence de BLSE serait mise en évidence par l'extension de la zone d'inhibition de la céphalosporine par l'acide clavulanique qui est matérialisée par un aspect dit de «bouchon de champagne» [5].

- Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale d'antibiotiques inhibant la croissance bactérienne (CMI), est déterminée par le système E- test (Bio-Mérieux). Ce dernier utilise une bandelette d'un même antibiotique qui est appliquée sur milieu Mueller-Hinton inoculé avec une suspension bactérienne de 0,5 McFarland et incubé à 37°C pendant une nuit.

3- Extraction de l'ADN bactérien :

Des colonies isolées à partir d'une culture sur une gélose nutritive sont resuspendues dans 200 µl de tampon de prélyse. L'addition de 66µl de NaCl5M permet la lyse de la membrane bactérienne. La suspension est centrifugée (4°C ; 10 000 rpm ; 15 min) et le surnageant est récupéré. Les protéines sont extraites par addition de chloroforme et centrifugation (4°C ; 10 000 rpm ; 5min). A la phase aqueuse, soigneusement récupérée, 2 volumes d'éthanol absolu sont ajoutés, afin de précipiter l'ADN. Après incubation une nuit dans la glace (-20°C) la suspension est centrifugée (4°C ; 14 000 rpm ; 5min). Après élimination de l'éthanol absolu le culot d'ADN est lavé avec l'éthanol (70%) et centrifugé (4°C ; 14000 rpm ; 5min). Après avoir séché, le culot est resuspendu

Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches d'*Escherichia coli*

dans 200 µl de TE (10mM Tris-Hcl à pH 7,5, 1mM EDTA) enfin 8µl de ribonucléase (RNase) sont ajoutés afin d'éliminer l'ARN [6].

4- Amplification par PCR :

La PCR a été utilisée pour caractériser les enzymes de type TEM, SHV et CTX-M à l'aide d'amorces en utilisant l'ADN génomique et plasmidique comme matrice (Tableau II). Pour les souches positives pour le gène bla CTX-M, une recherche des gènes bla CTX du groupe 1 à été faite. Le milieu réactionnel comprend dans un

5- Electrophorèse sur gel d'agarose : les acides nucléiques ont été séparés sur gel d'agarose et grâce à un tampon de migration (TBE 1%) pendant 30 min à un voltage de 105 volts. Après électrophorèse, le gel est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (BET) 25 min puis rincé avec une solution de décoloration pendant 15 min L'ADN est visualisé sous lumière ultraviolette. La taille et la quantité des fragments sont estimées par comparaison avec le marqueur de taille.

Tableau II : Amorces utilisées dans les techniques PCR

PCR cible	Amorces	Séquences	Taille du fragment (bp)	Référence
bla TEM	TemA1 TemB1	5'-ATA AAA TTC TTG AAG AC-3' 5'-TTA CCA ATG CTT AAT CA-3'	1075	[15]
bla SHV	SHV-F SHV-R	5'-CAC TCA AGG ATG TAT TGT G-3' 5'-TTA GCG TTG CCA GTG CTC G-3'	822	[15]
bla CTX-M	CTX-C1 CTX-C2	5'-ATG TGC AGC ACC AGT AAA GT-3' 5'-ACC GCG ATA TCG TTG GTG G-3'	545	[15]
bla CTX-M-1	CTX-1F CTX-1R	5'-ATG GTT AAA AAA TCA CTG CGTC-3' 5'-TTG GTG ACG ATT TTA GCC GC-3'	864	[16]

volume final de 50µl : 2µl de l'ADN total, 0,5µl de chaque amorce (15 pmol pour les amorces CTX-M, CTX-M-1 et SHV et 100 pmol pour l'amorce TEM), 1µl de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) avec une concentration 0,5mM (Invitrogen), 2,5µl de MgCl₂ (1,25 mM), 1 unit / µl de Taq polymérase et 5µl de son tampon 10X (Promega). Le mélange de PCR est soumis à une étape de dénaturation (10 min à 94 °C), suivie par 40 cycles d'amplification (1min de dénaturation à 94 °C, 1min d'hybridation à 48 °C, 1 min d'élongation à 72 °C) et 10 min à 72 °C pour la dernière étape. Une fois les cycles de la réaction de polymérisation sont achevés, 7µl des produits de PCR sont analysés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1%.

Résultats

1- Origine des souches

La répartition des soixante quatre souches d'*Escherichia coli* selon les services montre qu'elles étaient isolées principalement à partir du service de néonatalogie de l'hôpital Militaire de Tunis (17%), de réanimation (16%), suivis des services de pédiatrie (14%), des urgences (9%) et (23%) des souches des consultations externe. La répartition des souches en fonction du type de prélèvement pathologique montre que les souches ont été isolées essentiellement à partir des ECBU (73%), suivi des hémocultures (11%), puis des prélèvements rectaux (6%). Vingt souches ont été isolées en 2009 et 44 en 2010.

article original

2-Etudes des phénotypes de résistance

2-1-Antibiogramme

Vingt- six antibiotiques de différentes familles ont été testés sur soixante quatre souches, selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. Toutes les souches présentent le même profil de résistance aux β -lactamines d'après le test de sensibilité et de synergie entre l'acide-clavulanique et les céphalosporines de troisième génération ainsi que l'aztréonam. La résistance des souches étudiées était de 61% (n = 39) à l'AMC, de 53% à l'acide nalidixique, de 48% à l'ofloxacine, de 45% à la ciprofloxacine, 81% à la gentamicine, de 31% au chloramphénicol, une faible résistance à la céfoxitine 3% et aucune résistance pour l'imipénème. Toutes les souches étudiées présentaient un test de double synergie positif.

2-2-Concentration minimales inhibitrices

Grâce aux concentrations minimales inhibitrices par les méthodes E-Test, on peut déterminer le niveau de résistance des souches étudiées. Les résultats des CMI sont interprétés selon les recommandations du CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute, 2006).

Toutes les souches présentent une résistance très élevée aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline, pipéracilline), les CMI sont supérieures à 240 $\mu\text{g/ml}$. De même, elles sont hautement résistantes aux céphalosporines de quatrième génération (céfpirome, céfépime). Les valeurs des CMI pour les autres classes d'antibiotiques outre les bêtalactamines se présentent comme suit : comprises entre 0,1 et > 240 $\mu\text{g/ml}$ pour la tétracycline et la gentamicine, entre 0,004 et > 240 $\mu\text{g/ml}$ pour la ciprofloxacine (Tableau III).

3- Amplification des gènes *bla*CTX-M, *bla*TEM et *bla*SHV

L'analyse des produits d'amplification par PCR sur gel d'agarose 1% montre qu'il ya une amplification des gènes de β -lactamases chez toutes les souches étudiées. Les tailles des fragments amplifiées sont 545 pb, 864pb, 822pb, 1075 pb qui correspondent respectivement aux *bla*CTX-M, *bla*CTX-M-1, *bla*SHV et *bla*TEM (figures 1 à 4). Le gène *bla*CTX-M a été détectée dans 95%des souches étudiées, 87% étaient positifs pour les gènes *bla*CTX-M dans le groupe CTX-M-1. Les pourcentages des gènes *bla*TEM (9%) et *bla*SHV (4%) ne sont pas

Tableau III : CMI moyenne des antibiotiques testés

Antibiotique	CMI50
Amoxicilline	≥ 240
Amoxicilline +acide clavulanique	≥ 240
Ticarcilline	≥ 240
Pipéracilline	≥ 240
Céfotaxime	≥ 240
Céfazidime	≥ 240
Céfpirome	≥ 240
Céfépime	≥ 240
Imipénème	0,2
Gentamicine	> 90
Tobramycine	> 100
Amikacine	40
Ofloxacine	> 64
Ciprofloxacine	> 120
Tétracycline	> 64

Tableau IV : Résultats de la détection des gènes de résistances aux β -lactamines par PCR chez les souches d'*Escherichia coli*.

Service	CTX-M	CTX-M-(groupe 1)	SHV	TEM
Réanimation	9	9	-	2
Pédiatrie	8	6	1	-
Gynécologie	2	2	-	-
Chirurgie	2	2	-	-
Endocrinologie	2	2	1	1
Cardiologie	3	3		
Néonatalogie	10	8	-	2
Gastroentérologie	1	-	-	-
UGO	3	3	-	1
Externe	21	20	1	1

significatifs dans les souches d'*Escherichia coli* étudiées. En fonction des services il existe une prédominance de CTX-M par rapport aux autres β -lactamases qui se répartissent en faibles proportions (Tableau IV).

Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches d'*Escherichia coli*

Discussion

Les entérobactéries productrices de BLSE (E-BLSE+) sont toujours d'actualité dans les structures de soins, malgré les mesures de prévention bien codifiées destinées à limiter leur dissémination. On observe plutôt une augmentation de leur fréquence chez plusieurs espèces, en particulier chez *Escherichia coli*, avec des BLSE de type CTX-M plutôt que des TEM ou des SHV observées au départ lors des premières descriptions de ces enzymes. Dans ce cadre, il est important de suivre de près l'évolution du nombre d'isolats, de déterminer l'enzyme en cause et de chercher à savoir si les souches sont reliées afin d'agir de manière ciblée et de pouvoir ajuster au plus vite les politiques de prévention et de lutte contre les bactéries multirésistantes (BMR) aussi bien au niveau local que national.

A l'hôpital militaire de Tunis, les E-BLSE+ sont suivies depuis 1990 et font l'objet d'une alerte systématique dès leur dépistage. Sur la période étudiée dans ce travail, 64 souches d'*E. coli* -BLSE+ ont été isolées chez nos patients.

La majorité des souches sont isolées des ECBU ce qui illustre également la spécificité d'*Escherichia coli* qui constitue la principale espèce bactérienne impliquée dans l'infection urinaire [7].

Les profils de sensibilité aux antibiotiques ont montré que les *E. coli* BLSE sont hautement résistantes aux pénicillines, ceci est observé en France avec un maximum de 30 à 50% des souches d'*Escherichia coli* résistantes aux aminopénicillines, aux céphalosporines à large spectre et à l'association amoxicilline + acide clavulanique isolées, aussi bien dans les hôpitaux qu'en milieu communautaire. Cette résistance élevée aux β -lactamines est associée aussi à des fréquences élevées aux aminosides, aux fluoroquinolones et aux autres antibiotiques. Ce phénomène de multirésistance bactérienne est décrit aussi dans les hôpitaux européens, américains et asiatiques [8].

Toutes les souches étudiées sont sensibles aux céphamycines, incluant principalement la céfoxitine, excepté deux souches qui sont résistantes, cette résistance peut être due à la perte des porines ou à l'expression de la

céphalosporinase plasmidique AmpC. Seul l'imipénème de la classe des β -lactamines conserve une activité puissante contre les souches d'*Escherichia coli* étudiées, d'ailleurs les carbapénèmes sont extrêmement stables à la dégradation par les β -lactamases et sont considérés comme le traitement de choix contre les infections graves associées aux *E. coli* productrices de BLSE.

L'utilisation massive de cet antibiotique a entraîné l'apparition de souches productrices carbapénémases qui deviennent depuis leur première apparition en 1996 aux Etats-Unis un problème majeur émergent à cause de leur résistance à la plupart des antibiotiques disponibles laissant ainsi peu d'options thérapeutiques [9,10].

Le profil de sensibilité aux antibiotiques montre que la majorité des souches étudiées présentent des niveaux de résistance plus élevés pour le céfotaxime par rapport à la céftazidime ce qui suggère qu'ils sont producteurs de CTX-M du fait que l'enzyme CTX-M est beaucoup plus active contre le céfotaxime et l'aztréonam que contre la céftazidime. Ces résultats sont confirmés par la biologie moléculaire.

Dans notre étude nous avons utilisée des amorces spécifiques pour la détection du gène du groupe bla CTX-M-1 vu la prévalence de ce groupe chez *Escherichia coli*. Les résultats montrent la prédominance de CTX-M du groupe 1 au sein des souches productrices de CTX-M ce qui est comparable aux autres études européennes qui suggèrent que les enzymes CTX-M du groupe 1 tel que CTX-M-3 et CTX-M-15 sont majoritaires en Europe, Asie, Afrique, Amérique du nord, Amérique du Sud et en Australie grâce à la diversification de ce groupe (26 variantes) entraînant une diffusion rapide dans le monde [11].

La première CTX-M-1 a été isolée en Allemagne en 1989, par la suite, les enzymes CTX-M se sont propagées rapidement au niveau de différentes espèces bactériennes et dans divers pays [12].

En Tunisie, depuis le premier isolement de BLSE produite par la souche de *Klebsiella pneumoniae* à l'hôpital Charles Nicolle en 1984, un nombre croissant d'enzymes BLSE chez les entérobactéries a été détecté; 60% des isolats étaient des *Klebsiella spp.* et 12,5%

article original

étaient des *E. coli* [13]. La première CTX-M (CTX-M-3) identifiée en Tunisie a été isolée d'une souche de *Salmonella enterica* sérovar Wien en 2001 à l'hôpital militaire de Tunis [13]. Plus tard, une souche de *Salmonella enterica* Livingstone productrice de CTX-M-27 a provoqué une épidémie nosocomiale dans un service de néonatalogie à Sousse en 2002 [14].

Les enzymes autres que CTX-M sont détectées chez quelques souches étudiées, trois souches productrices de SHV, le gène bla TEM est identifiée chez six souches ce qui est compatible avec les constatations qui confirment que l'avènement des CTX-M a brouillé les certitudes épidémiologiques acquises sous l'ère des BLSE de type TEM et SHV, du fait que ce type d'enzyme diffuse rapidement aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire. En France la fréquence des BLSE retrouvées en milieu communautaire est passée de 0,3% en 1999 à 1,1% en 2006, à la suite de la diffusion des CTX-M [11]. Nos résultats mettent en évidence la présence de souches multirésistantes qui hébergent deux ou trois gènes de résistance à la fois : association des gènes bla TEM, bla SHV et bla CTXM-1. Cette association

peut être retrouvée au sein d'une même région de multi-résistance souvent observée avec les souches d'*E. coli* productrices de CTX-M-15, comme le clone international décrit par plusieurs auteurs [15].

Conclusion

Dans la présente étude nous avons démontré la corrélation entre la production de BLSE par les souches d'*Escherichia coli* et la résistance enzymatique aux différentes classes d'antibiotiques. En effet ces souches productrices de BLSE possèdent un profil de résistance particulier caractérisé par une haute résistance aux céphalosporines à spectre étendu avec une sensibilité aux carbapénèmes. En se basant sur les tests génotypiques, nous avons caractérisé les différents types de gènes. Les BLSE rencontrées appartiennent essentiellement à la famille des CTX-M du groupe 1, cette prévalence est due au gène bla CTX-M-1 qui est porté le plus souvent par un plasmide ou un autre élément mobile ce qui facilite leur diffusion dans le milieu communautaire et hospitalier. La résistance aux β -lactamines est associée à

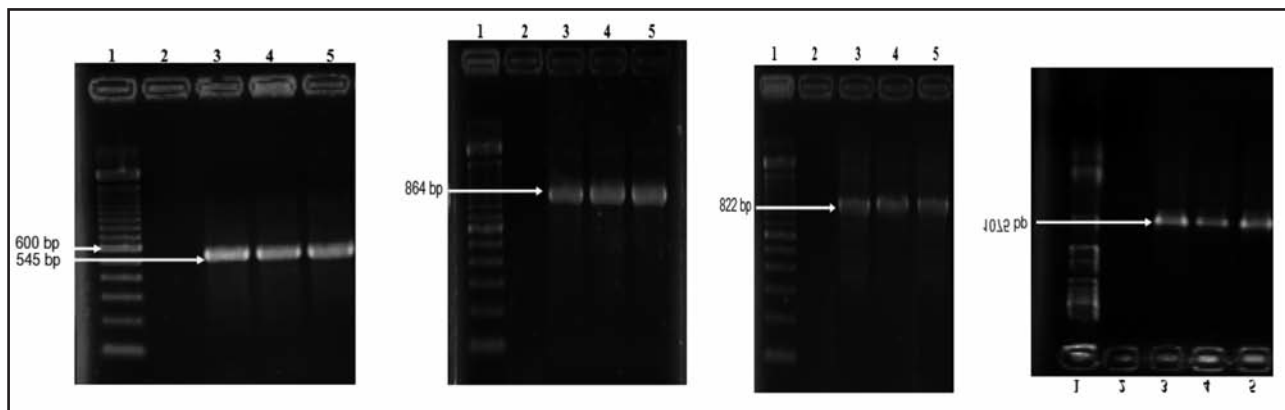


Figure 1 : amplification du gène bla CTX-M à partir de l'ADN chromosomique et plasmidique des souches d'*Escherichia coli*. puits 1 : marqueur de taille ; puits 2 : témoin négatif ; puits 3,4 et 5 : souches positives au gène CTX-M

Figure 2 : amplification du gène bla CTX-M-gpe 1 à partir de l'ADN chromosomique et plasmidique des souches d'*Escherichia coli*. puits 1 : marqueur de taille ; puits 2 : témoin négatif ; puits 3 :4 et 5 : souches positives au gène CTX-M-gpe 1

Figure 3 : amplification du gène bla SHV à partir de l'ADN chromosomique et plasmidique des souches d'*Escherichia coli*. puits 1 : marqueur de taille ; puits 2 : témoin négatif ; puits 3 : 4 et 5 : souches positives au gène SHV

Figure 4 : amplification du gène blaTEM à partir de l'ADN chromosomique et plasmidique des souches d'*Escherichia coli*. puits 1 : marqueur de taille ; puits 2 : témoin négatif ; puits 3 :4 et 5 : souches positives au gène TEM

Les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches d'*Escherichia coli*

une résistance élevée aux autres familles d'antibiotiques. Il serait intéressant à l'avenir d'analyser les différentes séquences des gènes caractérisées afin d'en déterminer l'identité moléculaire, la présence éventuelle de mutations et la localisation génétique (plasmide, transposon, intégrons, séquence d'insertion).

Bibliographie

1. Samaha- Kfoury JN, F Araj G. Recent developments in β -lactamases and extended spectrum β -lactamases. *Brit Med J.* 2003;327.
2. Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, John McGowan JM, Tenover FC. Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum β -lactamases in non-*Escherichia coli* and non-Klebsiella spp. of Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42 : 294-298
3. Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, Dermott MC, Walker R, Meng J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42 3483-3489
4. Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S, Helmuth R. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle swine and poultry. *J Antimicrob Chemotherapy.* 2003;52 : 489-492
5. Livermore DM, Brawn D.F J. Detection of β - lactamase- mediated resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001;48, suppl. SI : 59-64.
6. ChenWKuoT.T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 1993;21 (9) : 2260.
7. Tagajdid MR, Boumhil L, Iken M, Adnaoui M, Benouda A. Étude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. *Med Mal Infect.* 2010;40 : 70-73.
8. Zhou XY, Bordon F, Sirot D, Kitzis MD, Gutmann D. Emergence of Clinical Isolates of *Escherichia coli* Producing TEM-1 Derivatives or an OXA- β -Lactamase Conferring Resistance to β -lactamase Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38 : 1085-1089
9. Fraimow H.S Tsigrelis S. Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit : Mechanisms Epidemiology and Management of Specific Resistant Pathogens. *Crit Care Clin.* 2011;27 : 163-205.
10. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum β -lactamase-producing Organisms. *Hosp. Infect.* 2009;73 : e 345- e354.
11. Ruppé E. Épidémiologie des bêtalactamases à spectre élargi : avènement des CTX-M. *Antibiotiques.* 2010;12 : 3-16.
12. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases : implications for the clinical microbiology laboratory therapy and infection control. *J. of Infect* 2003;47 : 273-295.
13. Armand-Lefèvre L, Leflon-Guibout V, Bredin J, Barguelli F, Amor A, Pagès JM, Nicolas-Chanoine MH. Imipenem resistance in *Salmonella enterica* serovar Wien related to porin loss and CMY-4 beta-lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47 (3) : 1165-8.
14. Bouallègue-Godet O, Ben Salem Y, Fabre L, Demartin M, Grimont PAD, Mzoughi R, Weill FX. Nosocomial Outbreak Caused by *Salmonella enterica* Serotype Livingstone Producing CTX-M-27 Extended-Spectrum β -Lactamase in a Neonatal Unit in Sousse, Tunisia. *J Clin Microbiol.* 2005;43 (3) : 1037-1044.
15. Leflon -Guibout V, Jurand C, Bonacorsi S, Espinase F, Guelfi MC, Duportail F, Heym B, Bingen E, Nicolas-Chanoine MH. Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15 producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycoside and tetracycline in a French Geriatric hospital. *Antimicrob Ag and Chemother.* 2004;48 : 3736-3742.
16. Ben Achour N, Mercuri PS, Power P, Belhadj C, Ben Moussa M, Galleni M, Belhadj O. First detection of CTX-M-28 in a Tunisian hospital from a cefotaxime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain. *Pathol Biol.* 2009;57 (5) : 343-8

Etude des haplotypes associés à la mutation F508del dans une population Tunisienne

S. OUESLATI,
S. HADJ FREDJ,
M. BOUDAYA,
C. SAHLI,
H. SIALA,
A. BIBI,
T. MESSAOUD

Résumé

Introduction : Depuis la découverte en 1989 du gène responsable de la mucoviscidose, plus de 1900 mutations ont été rapportées. A l'exception de la délétion F508del qui est retrouvée en moyenne sur les deux tiers des allèles mutés, ces mutations sont caractérisées par leur rareté. Nous nous sommes intéressés dans le présent travail à l'étude des haplotypes associés à la mutation F508del dans la population Tunisienne.

Matériels et méthodes : Notre travail a comporté l'étude de 5 marqueurs polymorphes extragéniques (XV2C et KM19) et intragéniques (IVS8CA, IVS17bTA et IVS17bCA) chez 10 patients Tunisiens mucoviscidotiques portant la mutation la plus fréquente en Tunisie la F508del. Une population saine de 30 sujets a été également incluse dans notre étude. Pour cela deux techniques de biologie moléculaire ont été utilisées : le polymorphisme de longueur de fragment de restriction et la technique d'analyse des fragments par électrophorèse capillaire.

Résultats : Les résultats obtenus montrent que la mutation F508del est liée à différents haplotypes : l'haplotype B et le 23-31-13 (IVS8CA, IVS17bTA et IVS17bCA). Ces deux haplotypes ont été retrouvés en Europe associés à la mutation F508del ce qui suggère une origine commune de cette mutation.

Conclusion : L'étude des haplotypes nous paraît très intéressante car elle permet d'une part de déterminer l'origine ethnique des lésions moléculaires responsables de cette pathologie et d'autre part d'augmenter l'informativité génétique lors du diagnostic prénatal.

Mots clés : gène CFTR, F508del, haplotype, marqueurs extragéniques, marqueurs intragéniques.

Study of haplotypes associated with the F508del mutation in the Tunisian population

Abstract : Since the discovery in 1989 of the gene responsible for cystic fibrosis, more than 1900 mutations have been reported. The F508del deletion is found on average two thirds of the mutated alleles, the remaining mutations are characterized by their rarity. We are interested in this work to the study of haplotypes associated with the F508del mutation in the Tunisian population. In this study, we analyzed five extra (XV2C and KM19) and intragenic (IVS8CA, IVS17bTA and IVS17bCA) polymorphic markers in 10 CF Tunisians patients carrying the most common mutation F508del. A healthy population of 30 subjects was also included in our study. For this two molecular

Laboratoire de biochimie clinique-Hôpital d'enfants de Tunis-Tunisie

Etude des haplotypes associés à la mutation F508del dans une population Tunisienne

biology techniques were used : the length polymorphism restriction fragment (PCR-RFLP) and capillary electrophoresis. The results show that F508del mutation is linked to different haplotypes : the B haplotype for the extragenic markers and 23-31-13 (IVS8CA, IVS17bTA and IVS17bCA) for the intragenic markers. These two haplotypes were found associated with the F508del mutation in Europe. These results suggest a common origin for this mutation. The study of haplotype is very interesting because it allows in one hand to determine the ethnicity of the molecular lesions responsible for this disease, and in the other hand to increase the genetic informativity during prenatal diagnosis.

Key words : CFTR gene, F508del mutation, haplotype, extragenic markers, intragenic markers

Introduction

La mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas est la plus fréquente des maladies héréditaires, transmises selon le mode autosomique récessif et entraînant une diminution de l'espérance de vie chez la population caucasienne. Cette maladie est due à des mutations du gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance Regulator) localisé au niveau du chromosome 7. Ce gène formé de 27 exons, s'étend sur près de 250 kb et code pour une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés appelée CFTR (1). De nos jours, plus de 1900 mutations différentes ont été identifiées documentant l'extrême hétérogénéité clinique de notre maladie (www.genet.sickkids.on.ca=cftr). La mutation F508del, qui correspond à une délétion de 3 nucléotides CTT au niveau de l'exon 10 du gène CFTR, est considérée comme étant la mutation la plus fréquente de par le monde (2). En Tunisie, elle représente 47.06% (3). L'étude des haplotypes liés à cette mutation permet de déterminer son origine ethnique. Elle permet également d'augmenter l'informativité génétique lors du diagnostic prénatal et la détection de l'anomalie chez certaines familles lorsqu'une ou aucune mutation n'a pas pu être identifiée. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés dans le présent travail à l'étude de cinq marqueurs extra et intragéniques à l'aide de deux techniques performantes de biologie moléculaire : la RFLP (polymorphisme de longueur de fragment de restriction) et la technique d'analyse des fragments par électrophorèse capillaire.

Patients et méthodes

Patients

Notre étude a porté sur 10 patients Tunisiens chez qui le diagnostic de la mucoviscidose a été basé sur un tableau clinique très évocateur de la mucoviscidose (atteinte respiratoire et/ou digestive) ainsi que deux tests de la sueur positifs ($[Cl^-] > 60$ mmol/l) par la technique de l'Exsudose.

Les patients étudiés sont tous porteurs de la mutation F508del à l'état homozygote. Elle a été précédemment identifiée par la technique DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) (3). Une population témoin a été également incluse dans notre étude (30 sujets). Les parents des patients mucoviscidosiques ainsi que les normaux qui ont participé à notre étude ont été informés et un consentement a été obtenu.

Méthodes

Tous les patients et les témoins ont bénéficié de l'étude de 2 marqueurs polymorphes extragéniques (KM19 et XV2C) par la technique RFLP ainsi que l'étude de 3 marqueurs polymorphes intragéniques (IVS8CA, IVS17bTA et IVS17bCA) par la technique d'analyse des fragments par électrophorèse capillaire sur un analyseur génétique (ABI Prism 310 PERKIN ELMER).

L'étude des marqueurs extragéniques

Les marqueurs XV2C et KM19 sont localisés en amont du gène CFTR respectivement à 175Kb et 125kb (4). Ces deux marqueurs ont été validés pour le diagnostic prénatal depuis 1986 et ont été décrits par Estivill en 1987 (5).

L'étude de ces marqueurs polymorphes a été réalisée en

article original

Tableau I : séquences des amorces extragéniques

Marqueurs	Séquences
XV2C	(F) 5'gttgaagtgaattgaatg3' (R) 5'gttcaaacatgtgcaag3'
KM19	(F) 5'gctgcatcatataagttgcc3' (R) 5'aaggtacactgttaatttt3'

Tableau II : Nomenclature de l'haplotype XK (6)

Haplotype	XV2C ^a	KM19 ^b
A	1	1
B	1	2
C	2	1
D	2	2

a. 1 = absence et 2 = présence du site de restriction pour *TaqI*

b. 1 = absence et 2 = présence du site de restriction pour *PstI*

utilisant une amplification par PCR suivie d'une digestion enzymatique. L'ADN génomique a été amplifié en utilisant des amorces décrites précédemment (4) (Tableau I). Les produits de PCR sont ensuite digérés en utilisant l'enzyme de restriction Taq I pour le marqueur XV2C et l'enzyme *PstI* pour le marqueur KM19 (4). Les produits de PCR et de la digestion enzymatique ont été séparés sur un gel d'agarose de 1,5%.

La reconstruction de l'haplotype XK a été déterminée suivant le modèle de Beaudet (6) (Tableau II).

L'étude des marqueurs intragéniques

L'analyse des 3 marqueurs polymorphes intragéniques IVS8CA, IVS17bTA et IVS17bCA, localisés respectivement au niveau des introns 8 et 17 du gène CFTR a été réalisée par PCR multiplexe en utilisant des amorces fluorescentes (Tableau III) (7;8).

20µl de formamide désionisé et 0.5µl de marqueur de taille Tamra (Tamra 500) ont été mélangés avec 2 µl de

Tableau III : Séquences d'amorces des marqueurs intragéniques

Marqueurs	Séquences
IVS8CA	(F) Fam 5'aaatctatctcatgtaagtgtgaaga 3' (R) 5'actaagatattgcccattatcaagt 3'
IVS17bCA	(F) Hex 5'tgtcacctctcactactcat 3' (R) 5'aaactaccgacaaggaggaa 3'
IVS17bTA	(F) Fam 5'gctgcattctataggtatc3' (R) 5'tgtgaaaacaggataatac3'

produit de PCR. Après une dénaturation à 94°C pendant 4 min, le mélange réactionnel est injecté dans le séquenceur de type ABI Prism 310 (PERKIN ELMER) en mode analyse des fragments (Genscan). Les résultats sont par la suite analysés par le logiciel Genscan 1.1.

Analyse statistique :

Le test khi-deux (X^2) a été utilisé pour comparer les résultats obtenus entre nos deux populations. Si la valeur de P est < 0.05, le résultat est considéré significatif.

Résultats

La mutation F508del fut identifiée en 1989 en même temps que le gène CFTR (1). C'est la mutation la plus fréquente dans le monde avec 66% (2), ainsi qu'en Tunisie avec 47,06% (3). La F508del correspond à une délétion de 3 paires de bases (CTT) au niveau de l'exon 10 du gène CFTR précisément entre 1652 pb et 1655 pb, entraînant la perte d'une phénylalanine en position 508 de la protéine CFTR (4). Chez les 80 chromosomes étudiés, dont 60 normaux, différents haplotypes ont été identifiés (Tableau IV et V).

Etude des marqueurs extragéniques

La distribution des haplotypes XK chez les patients mucoviscidosiques et les normaux est regroupée dans le tableau IV.

Tableau IV : La distribution des haplotypes XK chez les deux populations

Haplotypes	MALADES		NORMAUX			P
	Nombre de chromosomes	%	Haplotypes	Nombre de chromosomes	%	
A	4	20	A	14	23.33	0.07
B	10	50	B	14	23.33	0.02
C	2	10	C	13	21.66	0.30
D	4	20	D	19	31.66	

Avec :% pourcentage

Etude des haplotypes associés à la mutation F508del dans une population Tunisienne

Tableau V : Distribution des haplotypes intragéniques dans les deux populations

Nom des haplotypes	Malades		Normaux		P
	Nombre de chromosomes	%	Nombre de chromosomes	%	
23-31-13	8	40	5	8,33	0,0088
16-31-13	4	20	1	1,66	0,0033
28-31-13	4	20	-	-	0,0003
28- 29-13	2	10	-	-	0,013
32-31-13	2	10	-	-	0,013
17-07-17	-	-	8	13,33	
22-31-14	-	-	3	5	
18-7-13	-	-	3	5	
23-44-15	-	-	2	3,33	
18-31-13	-	-	2	3,33	
22-44-13	-	-	2	3,33	
16-38-13	-	-	2	3,33	
16-33-13	-	-	2	3,33	
22-48-13	-	-	2	3,33	
18-41-13	-	-	2	3,33	
22-43-13	-	-	2	3,33	
23-28-17	-	-	2	3,33	
22-30-13	-	-	2	3,33	
23-32-15	-	-	1	1,66	
16-44-13	-	-	1	1,66	
17-44-11	-	-	1	1,66	
18-29-16	-	-	1	1,66	
19-7-17	-	-	1	1,66	
22-33-13	-	-	1	1,66	
16-41-17	-	-	1	1,66	
16-40-15	-	-	1	1,66	
15-30-13	-	-	1	1,66	
16-47-14	-	-	1	1,66	
16-48-13	-	-	1	1,66	
17-42-14	-	-	1	1,66	
23-47-13	-	-	1	1,66	
16-33-15	-	-	1	1,66	
16-40-17	-	-	1	1,66	
17-45-13	-	-	1	1,66	
17-31-11	-	-	1	1,66	
18-31-15	-	-	1	1,66	
16-45-13	-	-	1	1,66	
15-37-13	-	-	1	1,66	

Le nom des haplotypes est défini selon le nombre de répétition au niveau des différents loci IVS8CA, IVS17bTA et IVS17bCA respectivement
Avec : % pourcentage

article original

Les différents haplotypes A, B, C et D ont été retrouvés aussi bien chez les normaux que chez les patients (Tableau IV).

L'haplotype B a été retrouvé chez 50% des chromosomes portant la mutation F508del. Une différence significative a été notée entre les normaux et les mucoviscidosiques portant cet haplotype ($P=0.02$).

Etude des marqueurs intragéniques

Les haplotypes établis à l'aide des marqueurs IVS8CA, IVS17bTA et IVS17bCA sont regroupés dans le tableau V. Pour les 80 chromosomes analysés, 38 haplotypes différents ont été trouvés ; Cinq d'entre eux associés aux chromosomes portant la mutation F508del avec un haplotype (23-31-13) représentant 40%. Une différence significative a été notée entre les deux groupes pour cet haplotype ($p=0.00088$).

Discussion

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'étude des haplotypes liés à la mutation F508del en utilisant des marqueurs extra et intragéniques. Ces différents marqueurs ont été utilisés compte tenu de leur grande informativité.

Les marqueurs XV2C et KM19 sont étroitement liés au gène CFTR, la reconstruction des haplotypes à l'aide de ces deux marqueurs peut considérablement faciliter l'étude moléculaire du gène CFTR (9).

Dans le présent travail, l'étude de ces deux marqueurs montre une association entre la mutation F508del et l'haplotype B (50%). Une différence significative a été notée entre les sujets normaux et mucoviscidosiques portant l'haplotype B ($p=0.02$). Ce résultat concorde avec ceux décrits dans la littérature. En effet, l'haplotype B est souvent associé à la mutation F508del dans différentes populations telles que l'Allemagne (10), l'Italie (11), la Serbie (12), la Turquie (13) et l'Angleterre (14), ce qui est en faveur de la théorie d'une origine commune de cette mutation.

L'association de la mutation F508del avec le même haplotype est susceptible de refléter une origine unique de la mutation, qui a probablement été introduite il y a

environ 52.000 ans, durant l'ère paléolithique dans la population «caucasioïde», après la divergence des grands groupes continentaux (15).

La recherche des mutations mucoviscidosiques a été facilitée par l'utilisation des marqueurs microsatellites, en effet une forte association a été identifiée entre les mutations du gène CFTR et les haplotypes construits à l'aide de ces marqueurs (16).

Dans notre travail suite à l'étude des marqueurs intragéniques, la mutation F508del a été associée à 5 haplotypes différents. Une différence de distribution de ces haplotypes entre les deux populations a été notée.

L'haplotype le plus fréquent chez les sujets malades 23-31-13 (40%) a été trouvé seulement chez 8.33% dans la population normale ($P=0.00088$). Cette association peut considérablement faciliter la recherche de la mutation F508del. Le même haplotype a été retrouvé en Angleterre (17), en France (9), en Irlande du Nord (19), en Turquie (20), en Espagne (21) et en Italie (22). Le reste des haplotypes associés à la mutation F508del (16-31-13, 28-31-13, 28- 29-13 et 32-31-13) peuvent être le produit de recombinaisons génétiques produites au cours du temps (9).

La reconstruction des haplotypes par le biais des marqueurs extra et intragéniques est un outil très important lors du diagnostic moléculaire de la mucoviscidose. En effet, l'étude des haplotypes permet d'orienter l'identification des défauts moléculaires, la détection d'anomalie chez certaines familles lorsqu'une ou aucune mutation n'a pas été identifiée, d'exclure l'existence d'une contamination fœto-maternelle lors du diagnostic prénatal. Elle permet également de déterminer l'origine de chaque mutation ainsi que de suivre son évolution au cours du temps. Cette étude préliminaire doit être complétée sur un nombre plus important de patients mucoviscidosiques à fin de confirmer les résultats trouvés.

Références

1. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-80.

Etude des haplotypes associés à la mutation F508del dans une population Tunisienne

2. Zielenski J, Markiewicz D, Chen HS, Schappert K, Seller A, Durie P, Corey M, Tsui LC. Identification of six mutations (R31L, 441delA, 681delC, 1461ins4, W1089R, E1104X) in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Hum Mut* 1995; 5: 43-7.
3. Fredj SH, Messaoud T, Templin C, Des Georges M, Fattoum S, Claustres M. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Mutation Spectrum in Patients with Cystic Fibrosis in Tunisia. *Genet Test Mol Biomark* 2009; 13: 577-81.
4. Repetto M, Gabriel AM, Alonso R, Delgado I. XV-2c and KM: 19 haplotype analysis in Chilean patients with cystic fibrosis and unknown CFTR gene mutations. *Biol Res* 2007; 40: 223-29.
5. Estivill X, Scambler PJ, Wainwright BJ. Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium for cystic fibrosis. *Genomics* 1987b; 1: 257-63.
6. Beaudet AL, Feldman GL, Fernbach SD, Buffone GJ, O'Brien WE. Linkage disequilibrium, cystic fibrosis and genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 319-26.
7. Morral N, Nunes V, Casals T. CA/GT Microsatellite alleles within the CFTR gene are not generated by unequal crossing-over. *Genomics* 1991; 10: 692-98.
8. Zielenski J, Markiewicz D, Rininsland J, Tsui LC. A cluster of highly polymorphic dinucleotide repeats in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 1256-62.
9. Claustres M, Desgeorges M, Moine P, Morral N, Estivill X. CFTR haplotypic variability for normal and mutant genes in cystic fibrosis families from southern France. *Hum Genet* 1996; 98: 336-44.
10. Dork T, Neumann T, Wulbrand U, Wulf B, Kalin N, Maass G, Krawczak M, Guillermit H, Ferec C, Horn G. Intra- and extragenic marker haplotypes of CFTR mutations in cystic fibrosis families. *Hum Genet* 1992; 88: 417-25.
11. Castaldo G, Ripa E, Sebastio G, Raia V, Ercolini P, De Ritis G, Salvatore D, Salvatore F. Molecular epidemiology of cystic fibrosis mutations and haplotype in Southern Italy evaluated with an improved semiautomated robotic procedure. *J Med Genet* 1996; 33: 475-79.
12. Radivojevic D, Lalic T, Djuricic M, Guc-scekic M, Minic P, Sovitic A. Analysis of extra- and intragenic marker haplotypes as part of molecular diagnosis of cystic fibrosis in patients from Serbia. *Arch Biol Sci Belgrade* 2008; 60: 5-10.
13. Hundrieser J, Bremer S, Peinemann F, Stuhmann M, Hoffknecht N, Wulf B, Schmidtke J, Reiss J, Maab G, Tummeler B. Frequency of the F508 deletion in the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 1990; 85: 409-10.
14. Watson EK, Edward SM, Simova EM, Thompson JO, Williamson RW, Williams C. The incidence of F508 CF mutation, and associated haplotypes, in a sample of English CF families. *Hum Genet* 1990; 85: 435-36.
15. Morral N, Bertranpetot J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M Jr, Kalaydjieva L, Angelicheva D, Dancheva R, Romeo G, Russo MP, Garnerone S, Restango G, Ferrari M, Magnani C, Clauster M, Desgeorges M, Schwartz M, Dallapiccola B, Novelli G, Ferec C, De Arce M, Nemeti M, Kere J, Anvret M, Dahl N, Kadasi L. The origin of the major cystic fibrosis mutation (F508) in European populations. *Nat Genet* 1994; 7: 169-75.
16. Morral N, Nunes V, Casals T, Chillon M, Gimhez J, Bertranpetit J, Estivill X. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: Mutations framework and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1015-22.
17. De Braekeleer M, Chaventré A, Bertorelle G, Verlingue C, Raguénés O, Mercier B, Ferec C. Linkage disequilibrium between the four most common cystic fibrosis mutations and microsatellite haplotypes in the Celtic population of Brittany. *Hum Genet* 1996; 98: 223-27.
18. Hughes D, Hill A, Redmond A, Nevin N, Graham C. Fluorescent multiplex microsatellites used to identify haplotype associations with 15 CFTR mutations in 124 Northern Irish CF families. *Hum Genet* 1995; 95: 462-64.
19. Onay T, Zielenski J, Topaloglu O, Gokgoz N, Kayserili H, Apak MY, Camcioglu Y, Cokugras YH, Akcakaya N, Tsui LC, Kirdar B. Cystic Fibrosis Mutations and Associated Haplotypes in Turkish Cystic Fibrosis Patients. *Hum Biol* 2001; 73: 191-203.
20. Morral N, Dork T, Llevadot R. Haplotype analysis of 94 cystic fibrosis mutations with seven polymorphic CFTR DNA markers. *Hum Mutat* 1996; 8: 149-59.
21. Russo MP, Romeo G, Devoto M, Barbujani G, Cabrini G, Giunta A, D'Alcamo E, Leoni G, Sangiuolo F, Magnani C, Cremonesi L, Ferrari M. Analysis of linkage disequilibrium between different cystic fibrosis mutations and three intragenic microsatellites in the Italian population. *Hum Mut* 1995; 5: 23-27.

Infection du liquide d'ascite causée par *Streptococcus pneumoniae* chez un patient cirrhotique

S. SAMMOUD¹,
MS. ASLI¹,
MR. BOUALI²,
F. BARGUELLIL¹

Résumé : Les complications infectieuses sont une des principales causes de mortalité chez les malades atteints de cirrhose. Parmi les infections sévères, l'infection du liquide d'ascite est une des complications les plus fréquentes. Elle survient chez 8 à 30% des malades hospitalisés à la suite d'une ascite. La contamination de l'ascite se produit, habituellement par des germes entériques, avant tout *Escherichia coli*, est soit directe, soit indirecte par voie hématogène. L'hypertension portale et l'insuffisance hépatique créent des conditions hémodynamiques et immunologiques qui expliquent la survenue de ces infections. La responsabilité adjuvante des actes invasifs et des hémorragies digestives est probable. Le tableau clinique est rarement très suggestif et c'est l'examen bactériologique au moindre doute du liquide d'ascite qui est le geste fondamental. La gravité immédiate impose un traitement rapide et adapté. Nous rapportons un cas d'infection du liquide d'ascite à *Streptococcus pneumoniae* chez un patient cirrhotique. Les patients cirrhotiques et alcooliques sont particulièrement exposés aux infections à *Streptococcus pneumoniae*, dont la mortalité est élevée sur ce terrain, la prise en charge rapide aussi bien sur le plan biologique que sur le plan clinique a permis d'obtenir une bonne évolution dans notre observation. Les auteurs à travers ce cas clinique rappellent la détermination de groupe à risque d'infection qui semble une voie prometteuse, permettant d'envisager une prophylaxie en particulier chez le malade ayant un taux bas de protides, fibronectine et C3 dans l'ascite.

Mots-clés : *Streptococcus pneumoniae*- Infection - ascite- Cirrhose

infection of ascites due to *Streptococcus pneumoniae* in a cirrhotic patient

Summary : Infectious complications are a major cause of mortality in patients with cirrhosis. From severe infections, infection ascites is one of the most frequent complications. It occurs in 8-30% of patients hospitalized with ascites. Contamination of ascites occur, usually by enteric bacteria, especially *Escherichia coli*, is either directly or indirectly through blood. Portal hypertension and liver failure create hemodynamic and immunological conditions that explain the occurrence of these infections. Adjuvant responsibility invasive procedures and gastrointestinal bleeding is likely.

The clinical setting is often very suggestive and the bacteriological examination in case of doubt of ascites is the fundamental gesture. The immediate severity requiring prompt and appropriate treatment. We report a case of infection of ascites due to *Streptococcus pneumoniae* in a cirrhotic patient.

¹ Service de Microbiologie-
Hôpital Militaire de Tunis
1008 Montfleury Tunis

² Service de Gastro-entérologie-
Hôpital Militaire de Tunis
1008 Montfleury Tunis

Infection du liquide d'ascite causée par *Streptococcus pneumoniae* chez un patient cirrhotique

The alcoholic and cirrhotic patients are particularly susceptible to infections with *Streptococcus pneumoniae*, the mortality is high in this area, support fast both in biologically and clinically has achieved good progress in our observation. The authors through this clinical case recall the determination of risk group of infection appears to be a promising path for considering prophylaxis especially in the patient with a low level of proteins, fibronectin and C3 in ascites.

Keywords words : *Streptococcus pneumoniae* - Infection - ascites, cirrhosis

Introduction

L'infection spontanée du liquide d'ascite (ILA) est une des complications infectieuses les plus fréquentes chez le cirrhotique (8 à 30% des patients hospitalisés avec ascite). Elle est grave (mortalité hospitalière : 30-50%), et récidivante durant l'année dans 40 à 70% des cas. Sa survenue constitue une indication éventuelle de transplantation hépatique. Les patients cirrhotiques et alcooliques sont particulièrement exposés aux infections à *Streptococcus pneumoniae*, dont la mortalité est élevée sur ce terrain. Nous rapportons un cas d'infection du liquide d'ascite à pneumocoque chez un patient cirrhotique

Observation

Monsieur X. âgé de 55 ans est hospitalisé au service de Gastro-entérologie à l'Hôpital Militaire de Tunis pour décompensation oedémato-ascitique d'une cirrhose post-hépatitique C. Dans ses antécédents, on note un diabète de type II depuis 2005 traité et équilibré et une hypertension artérielle (HTA) équilibrée sous traitement.

La cirrhose fut découverte en décembre 2007 suite à une hémorragie digestive (hématémèse + méléna secondaires à une rupture de varices œsophagiennes).

A l'admission, le patient est fébrile à 38,5 °C et présente un abdomen distendu, une encéphalopathie stade I, une ascite de moyenne abondance (matité déclive), une circulation veineuse collatérale porto-cave, des œdèmes des membres inférieurs et une splénomégalie.

L'échographie abdominale montre un foie d'hépatopathie chronique siège d'un nodule de 3 cm.

L'angiotomodensitométrie hépatique montre un nodule

du segment V arrondi, mal limité, spontanément hypodense ainsi qu'une thrombose porte partielle associée à des signes d'hypertension portale. L'alcoolisation réalisée était sans incidents.

Les explorations biologiques pratiquées montrent une anémie (Hb=9,4g/dl) normochrome normocytaire associée à une thrombopénie (plaquettes=84000/mm³). Une hyponatrémie à 124 mmol/ml avec une kaliémie normale. La CRP était élevée (92 mg/l).

Le bilan hépatique montre une augmentation de la bilirubine totale et conjuguée (109/58 µmol/l) avec des transaminases normales.

Le bilan rénal sanguin est sans anomalies contrairement au bilan urinaire qui révèle une diminution de la créatinine (8,3 mmol/24h), du sodium (<10 mmol/l) et du potassium (31mmol/24h) urinaires. L'alpha-fœto-protéine (AFP) est normale

L'examen cyto bactériologique des urines (ECBU) est négatif.

La ponction d'ascite réalisée le jour de l'admission du patient révèle un liquide trouble avec 600 GB/mm³ (20% Lymphocytes et 80% PNN soit 480/mm³ et 100 GR/mm³) et un taux de protides bas de 6,3g/l. L'examen direct à la recherche de germes était négatif. En même temps 3 hémocultures ont été effectuées.

La conduite à tenir a été d'arrêter les diurétiques, la bithérapie anti-HCV (ribavirine + interféron pégylé) et d'adopter un régime sans sel avec restriction hydrique et un antibiotique à base de céfotaxime 1 g x 4/j associées à la ciprofloxacine 1cp x 2/j.

La culture du liquide d'ascite met évidence 24 H plus tard la présence de *Streptococcus pneumoniae* sensible à la pénicilline, l'amoxicilline, amoxicilline acide clavula-

pratique quotidienne

nique, au céfotaxime, à l'imipénème, la tétracycline, l'érythromycine, la lincomycine, la pristnamycine, la rifampicine, la vancomycine et la teicoplanine et résistant à l'ofloxacine, à l'association triméthoprime-Sulfaméthoxazole et présentait une résistance de bas niveau à la kanamycine et à la gentamicine.

La deuxième ponction d'ascite réalisée le lendemain était marquée par l'augmentation des GB ($1300/\text{mm}^3$) et des GR ($600/\text{mm}^3$) et la négativation de la culture.

Une ponction d'ascite faite à j3 d'antibiothérapie était d'aspect jaune légèrement trouble avec des GB $=60/\text{mm}^3$ (80% lymphocytes), des GR $=50/\text{mm}^3$ et un taux plus élevé de protides (10,7 g/l).

L'évolution est favorable sous céfotaxime seule à j10 de traitement avec un liquide d'ascite de contrôle clair, GB $=50/\text{mm}^3$ (70% lymphocytes) dont la culture était négative et le taux de protides de (20 g/l).

Discussion

Les causes les plus fréquentes des péritonites primitives sont infectieuses. Les germes impliqués sont généralement ceux de la flore digestive (entérobactéries et anaérobies), mais des cocci à Gram positif et notamment les pneumocoques peuvent être isolés [7].

Streptococcus pneumoniae est une étiologie peu commune de péritonite, dotée d'une mortalité élevée (74%) avant l'ère des antibiotiques [8,9]. Il ne présente que 2,6[10] à 8% [11] des étiologies de péritonites primitives (10, 11). L'infection du liquide d'ascite et la présence du pneumocoque peut s'expliquer par :

Une contamination péritonéale par les vaisseaux lymphatiques qui traversent le diaphragme connectant ainsi les cavités pleurale et péritonéale. Ainsi, lors d'une infection pulmonaire à pneumocoque, le germe peut accéder à la cavité péritonéale par cette voie [2]. Dans notre observation, il n'y avait pas d'infection pulmonaire évidente et la radiographie du thorax n'a révélé aucune anomalie.

La contamination péritonéale peut être due à une bactériémie, la péritonite serait alors une métastase infectieuse d'une localisation primaire non connue ou d'une bac-

tériémie transitoire asymptomatique [11]. Toutefois, les hémocultures effectuées étaient négatives excluant cette hypothèse.

Finalement, il pourrait y avoir une contamination digestive par translocation intestinale des micro-organismes. Il y a peu de preuves en faveur de cette origine et le pneumocoque n'a été que rarement isolé de la flore intestinale [8]. C'est l'une des hypothèses qui peut expliquer l'infection du liquide d'ascite.

Des études ont montré que le risque d'infection du liquide d'ascite augmentait avec un taux de protides bas ($<10\text{g/l}$) [12,13]. L'activité anti-microbienne de l'ascite est également directement liée à la concentration de la fraction C3 du complément [14]. Le risque d'infection du liquide d'ascite est particulièrement élevé lorsque la concentration de la bilirubine sérique est supérieure à $43\ \mu\text{mol/l}$ [15].

Notre patient a développé une infection du liquide d'ascite à pneumocoque avec un taux de protides égal à 6,3 g/l et un taux de bilirubine égal à $109\ \mu\text{mol/l}$.

Pour améliorer le diagnostic bactériologique, il est recommandé d'ensemencer le liquide d'ascite dans un flacon d'hémoculture au lit du malade [2].

Une étude faite sur une population jeune (15 cas), à prédominance féminine (87%) et sans terrain prédisposant, a recensé l'implication de *Streptococcus pneumoniae* dans 40% des cas (6/15) [16], ce qui constitue un résultat inhabituel étant donné que ce sont les bacilles à Gram négatif et essentiellement *Escherichia coli* qui sont les germes les plus fréquemment décrits comme responsables de péritonites. Plusieurs auteurs ont démontré que ces infections sont rares chez les adultes ne présentant ni cirrhose, ni ascite, ni syndrome néphrotique, ni maladies auto-immunes, ou immunodépression [17].

Dans une étude comparant des patients cirrhotiques atteints de péritonite primitive pneumococcique aux patients souffrant de péritonite à *Escherichia coli*, les résultats ont montré que les patients du premier groupe développaient plus fréquemment des infections communautaires : 73% vs 47%; des pneumonies 36% vs 2%, des bactériémies 76% vs 33% et une mortalité plus élevée 27% vs 9% [18].

Infection du liquide d'ascite causée par *Streptococcus pneumoniae* chez un patient cirrhotique

Une étude a montré que la péritonite ne représentait qu'une petite partie des patients atteints d'infections invasives à pneumocoque mais qui est susceptible de croître en importance étant donné l'augmentation du nombre de patients atteints d'hépatite C et de VIH [19]. Chez les malades atteints de cirrhose hospitalisés pour hémorragie digestive, l'incidence des infections est comprise entre 30 et 60% dont environ 15% d'ILA [20-25]. Dans cette population, la plupart des essais ont montré une efficacité des antibiotiques sur la prévention des infections par rapport au placebo ou à l'absence de traitement [20, 22-27]. Les antibiotiques les plus souvent utilisés étaient des quinolones associées parfois à l'amoxicilline/acide clavulanique. Une étude récente a montré une efficacité supérieure d'un traitement de 7 jours par céftriaxone (1g/j voie IV) par rapport à la norfloxacine (400mg 2fois/j peros) [28]. Une méta analyse a montré que l'antibioprophylaxie diminuait significativement l'incidence des infections sévères (septicémie et ou ILA) et augmentait la survie à court terme [29]. En cas de suspicion d'infection du liquide d'ascite, le traitement doit être débuté en urgence sans attendre le résultat de la culture.

Actuellement, les antibiotiques les mieux validés appartiennent à la classe des céphalosporines de troisième génération (céfotaxime, céftazidime, céftizoxime ou céftriaxone). Dans une étude randomisée, le céfotaxime était le plus efficace et mieux toléré sur le plan rénal que l'association ampicilline et tobramycine [30]. Cette molécule a permis une évolution favorable de notre patient.

Cependant, après guérison d'un premier épisode d'ILA, la probabilité de récurrence est de 40 à 70% à un an [31-33] et la survie est comprise entre 30 et 40% en rapport avec la gravité de l'hépatopathie sous-jacente [34].

Plusieurs auteurs ont évoqué l'intérêt du traitement prophylactique chez les malades atteints de cirrhose ayant un risque élevé d'infection et bien évidemment chez les patients ayant guéri d'un premier épisode d'ILA. Actuellement, la norfloxacine constitue l'antibiotique de choix utilisé, en raison de son activité sur les bacilles à Gram négatif, du respect de la flore anaérobie et de sa

bonne tolérance chez les cirrhotiques [35].

Des études ont évalué d'autres alternatives prophylactiques comme : le cotrimoxazole à la dose de 800/160 mg/j, pendant 5 jours/semaine ou la ciprofloxacine à la dose de 750 mg par semaine [36, 37].

L'ILA est une complication très tardive dans l'évolution de la cirrhose. Sa gravité immédiate et à long terme (survie médiane de 9 mois) rend souvent difficile la réalisation d'une transplantation. Des mesures préventives de l'aggravation de l'insuffisance hépatocellulaire et de l'HTP doivent être mises en place le plus tôt possible au cours de la maladie. Le traitement étiologique de l'hépatopathie doit être effectué chaque fois que possible. Certaines molécules antivirales (interféron, inhibiteurs nucléosidiques) peuvent considérablement modifier l'évolution des cirrroses post-hépatitiques B et C. Le contrôle de l'HTP par une association de propranolol et de mono nitrate d'isosorbide diminue le risque de survenue d'une ascite ou d'une infection d'ascite [38].

Conclusion

L'ILA à *Streptococcus pneumoniae* constitue une étiologie rare de péritonites primitives comparée aux bacilles à Gram négatif. Un diagnostic précoce associé à un traitement bien adapté permettrait d'améliorer considérablement le pronostic. Chez tout malade avec ascite et surtout après guérison d'un premier épisode d'ILA, la discussion d'une éventuelle indication de transplantation est souhaitable vu le pronostic péjoratif de ces malades.

Références

1. Strauss E, Caly WR. Spontaneous bacterial peritonitis: a therapeutic update. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006 ; 4 : 249-60.
2. Garnache F, Simon M, Goffinet P. Péritonites primitives à *Streptococcus pneumoniae*. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1997 ; 26 : 617-22.

pratique quotidienne

3. Kerr DNS, Pearson DT, Read AE. Infection of ascitic fluid in patients with hepatic cirrhosis. *Gut* 1963; 4 : 394-8.
4. Runyon BA. Early events in spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 2004 ; 53 : 782-4.
5. Gribbin, Cox C. Spontaneous bacterial peritonitis in a healthy adult male. *Aust N Z J Surg* 1990 ; 60 : 723-5.
6. Gindre S, Dellamonica J, Couadau J, Carles M, Grimaud D, Ichai C. Secondary *Streptococcus pyogenes* peritonitis following necrotizing fasciitis. *Ann Fr Anesth Reanim* 2004 ; 23 : 737-9.
7. Montravers P. Pértonites. *EMC Anesthésie-Réanimation* (36-726-A-30).
8. Kunkler RB, Tomson CRV, O'Brien TS. Primary pneumococcal peritonitis. *Br J Hosp Med* 1992;47:262-6
9. Nuckols HH, Hertig AT. *Pneumococcus* infection of the genitaltract in women. *Am J Obstet Gynecol* 1938; 35 : 782-93.
10. Hoefs JC, Canawati HN, Sapico FL, Hopkins RR, Weiner J, Montgomerie JZ. Spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1982; 2 :399-407.
11. Wilcox CM, Dismukes WE. Spontaneous bacterial peritonitis. *Medicine*1987; 66 :447-56.
12. Bercoff E, Durrbach A, Manchon ND, Durantou Y, Senant J, Lecomte N. La concentration des protides dans l'ascite permet-elle de prévoir la survenue d'une infection du liquide d'ascite. *Gastroenterol Clin Biol* 1987;11:636-8.
13. Llach J, Rimola A, Navasa M, Ginès P, Salmeron JM, Ginès A. Incidence and predictive factors of first episode of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis with ascites. Relevance of ascitic fluid protein concentration. *Hepatology* 1992;16:724-7.
14. Such J, Guarner C, Enriquez J, Rodriguez JL, Seresl, Villardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1988;6:80-4.
15. Andreu M, Sola R, Sitges-Serra A, Alia C, Gallen M, Vila C. Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Gastroenterology* 1993 ; 104:1133-8.
16. P.H. Savoie, T. Peycru, L. Mingoutaud, A. Sow, N. Bianca, G. Pauleau, L. Garcia, P. Farthouat. Pértonites primitives en Afrique Subsaharienne : A propos de 15 cas.
17. Carolyn Hemsley, Susannah J. Eykyn. Pneumococcal Peritonitis in Previously Healthy Adults: Case Report and Review. *Clin Infect Dis*. 1998 Aug; 27 (2) :376-9.
18. Capdevila O, Pallares R, Grau I, Tubau F, Liñares J, Ariza J, Gudiol F. Pneumococcal peritonitis in adult patients: report of 64 cases with special reference to emergence of antibiotic resistance. *Arch Intern Med*. 2001 Jul 23;161(14):1742-8.
19. Darcy C Waisman, BSc, Gregory J Tyrrell, PhD, [...], and Thomas J Marrie, MD. Pneumococcal peritonitis: Still with us and likely to increase in importance. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2010 Spring; 21(1):e23-7.
20. Rimola A, Bory F, Teres J, Perez-Ayuso RM, Arroyo V, Rodes J. Oral, nonabsorbable antibiotics prevent infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1985 ; 5 : 463-7.
21. Bleichner G, Boulanger R, Squara P, Sollet JP, Parent A. Frequency of infections in cirrhotic patients presenting with acute gastrointestinal haemorrhage. *Br J Surg* 1986 ; 73 : 724-6.
22. Soriano G, Guarner C, Tomas A, Villanueva C, Torras X, Gonzalez D, Sainz S, Anguera A, Cussó X, Balanzó J. Norfloxacin prevents bacterial infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterology* 1992 ; 103 : 1267-72.
23. Blaise M, Pateron D, Trinchet JC, Levacher S, Beaugrand M, Pourriat JL. Systemic antibiotic therapy prevents bacterial infection in cirrhotic patients with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1994 ; 20 : 34-8.
24. Pauwels A, Mostefa-Kara N, Debenes B, Degoutte E, Levy VG. Systemic antibiotic prophylaxis after gastrointestinal hemorrhage in cirrhotic patients with a high risk of infection. *Hepatology* 1996 ; 24 : 802-6.
25. Hsieh WJ, Lin HC, Hwang SJ, Hou MC, Lee FY, Chang FY, Lee SD. The effect of ciprofloxacin in the prevention of bacterial infection in patients with cirrhosis after upper gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 1998 ; 93 : 962-6.
26. Selby WS, Norton ID, Pokorny CS, Benn RA. Bacteremia and bacterascites after endoscopic sclerotherapy for bleeding esophageal varices and prevention by intravenous cefotaxime : a randomized trial. *Gastrointest Endosc* 1994 ; 40 : 680-4.

Infection du liquide d'ascite causée par *Streptococcus pneumoniae* chez un patient cirrhotique

27. Rolando N, Gimson A, Philpott-Howard J, Sahathevan M, Casewell M, Fagan E. Infectious sequelae after endoscopic sclerotherapy of oesophageal varices : role of antibiotic prophylaxis. *J Hepatol* 1993 ; 18 : 290-4.
28. Fernandez J RDAL, Serradilla R, Gomez C, Guarner C, Durandez R, Planas R. Randomized, multicenter, controlled trial comparing oral norfloxacin versus intravenous ceftriaxone in the prevention of bacterial infection in cirrhotics with severe liver failure and gastrointestinal bleeding. *J Hepatol* 2005 ; 42 : 4.
29. Bernard B, Grange JD, Khac EN, Amiot X, Opolon P, Poynard T. Antibiotic prophylaxis for the prevention of bacterial infections in cirrhotic patients with gastrointestinal bleeding : a meta-analysis. *Hepatology* 1999 ; 29 : 1655-61.
30. Felisart J, Rimola A, Arroyo V, Perez-Ayuso RM, Quintero E, Gines P, Rodes J. Cefotaxime is more effective than is ampicillin-tobramycin in cirrhotics with severe infections. *Hepatology* 1985 ; 5 : 457-62.
31. Tito L, Rimola A, Gines P, Llach J, Arroyo V, Rodes J. Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis : frequency and predictive factors. *Hepatology* 1988 ; 8 : 27-31.
32. Gines P, Rimola A, Planas R, Vargas V, Marco F, Almela M, Forne M. Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis : results of a double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatology* 1990 ; 12 : 716-24.
33. Silvain C, Besson I, Ingrand P, Mannant PR, Fort E, Beauchant M. Prognosis and long-term recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. *J Hepatol* 1993 ; 19 : 188-9.
34. Altman C, Grange JD, Amiot X, Pelletier G, Lacaine F, Bodin F, Etienne JP. Survival after a first episode of spontaneous bacterial peritonitis. Prognosis of potential candidates for orthotopic liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 1995 ; 10 : 47-50.
35. Jean-Didier Grangé, Xavier Amiot. Antibioprophylaxie de l'infection du liquide d'ascite. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. Vol 22, N° 3- Avril 1998. P 301.
36. Singh N, Gayowski T, Yu VL, Wagener M. Trimethoprim-sulfamethoxazole for the prevention of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis : a randomized trial. *Ann Intern Med* 1995 ; 122 : 595-8.
37. Rolachon A, Cordier L, Bacq Y, Nousbaum JB, Franza A, Paris JC, Fratte S, Bohn B, Kitmacher P, Stahl JP. Ciprofloxacin and long-term prevention of spontaneous bacterial peritonitis : results of a prospective controlled trial. *Hepatology* 1995; 22 : 1171-4.
38. Abrales JG, Tarantino I, Turnes J. Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis. *Hepatology* 2003; 37 : 902-8.

Prevalence of vitamin D deficiency among the Jordanian population

K. B. AL-JAABARI
M. M. QUEISI
S. AL-ZABEN
M. B. ABU-ZAID
S. O. AMARIN

Jordan Society for Medical Laboratory Sciences

Introduction

Vitamin D is a group of fat soluble prohormones. The two major forms of which are vitamin D₂ (or ergocalciferol) and vitamin D₃ (or cholecalciferol). The term vitamin D also refers to metabolites and other analogous of these substances (1). Vitamin D is synthesized from 7-dehydrocholesterol in the skin exposed to sunlight, especially ultraviolet B radiation (2, 3, 4). Vitamin D plays an important role in the maintenance of organ system (5). It regulates the calcium and phosphorus levels in the blood by promoting re-absorption of calcium in the kidney. It is needed for bone growth and bone remodeling by osteoblasts and osteoclasts (6, 7). Vitamin D (D₂, D₃ and metabolites) is converted to 25-hydroxyvitamins (25-OH D) in the liver.

Vitamin D is now recognized as a factor which has multiple roles in maintaining optimal health (8, 11, 34, and 35). Serum concentration of 25 hydroxyvitamin D (25-(OH) D) is the best indicator of vitamins D status. It reflects vitamin D produced cutaneously and that obtained from food and supplements (9) and has fairly long half-life of 15 days (10). However, serum 25-(OH) D levels do not indicate the amount of vitamin D stored in other tissues. Therefore our study aims at assessing the prevalence of vitamin D deficiency among the Jordanian population especially those referred to the Royal medical services (RMS) clinics by measuring the levels of 25-(OH) D in their serum, because the measurement of circulating 25 (OH) D is becoming increasingly important

and the clinical demand for 25 (OH) D assay has risen substantially.

Methodology

This study has been conducted on the Jordanian population during the period between 2008 and 2012. A total of 882 subjects were included in our study, 742 were females and 140 were males, their age ranged between 18 and 70 years. Blood samples were drawn from all subjects and screened to determine the level of 25-Hydroxyvitamin D (25-(OH) D). We used LIASON 25 OH Vitamin D TOTAL assay from Diasorin company to measure the concentration of 25 (OH) D. This assay is a direct competitive chemiluminescence immunoassay (CLIA) for quantitative determination of total 25 OH vitamin D in serum or plasma.

Results

According to the review of the literature which suggests the classification of 25 OH Vitamin D status, which classify it into three categories, Vitamin D deficiency with <10 ng/ml (<25 nmol/ L), Vitamin D insufficiency with 10-30 ng/ml (75-250 nmol/L) and Vitamin D sufficiency with >100 ng/ml (>250 nmol). Our results revealed 440 Females with a prevalence of 59.3% are deficient for vitamin D, 135 females with a prevalence of 18.2% are insufficient for vitamin D and 58 males with a prevalence of 41% are insufficient for vitamin D. A total of

Prevalence of vitamin D deficiency among the Jordanian population

249 females and males out of 882 were sufficient for vitamin D with a prevalence of 28%. 167 were females with a prevalence of 22.5% and 82 male with a prevalence of 58.6%. The optimal level of 25-OH vitamin D is subject to some debate, but > 32 ng/ml (>80 nmol/L) is accepted as sufficient for bone for health (12-16,33), accordingly 633 out of 882 of the subject screened are vitamin D deficient with prevalence of 72%. The number of females deficient for vitamin D was 575 out of 742 with a prevalence of 77.5% among females, while 58 out of 140 of males were vitamin D deficient with a prevalence of 41% among males.

Discussion and Conclusion

A recent growing public health problem is vitamin D insufficiency. The assessment of vitamin D status, though the measurement of 25 (OH) D in serum or plasma, has received attention in the last decade. Several research studies have identified widespread vitamin D insufficiency in apparent healthy population world-wide (11-16), it is estimated that one billion people in the world are currently vitamin D deficient (19). In our study we have found a very high prevalence of vitamin D deficiency, particularly among females. Our investigation showed that 77.5% of the female were either deficient or insufficient of vitamin D, while among males the prevalence of vitamin D deficiency is 41% which is about two-fold lower than the female. The higher rate of deficiency in females compared to men may be associated with insufficient exposure of women to sunlight compared to men, in addition extensive covering with clothing and failure to spend time outdoor. In general deficiency of vitamin D can result from a number of factors including intake coupled with inadequate sunlight exposure, disorders that limit its absorption, conditions that impair conversion of vitamin D into active metabolites, such as liver or kidney disorders and body characteristics such as skin color and body fat (5). Deficiency results in impaired bone mineralization, and leads to bone softening disease (17,18,26) including Rickets, Osteomalacia, and Osteoporosis. As well as vitamin D

malnutrition may also be linked to an increased susceptibility to several diseases such as high blood pressure, tuberculosis, cancer, periodontal disease, multiple sclerosis, chronic pain, seasonal effective disease (20-25), peripheral artery disease (27,28,29) and several autoimmune diseases including type 1 diabetes (30). Vitamin D deficiency is very common, a recent survey in the UK showed that more than the half of the population in the UK has insufficient levels of vitamin D, in spring about 1 in 6 people has severe deficiency, it is also estimated that about 9 in 10 adults of South Asian origin may be vitamin D deficient (31), as well our investigation showed that vitamin D deficiency is common among the Jordanian population with high prevalence (72%). Most of affected people either don't have any symptoms, or have vague aches and pains, and unaware of the problem. Therefore it's important to screen all the population to identify them whether they are deficient or sufficient for vitamin D to avoid consequence complications of vitamin D deficiency.

Recommendation

Sun exposure is needed to maintain adequate blood levels of vitamin D, it has been suggested by some vitamin D researchers that 5-30 minutes of sun exposure between 10 AM and 3 PM at least twice a week without sunscreen usually lead to sufficient vitamins D synthesis. If one regularly avoided sunlight exposure, research indicates a necessity to supplement with at least 5,000 units (IU) of vitamin D daily (32). The best nutrition sources of D3 are only first primary salmon, tuna and mackerel (9). Vitamin D2's nutrition sources are from some vegetables, yeast and fungus. The vegetarian diet is abundant in the D2 (33-34). Additional information may be required for diagnosis, assay results should be utilized in conjunction with clinical laboratory data to assist the clinician in making individual patient management decisions in an adult population.

pratique quotidienne

References

1. "Dietary supplement Fact Sheet : Vitamin D". National institutes of health. Archived from the original on 2007-09-10.<http://www.webcitation.org/5R15u0LB5>. Retrieved on 2007-9-10.
2. Deluca HF, Zierold C. metabolisms and functions of vitamin D. *Nutr Rev* 1998; 56:54-10.(pubMed abstract).
3. Stolzenberg-Solomon RZ, Vieth R, Azad A, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, et al. A prospective nested case-control study of vitamin D status and pancreatic cancer risk in male smokers. *Cancer Res* 2006; 66:10213-9. (pubMed abstract).
4. Decula HF. Over view of general physiologic features and functions of vitamin D. *AmJ Clin Nure* 2004; 80:16895-965. (pubMed abstract).
5. Larry E. Johnson. Vitamin D in Merck Manual December 2012. www.merckmanuals.com
6. Van den Berg H. Bioavailability of vitamin D. *Eur J Clin Nutr.* 1997 Jan;51 Suppl 1:S76-9.
7. Cranny A, Horsley T, O'Donnell S, et al. "Effectiveness and safety of vitamin D in relation to Bone health" *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 2007 Aug;(158):1-235
8. Amas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:5387-91.
9. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference intakes: calcium, phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington, DC: National academy Press, 1997.
10. Jones G. The pharmacokinetics of vitamin D Toxicity. *Am J Clin Nutr.* 2008 Aug;88(2):582S-586S.
11. Hector F. Deluca, Ph.D. <http://lpi.oregonstate.edu/info-center/vitamins/vitaminD/>. Last updated 11/7/2008 copyright 2000-2009 Linus Pauling Institute
12. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-81.
13. Isaia G, Giorgino R, Rini GB, Bevilacqua M, Maugeri D, Adami S. Prevalence of hypovitaminosis in elderly women in Italy: clinical consequences and risk factors. *Osteoporos Int* 2003; 14:577-82.
14. Moussavi M, Heidarpour R, aminorroaya A, Pournaghshband Z, Amini M. Prevalence of vitamin D deficiency in Isfahani high school students in 2004. *Horm Res* 2005;64:144-8.
15. Nesby-O Dell S, Scanlon KS, Cogswell ME, Gillespie C, Hollis Bw, Looker AC. Et al. hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age : third National Health Examination survey. 1988-1994. *Am J Clin Nutr* 2002 : 76:187-92
16. Vieth R, Cole DF, Hawker GA, Trang HM, Rubin LA. Winter vitamin D insufficiency is common in young Canadian women. And their vitamin D intake does not prevent it. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55: 1091-7
17. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Giovannucci E, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Fracture prevention with vitamin D supplementation : a meta-analysis of randomized controlled trails, *JAMA* 2005;293:2257-64.
18. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S. et al. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *N Eng J Med* 1992; 327: 1637-42
19. Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altren Med Rev* 2005 Jun 10(2): 94-111.
20. A Natural Standard Research Collaboration (2008-03-01). "Vitamin D". http://www.mayoclinic.com/health/vitamin-d/NS_patient-vitamin-d. Retrived on 29 November 2008.
21. Gloth, FM 3rd, Alam, W, Hollis, B. Vitamin D versus broad spectrum phototherapy in the treatment of seasonal affective disorder. *J Nutr Health Aging.* 1999. 3(1):5-7.
22. Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED. Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-years prospective study. *Lancet* 1989; 2: 1176-8
23. Tretli S, Hernes E, Berg JP, Hestvik UE, Rohsham TE. Association between serum 25 (OH) D and death from prostate cancer. *Br J Cancer* 2009, 100:450-4
24. Kimball SM, Ursell MR, O'connor P, Vieth R, Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr* 2007;86:645 - 51

Prevalence of vitamin D deficiency among the Jordanian population

25. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A, Serum 25, hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis JAMA 2006;296:2832-8.
26. Grant WB, Holick MF. "Benefits and requirements of vitamin D for optimal health : a review". *Altern Med Rev.* 2005 Jun;10(2):94-111.
27. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson F, Lanier K. et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008 ; 117:503-11
28. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men : a prospective study. *Arch Intern Med* 2008; 168: 1174-80.
29. Meland ML, Muntner P, Michos ED, et al (2008). Serum 25 OH hydroxyvitamin D levels and the prevalence of peripheral Arterial disease, Results from NHANES 2001 to 2004. *Arterioscler, Thromb. Vasc. Biol.* 28: 1179. Doi: m10. 1161/ATVBAHA. 108.165886. PMID
30. Travera-MMendoza, Luz E. and White, John H. Cell Defenses and Sunshine Vitamin. *Scientific American*, November 2007, p:62-72
31. Primary vitamin D deficiency in children. *Drug and therapeutics Bulletin* 2006; 44 (2): 12-16
32. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Eng J Med* 2007; 357:266-81. (PubMed Abstract).
33. Prentice A. Vitamin D deficiency : a global perspective. *Nutr Rev.* 2008 Oct;66(10 Suppl 2):S153-64.
34. Trang HM, Cole DF, Rubin LA, Pierratos A, Siu S, Vieth R. Evidence that vitamin D3 increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiency than does vitamin D2. *Am J Clin Nutr* 1998;68:854-8.

RTBC

Activités de la STBC

Le bureau de la STBC est heureux d'annoncer que le programme scientifique de l'année 2012 a atteint un degré de réalisation très élevé (15 sur 16 activités programmées).

En complément des JNBC 2012 avec ses deux ateliers satellites : «le cours de Biologie Moléculaire» et «l'atelier sur la rédaction médicale», le programme scientifique a comporté un atelier sur «le spermogramme» réalisé à trois reprises en raison de la forte demande (deux à Tunis et une aux îles Kerkennah).

Il a également comporté les séminaires ateliers suivants : Les Tests Rapides en Microbiologie (Tunis), la mise en place du système documentaire dans un laboratoire d'analyse de biologie médicale selon le GBPL et la norme ISO 15189 (Hammamet), les hémoglobinopathies (Tabarka), l'Hémostase (Gafsa), Le contrôle interne de la qualité des examens biochimiques (Gabès), les leucémies aiguës (Tunis), les aspergilloses (Tunis), les dysthyroïdies (Tunis) et identification des parasites fécaux (Monastir).

D'autre part, un atelier destiné aux techniciens supérieurs portant sur le diagnostic microbiologique des infections sexuellement transmises, a été organisé dans le cadre du projet Global fund, à Mahdia.

Pour toutes ces activités la participation des biologistes a atteint des degrés très satisfaisants et notamment parmi les jeunes.

De même, il est à noter que plus de la moitié des activités ont eu lieu dans les régions (en dehors de la capitale) et ont eu un succès très encourageant.

Le programme scientifique 2013 a été élaboré dans le même esprit que celui de 2012, et le début de réalisation est en train de respecter les différentes échéances.

D'un autre côté, le Bureau de la STBC a déjà mis en place trois groupes de travail chargés d'établir des recommandations sur les thèmes d'actualité suivants :

1. Papilloma virus : état des lieux et implication dans le cancer du col de l'utérus
2. Chlamydia et Mycoplasma
3. Standardisation du dosage de la créatinine.

Des groupes de travail concernant d'autres thèmes, vont être constitués prochainement. Plus d'informations sur cette expérience vous seront communiquées ultérieurement.

RTBC

Agenda des manifestations scientifiques

MAGHREB PHARMA

Centre de Convention de Oran - Algérie
Du 01 octobre 2013 au 03 octobre 2013
www.maghrebpharma.com

La Première Ecole d'Immunogénétique

Faculté des Sciences de Rabat - Maroc
Du 02 octobre 2013 au 06 octobre 2013
www.fsr.ac.ma

10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers

Du 02 octobre 2013 au 05 octobre 2013
www.immem-10.org
Paris - France

16^{ème} Congrès International de Métrologie Paris - France

Du 07 octobre 2013 au 10 octobre 2013
www.metrologie2013.com

BIOTECHNICA 2013

Hanovre - Allemagne
Du 08 octobre 2013 au 10 octobre 2013
www.biotechnica.de

6th international Forum of laboratory Complex - LABcomplex KIEV - UKRAINE

Du 15 octobre 2013 au 17 octobre 2013
www.labcomplex.com

4^{ième} Forum Africain de Métrologie

Libreville - Hôtel Méridien Re-ndama - Gabon
Du 28 octobre 2013 au 31 octobre 2013
www.ac-metrologie.com

58^{ème} Edition JIB - Journées Internationales de Biologie

Du 13 novembre 2013 au 15 novembre 2013
www.jib-sdbio.fr Paris - France

SALON MEDICA 2013

Du 20 novembre 2013 au 23 novembre 2013
www.promessa.com
Dusseldorf - Allemagne

Actualités sur le Diagnostic des Pathologies Humaines liées aux Virus Emergents

20 novembre 2013
www.sfm-microbiologie.org
ASIEM, Paris - France

RICAI 2013

33^e Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse
du 21 au 22 Novembre 2013
www.ricai.org

Génomique et Résistance Nosocomiale

Auditorium C.I.S, Institut Pasteur, Paris - France
04 décembre 2013
www.sfm-microbiologie.org

APCCB 2013 - 13th Congress of the Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine

2013 - Oct 6-9; Bali, Indonesia
www.apfcbcongress2013.org

COLABIOCLI 2013 - XXI Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica

2013 - Oct 29-Nov 1; Lima, Perou
www.ifcc.org

2014 - Feb 6-7

Labquality Days
2014 - June 20-22
www.labquality.fi
Helsinki, Finland

XIII International Congress of Pediatric Laboratory Medicine

2014 - June 22-26
www.icplm2014.org
Istanbul, Turkey

WorldLab 2014 - 22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

2014 - June 21-25
www.istanbul2014.org
Istanbul, Turkey

EuroMedLab 2015 - 21th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

www.ifcc.org
Paris, France

instructions aux auteurs

La Revue Tunisienne de Biologie Clinique (RTBC) est publiée par la Société Tunisienne de Biologie Clinique. Les sujets publiés se rapportent à tous les aspects de la Biologie Clinique de toutes disciplines et tout mode d'exercice. La revue publie des articles originaux, des revues générales, des notes de pratique quotidienne ou de formation continue, des revues de presse ou de livres et des lettres à la rédaction. Toutes les publications se font en français, en anglais ou en arabe et doivent être obligatoirement accompagnées d'un résumé en anglais (Les lettres à la rédaction, les revues de presse ou de livres ainsi que les notes, ne requièrent pas de résumé).

Les manuscrits soumis à la revue ne doivent pas avoir fait l'objet de publication antérieure (en dehors des thèses, mémoires, ou abstracts). Les manuscrits sont soumis à aux moins deux lecteurs anonymes sélectionnés par le comité de rédaction.

Si des corrections sont demandées aux auteurs, la version corrigée doit être soumise de nouveau à la rédaction dans un délai ne dépassant pas 2 mois. Elle doit être accompagnée d'une version sur disquette informatique (logiciel word).

Une fois accepté, le manuscrit ne peut être publié dans une autre revue sans l'autorisation préalable de la RTBC.

Recommandations générales

• Soumission des manuscrits

Les manuscrits sont adressés en 3 exemplaires (y compris les illustrations) au rédacteur en chef, à l'adresse suivante :

Revue Tunisienne de Biologie Clinique

Résidence Tunis Carthage - Appartement C10 Borj Baccouche

2027 - Ariana Tunisie

Tél/Fax. : (+216) 71 709 647

E-mail : contact@stbc.org.tn - chiheb.rayana@rns.tn

Les manuscrits doivent être accompagnés d'une lettre précisant la rubrique à laquelle les auteurs désirent voir apparaître leur manuscrit et les engageant quant à la non soumission à une autre revue. Cette lettre doit porter la signature de tous les auteurs.

• Préparation des manuscrits

Les manuscrits doivent être rédigés en interligne 1,5, taille des caractères : 12, sur du papier format A4, en recto uniquement.

Laisser une marge de 2,5 cm des 4 côtés de la page.

Mettre les références, les tableaux et les figures sur des pages séparées du texte. Toutes les pages doivent être numérotées, en commençant par la page de titre. Les différentes sections du manuscrit doivent répondre aux recommandations suivantes :

page de titre comportant

- le titre de la publication, reflétant son contenu (2 lignes maximum)
- les noms et prénoms des auteurs, ainsi que les adresses professionnelles des équipes (lorsqu'il existe plus d'un laboratoire d'origine, indiquer en "exposant" après chaque nom, le numéro du laboratoire correspondant).
- une adresse de correspondance avec N° de téléphone. Fax et E-mail.

résumé et mots clés

- Le résumé consiste en un paragraphe unique comportant moins de 200 mots.
- Aucune abréviation ni référence ne doivent apparaître dans le résumé.
- Le résumé est suivi d'une série d'au maximum six mots clés.

remerciements

Les remerciements éventuels sont placés à la fin du texte, avec un caractère différent.

références (1)

Les références sont numérotées par ordre d'apparition dans le texte et présentées selon le modèle suivant :

- **Pour les articles de revues** : Noms des auteurs suivis des initiales des prénoms. Titre de l'article dans la langue d'origine. Nom abrégé

de la revue année ; volume : première et dernière page de l'article.

Exemple : Boscato LM, Stuart MC. Incidence specificity of interference in two-site immunoassays. Clin Chem 1986 ; 32 : 1491-5.

(1) : *International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. N Engl J Med 1991 ; 324 : 424-8.*

- **Pour les articles de livres** : Noms des auteurs de l'article suivis des initiales des prénoms. Titre de l'article dans la langue d'origine.

In : noms et initiales des auteurs de l'ouvrage. Titre du livre. Ville, éditeur, année de publication : première et dernière page de l'article.

Exemple : Kohn RR. Aging and age related disease : Normal processes. In : Johnson HA. Relation Between Normal Aging and Disease. New York, Raven Press, 1985: 1-44.

- **Pour un livre** : Noms des auteurs suivis des initiales des prénoms. Titre du livre. ville, éditeur, année de l'édition : nombre de pages ou les pages exactes à consulter (la 1^{ère} et la dernière).

Exemple : Forbes GB. Human body composition. New York : Springer Verlag, 1987 : 27.

tableaux et figures

Ils sont présentés sur des pages séparées du texte et numérotés respectivement en chiffres romains et arabes.

Ils sont accompagnés de titres et de légendes suffisamment clairs et explicites.

abréviations

Tout sigle ou abréviation nécessaire doit être explicité à sa première apparition dans le texte.

Rubriques

• Editorial

Habituellement écrit à la demande du Comité de Rédaction, sur une question «d'actualité», par un auteur qui fait autorité sur le sujet. Il doit être court, de l'ordre de cinq pages dactylographiées et comporter moins de 10 références bibliographiques.

• Revues générales

Elles ont pour objet de présenter une mise au point des connaissances et de souligner les acquisitions récentes.

Les revues générales sont normalement publiées sur invitation du comité de rédaction. Toutefois, des suggestions au rédacteur en chef peuvent être avancées.

Les recommandations de la rédaction sont identiques à celles concernant les articles originaux.

• Articles originaux

Ils ont pour objet de présenter un travail original se rapportant à la résolution de problèmes en pathologie humaine et où la biologie tient une place prépondérante.

Le nombre de pages est limité à 15, illustrations, références et résumé compris.

Ils doivent comporter les sections suivantes dans l'ordre : titre, résumé, mots clés, introduction, matériel et méthodes, résultats, discussion, remerciements (éventuellement), références, tableaux et figures.

• Lettres à la rédaction

Cette rubrique permet aux lecteurs de réagir à propos d'un article paru dans la RTBC, d'une nouveauté ou d'un événement en biologie clinique. La lettre doit être concise (moins de 750 mots, références comprises). Une figure ou un tableau peut y être inclus.

• Notes de pratique quotidienne

Il s'agit d'un espace réservé à des articles courts consacrés à l'exercice quotidien de la biologie (évaluation technique et réactovigilance, cas cliniques, valeur sémiologique des analyses, organisation et gestion des laboratoires,...). Ces articles doivent comporter moins de 1500 mots, 2 tableaux ou figures au maximum, et moins de 15 références.

STBC*Société Tunisienne
de Biologie Clinique*

Programme Scientifique 2013

Date / Lieu	Thème	Coordinateurs
Vendredi 25 Janvier 2013 - Gabès	Hémostase et Sida	<i>B. Nciri / T. Messaoud</i>
Vendredi 22 Février 2013 - Gafsa	Stratégie diagnostique des anémies	<i>T. Messaoud / B. Nciri / S. Omar</i>
Vendredi 29 et Samedi 30 Mars 2013 Hammamet	Spermogramme	<i>G. Merdassi / H. Ben Aribia</i>
Vendredi 19 Avril 2013 - Sousse	Difficultés analytiques et d'interprétation en immuno hématologie	<i>S. Hmida</i>
9, 10 et 11 Mai 2013 - Hammamet	JNBC 2013	<i>STBC</i>
Vendredi 28 Juin 2013 - Kairouan	Leishmanioses	<i>N. Nabli / K. Mehdouani / A. Bouratbine</i>
Vendredi 27 Septembre 2013 - Tunis	Initiation à l'utilisation de la biologie moléculaire en biologie clinique	<i>F. Ben Hassine / G. Merdassi</i>
Vendredi 25 Octobre 2013 - Jendouba	Contrôle de qualité interne en biochimie	<i>C. Ben Rayana / G. Merdassi / A. Ghanem</i>
Vendredi 29 Novembre 2013 - Tunis	Test Post Coïtal	<i>F. Ben Hassine</i>
Vendredi 06 Décembre 2013 - Tunis	Difficultés analytiques et d'interprétation en immuno hématologie	<i>S. Hmida</i>

Adresse : Résidence Tunis Carthage - Appartement C10
Borj Baccouche - 2027 Ariana - Tunisie

Secrétariat STBC
Tél/Fax. : (+216) 71 709 647
contact@stbc.org.tn

www.stbc.org.tn