



Faculté de Médecine de Sfax



# Journal de l'Information Médicale de Sfax

J

## *Sommaire*

Mises Au Point .....	1 – 16
Articles Originaux.....	17– 54
Etudes Expérimentales.....	55 – 80

J

M

SFAX

N° 21/22  
JUN 15 / DEC 15

e-mail : [jimsfaxfms@gmail.com](mailto:jimsfaxfms@gmail.com)

Site Web : [www.fmsf.rnu.tn](http://www.fmsf.rnu.tn)

**Directeur de publication**

Jalel Gargouri

**Rédacteur en chef**

Jalel Gargouri

**Rédacteurs en chef adjoints**

Najmeddine Affes, Karim Rekik,

Mohamed Zribi

**Comité de Rédaction et de Lecture**

Dorra Abid, Leila Abid, Jihene Aloulou, Ali Amouri, Ikram Ben Amor, Kais Chaabene, Fatma Cheikhrouhou, Imed Gargouri, Lamia Gargouri, Sameh Ghroubi, Sondos Haddar, Mourad HajSlimen, Ahmed Hakim, Bouthaina Hammami, Mahmoud Kharrat, ZouhairKhemakhem, Hela Mnif Trigui, Chakib Marrekchi, Zied Triki et Sourour Yaich.

**Attachée de rédaction**

Amira Feki

**Traduction**

- **Arabe** : Jalel Gargouri, Zouhair Khemakhem

- **Français** : Jalel Gargouri, Karim Rekik

- **Anglais** : Imen Ben Ghozlen

**JUIN 15/DEC 15**

**Le Journal de l'Information  
Médicale de Sfax**

J. I. M.

Sfax

Organe de l'ADSM

VISA : 1048 du 12 Août 2008

**Le Journal de l'Information  
Médicale de Sfax**

N'est pas responsable des textes, illustrations, photos et dessins publiés qui engagent la seule responsabilité de leurs auteurs. Les documents reçus ne sont pas rendus et leur envoi implique l'accord de l'auteur pour leur libre publication.

**- MISE AU POINT**

\* Les soins palliatifs en cardiologie

F. Triki et al. 1

\* Methylation des promoteurs de gènes associés a la cancérogenèse colorectale : Impact clinique et pronostic pour des patients tunisiens

R. Abdelmaksoud-Dammak et al. 8

**- ARTICLES ORIGINAUX**

\*Choléstéatome iatrogène après myringoplastie

R.Hammami et al. 17

\*Infarctus inferieur du myocarde: quels paramètres echo cardiographiques peut-on retenir pour déterminer une extension ischémique au ventricule droit ?

R.Hammami et al. 21

\*Is redo mitral balloon valvuloplasty as safe and efficient as a first procedure?

D. abid et al. 34

\*Mutations du gène kras chez les patients du sud tunisien atteint de cancer colorectal: signification clinique

R. Abdelmaksoud-Dammak et al. 39

**- ARTICLES ORIGINAUX**

\*La réparation des traumatismes dorsolombaires, en droit tunisien: a travers une étude de 100 expertises

Z. Khemakhem et al. 45

\*Médecine et droit de l'homme en tunisie et en droit compare

Z. Khemakhem 49

**- ETUDE EXPERIMENTALE**

\*Effet de l'association du verre bioactif avec la biomolécule du chitosane sur la consolidation osseuse chez la ratte ostéoporotique

S. Jebahi et al. 55

\*Application du verre bioactif poreux dans la bio-orthopédie; étude expérimentale chez la ratte *wistar* ostéoporotique

S. Jebahi et al. 60

\*Etude comparative de la cinétique de consolidation osseuse entre deux céramiques différentes, hydrox apatite carbonatée et verre bioactif, chez le lapin blanc de race néo-zélandaise

S. Jebahi et al. 67

\*Impact de deux plantes halophytes sur l'hépto toxicité induite par le plomb chez le rat male adulte

M. Gargouri et al. 72

## **EDITORIAL**

Le JIM Sfax est né en 1998. C'était un défi de taille au vu des moyens dont nous disposions... Il a permis de faciliter la publication à beaucoup de jeunes et l'accès à l'information scientifique aux apprenants : revues générales, mises au point et surtout questions de résidanat.

Après une période d'absence, nous revoilà... La Tunisie est passée par une période très difficile qui n'a pas manqué de faire des dégâts, même au niveau du moral des uns et des autres de l'équipe du JIM Sfax.

Ce redémarrage est né d'une grande volonté d'aller de l'avant et d'une envie de vaincre les difficultés. C'est ainsi que nous avons renforcé l'équipe en désignant 3 rédacteurs en chef adjoints et un Comité de rédaction et de lecture bien fourni où la plupart des spécialités sont représentées. Il en est de même pour l'aspect linguistique des textes (Arabe, Français et Anglais) dont la vérification a été confiée à un groupe de volontaires.

Fidèle à l'esprit de ceux qui l'ont lancé et qui le soutiennent, ce journal s'est voulu gratuit pour encourager la diffusion de l'information scientifique. La rédaction autorise, ainsi, toutes les reproductions partielles ou totales dès lors qu'elles ne sont pas contraires à la législation du pays concerné.

Nous espérons pouvoir répondre aux besoins des utilisateurs du journal, qu'ils soient apprenants ou chercheurs et restons ouverts à leurs suggestions et propositions.

**La rédaction**

# LES SOINS PALLIATIFS EN CARDIOLOGIE

FATEN TRIKI, RANIA HAMMAMI, DORRA ABID, SAHER BELKAHLA, RAHMA KALLEL,  
MOURAD HENTATI, SAMIR KAMMOUN

*Service de Cardiologie de SFAX*

## 1- INTRODUCTION

Les soins palliatifs (SP) sont des soins donnés aux malades dont l'affection ne répond pas au traitement curatif, elles ont été créées initialement avec la maladie cancéreuse. Les soins palliatifs en cardiologie est une notion assez récente nait en 2005, la cardiologie qui est une spécialité connue par ses soins intensifs, son progrès en matière de traitement curatif et du domaine interventionnel trouvera des obstacles à admettre des patients en soins palliatifs. Ce travail a pour but de répondre à certaines questions: pour quel patient en cardiologie on offre les soins palliatifs, quels sont les objectifs de ces soins chez ce type de patient et qui va donner ces soins ?

## 2- DEFINITION DES SOINS PALLIATIFS

Ils sont définis par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 2002 « Les soins palliatifs cherchent à améliorer la qualité de vie des patients et de leur famille, face aux conséquences d'une maladie potentiellement mortelle, par la prévention et le soulagement de la souffrance, identifiée précocement et évaluée avec précision, ainsi que le traitement de la douleur et des autres problèmes physiques, psychologiques et spirituels qui lui sont liés. Les soins palliatifs procurent le soulagement de la douleur et des autres symptômes gênants, soutiennent la vie et considèrent la mort comme un processus normal, n'entendent ni accélérer ni repousser la mort, intègrent les aspects psychologiques et spirituels des soins aux patients, proposent un système de soutien pour aider les patients à vivre aussi activement que possible jusqu'à la mort, offrent un système de soutien qui aide la famille à tenir pendant la maladie du patient et leur propre deuil, utilisent une approche

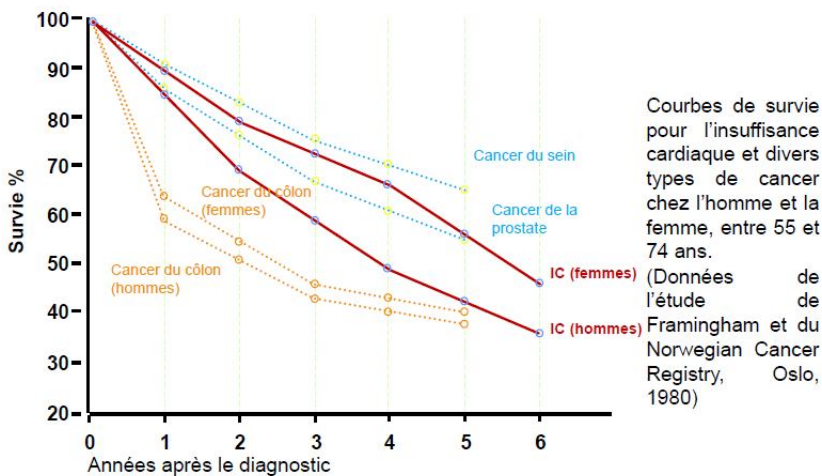
d'équipe pour répondre aux besoins des patients et de leurs familles en y incluant si nécessaire une assistance au deuil, peuvent améliorer la qualité de vie et influencer peut-être aussi de manière positive l'évolution de la maladie, sont applicables tôt dans le décours de la maladie, en association avec d'autres traitements pouvant prolonger la vie, comme la chimiothérapie et la radiothérapie, et incluent les investigations qui sont requises afin de mieux comprendre les complications cliniques gênantes et de manière à pouvoir les prendre en charge ».

## 3- POUR QUEL PATIENT EN CARDIOLOGIE ON PROPOSE LES SOINS PALLIATIFS ?

Ainsi définis les soins palliatifs concernent les patients atteints de maladie grave et incurable qui sont théoriquement en fin de vie. En cardiologie c'est l'insuffisance cardiaque (IC) qui répond à ces caractéristiques, elle est même appelée « le cancer du cœur » par certains praticiens vu son issue souvent fatale malgré les progrès des thérapeutiques pharmacologiques et non pharmacologiques. L'insuffisance cardiaque présente un syndrome clinique complexe du à un désordre structurel ou fonctionnel du cœur. Sa prévalence est de 23 million dans le monde entier (1). Elle est reconnue comme l'un des plus importants problèmes de santé publique, tant en termes de morbidité, de mortalité, que de coût pour la société. Avec des populations vieillissantes dans les pays industrialisés, l'insuffisance cardiaque risque de compter parmi les problèmes de santé publique majeurs encore longtemps. A partir des données de l'étude de Framingham (2) le risque de développer une

insuffisance cardiaque sur la vie entière avoisine les 20% après 40 ans. On sait que le risque de décéder d'une insuffisance cardiaque est plus important que celui de décéder d'un cancer du côlon, de la vessie, ou de la prostate chez les hommes (figure 1) (3). Elle est la première cause d'hospitalisation chez les patients de plus de 65 ans, elle est responsable de 20 à 30% des hospitalisations en cardiologie et elle est la cause de 50% de réhospitalisation dans les six mois (4). En terme de mortalité, l'insuffisance cardiaque représente la deuxième cause de mortalité chez les hommes de plus de 65 ans après le cancer pulmonaire et dans les stades les plus avancés, la mortalité peut atteindre 50% à 5 ans (1). Environ 10 % des patients en insuffisance cardiaque souffrent d'une forme grave de la maladie.

Les différentes dénominations de ce tableau clinique nous rappellent que le pronostic des malades est engagé à court terme (IC terminale), qu'il s'agit souvent du résultat d'une aggravation progressive et sur le long terme des malades (IC avancée) et qu'aucun traitement curatif n'est aujourd'hui identifié (IC réfractaire). Ce stade terminal de la maladie est un tableau sémiologique d'apparition récente consécutif à l'émergence d'une population de grands vieillards fragiles poly pathologiques et à cause de la prolongation des pathologies cardiovasculaires jusqu'à des stades ultimes en raison des progrès de prise en charge ces dernières années. C'est à ce stade là de la maladie que les soins palliatifs trouvent toute leur place pour accompagner des patients en fin de vie.



**Figure 1** : Courbe de survie de l'IC et divers types de cancer

#### 4- LES OBSTACLES AUX SOINS PALLIATIFS EN CARDIOLOGIE

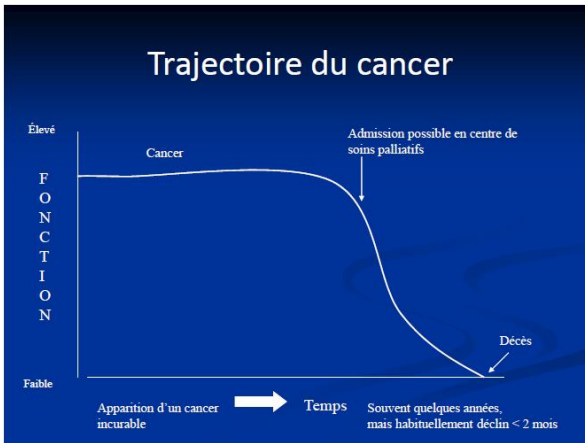
En effet, il n'existe pas de « marqueurs » pour la fin de vie du patient atteint d'insuffisance cardiaque. Il est donc difficile pour les cardiologues de définir précisément à quel moment les traitements ne seront plus efficaces et combien de temps, de jours, de semaines il reste à vivre à leurs patients. Il n'existe pas de critères officiels pour identifier un patient en insuffisance cardiaque avancée. Les recommandations (5, 6) et conférences de consensus (7, 8) des Sociétés savantes définissent ces patients selon des critères distincts (tableau 1). Plusieurs éléments semblent néanmoins incontournables :

- une augmentation permanente des pressions de remplissage cardiaque qui peut être objectivée par le cathétérisme cardiaque, l'échographie ou le dosage sanguin des peptides natriurétiques,
- la limitation fonctionnelle objectivée par un pic  $VO_2 < 12 \text{ mL/min/kg}$ , un test de marche en 6 minutes  $< 300 \text{ m}$  ou le recours à des hospitalisations itératives pour décompensation,
- la persistance des symptômes d'insuffisance cardiaque malgré un traitement optimal incluant l'obtention d'une euvoémie.

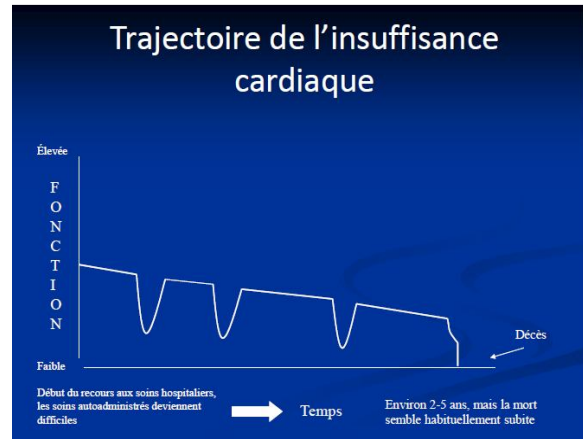
Mais le problème qu'il est quasi impossible de prédire la mortalité à 6 ou à 12 mois, avec une incidence très élevée de mort subite qui peut aller jusqu'à 25 à 50%. A cause de cette imprévisibilité de la trajectoire de la maladie il persiste toujours une incertitude pronostic devant l'insuffisance cardiaque même au stade terminal. A la différence du cancer où on arrive à identifier les signes de fin de vie, dans l'insuffisance cardiaque il y a peu de symptômes spécifiques à la fin de vie avec une trajectoire « en dent de scie » (figure 2 et 3). L'étude SUPPORT (9) a porté sur plus de 1 000 malades hospitalisés pour insuffisance cardiaque en stade IV de la NYHA. Un des paramètres analysés était l'évaluation par le médecin du pronostic vital du patient. Pour 8 malades décédés sur 10, un pronostic vital de plus de 6 mois avait été établi dans les 3 jours précédant le décès du patient. Les très nombreux marqueurs prédictifs cliniques, échographiques et biologiques dont nous disposons actuellement restent donc finalement peu efficaces dans l'insuffisance cardiaque avancée, ne permettant pas de donner une estimation précise du pronostic vital individuel à court ni à moyen terme.

**TABLEAU1: DEFINITION DE L'IC AVANCEE**

ACC/AHA	Symptômes d'insuffisance cardiaque au repos ou pour une activité minimale. Explorations diagnostiques complètes y compris identification des facteurs de comorbidité. Traitement médical maximal.
Consensus d'experts américains	Dysfonction cardiaque importante. Symptômes sévères incluant dyspnée, asthénie, signes de bas débit cardiaque de repos ou pour une activité minimale. Traitement médical maximal.
ESC	Patients symptomatiques restant en stade IV de la NYHA. Exploration diagnostique complète. Traitement médical optimal.
Groupe de travail de la "Heart failure association" de l'ESC	Symptômes sévères (NYHA III ou IV). Antécédents d'épisodes de décompensation cardiaque : rétention hydro-sodée, bas débit périphérique. Dysfonction cardiaque sévère (un au moins des signes suivants) : <ul style="list-style-type: none"> <li>&gt;&gt; FEVG <math>&lt; 30 \%</math>.</li> <li>&gt;&gt; Flux Doppler diastolique transmitral de type restrictif ou pseudo-normal.</li> <li>&gt;&gt; Elévation des pressions de remplissage ventriculaire (VG et/ou VD).</li> <li>&gt;&gt; Elévation du taux sanguin de BNP.</li> </ul> Altération sévère des capacités d'effort (un au moins des signes suivants) : <ul style="list-style-type: none"> <li>&gt;&gt; Incapacité de produire le moindre effort.</li> <li>&gt;&gt; Test de marche en 6 minutes <math>&lt; 300 \text{ m}</math>.</li> <li>&gt;&gt; Pic de <math>VO_2 &lt; 12-14 \text{ mL/kg/min}</math>.</li> </ul> Hospitalisation(s) pour insuffisance cardiaque dans les 6 derniers mois. Traitement médical optimal.



**Figure 2** : trajectoire du cancer : évolution au début en plateau puis entrée en phase terminale avec une courbe décroissante



**Figure 3** : trajectoire de l'IC : évolution imprévisible avec une courbe sinusoïdale faite de phases de décompensation réversibles

## 5- QUELS SONT LES SYMPTOMES DES PATIENTS IC EN FIN DE VIE ?

En cas d'IC avancée le tableau clinique est similaire à celui d'un patient atteint d'un cancer mais avec des symptômes plus intenses. Ce sont des symptômes marqués même au repos et réfractaire au traitement médical optimal (10).

Il existe néanmoins des critères permettant de reconnaître des patients à mauvais pronostic à court terme: des antécédents d'hospitalisation pour IC, une aggravation de l'IC sans cause identifiable, une aggravation sous traitement optimal de l'IC, une fonction rénale dégradée ou une poussée d'IC ne répondent pas au traitement diurétique et vasodilatateur dans un délai de 2 à 3 jours (12). En plus on connaît des manifestations cliniques classiques au stade avancée et terminale de l'IC (13), qui sont :

- **La dyspnée** : le plus important symptôme rapporté à ce stade. Elle donne une limitation importante de la capacité à l'effort et au repos même à la parole. Elle peut être due à une congestion vasculaire pulmonaire, à une arythmie, à une poussée d'ischémie myocardique, à une fatigue musculaire entrant dans le cadre de cachexie cardiaque comme elle peut être due à une anxiété ou à une maladie concomitante.
- **La douleur** : très fréquente à ce stade puisque 85% des patients en souffrent et elle est intense dans un tiers des cas (14). Les douleurs peuvent être de type angineux ou d'autres origines: douleurs de neuropathies diabétique, d'arthrose ou

douleur iatrogène suite à des interventions médicales. Elles sont souvent des « totalgies ».

- **Les œdèmes** : signes de défaillance cardiaque droite avec ascite et tableau d'anasarque.
- **La dépression** : assez fréquente, elle touche 21 à 36% des patients
- **La cachexie cardiaque** expliquée par un hyper métabolisme avec un syndrome inflammatoire (IL5) et des modifications hormonales avec surproduction de NO et apoptose des cellules musculaires secondaire à l'hypoxie. En plus le patient est souvent anorexique avec des problèmes de malabsorption.
- **Retentissement cérébral** : un syndrome dépressif est fréquent et il est prédictif de l'aggravation de l'IC, un dysfonctionnement sous cortical peut se voir aussi avec des troubles dysexécutifs, des troubles posturaux et une altération corticale. On peut avoir un syndrome démentiel ce qu'on appelle «démences circulatoires». A ce stade un syndrome confusionnel n'est pas exceptionnel avec parfois des comitialités.
- **Insuffisance rénale fonctionnelle** qui marque un tournant évolutif dans l'évolution d'une IC.
- **Manifestations digestives** : on peut voir une colite ischémique avec des douleurs abdominales intense. Une diarrhée ou un iléus paralytique sont notés mais plus fréquemment on constate une constipation. Des nausées et des vomissements sont très fréquents à ce stade. Le tout aggrave la malabsorption et majeure la dénutrition qui est marquante à ce stade.
- **La fatigue** : elle est multifactorielle

**Tableau 2 :** Tableau comparatif entre insuffisance cardiaque terminale et cancers (11)

	<i>Néoplasies</i>	<i>Insuffisance cardiaque</i>
Cédèmes	Rares, Par compression ou hypoprotéïnémie	Fréquents Par rétention hydrosodée
Anémie	Fréquente	Rare
Perçue par le malade comme	Très grave	Moins grave
Perçue par les soignants comme	Très grave	Moins grave
Pronostic	Prévisible	Imprévisible
Évolution	Progressive	Fluctuante
Phase terminale	Claire	Moins claire
Ordre NTBR*	Souvent discuté et inscrit	Rarement discuté et inscrit
Mort subite	Rare	Fréquente
Opiacés	Souvent utilisés	Rarement utilisés
* Not To Be Reanimated		

## 6- QUELS SONT LES OBJECTIFS DES SOINS PALLIATIFS DANS L'IC ?

Les soins palliatifs ont pour objectifs de contrôler les symptômes et d'optimiser la qualité de vie tout en faisant une approche globale du patient et de son entourage. Les soins palliatifs sont des soins actifs, continus, évolutifs, coordonnés et pratiqués par une équipe pluriprofessionnelle. Dans une approche globale et individualisée, ils ont pour objectifs de prévenir et soulager la douleur et les autres symptômes, prendre en compte les besoins psychologiques, sociaux et spirituels, dans le respect de la dignité de la personne soignée, de limiter la survenue de complications, en développant les prescriptions personnalisées anticipées, de limiter les ruptures de prises en charge en veillant à la bonne coordination entre les différents acteurs du soin. La démarche de soins palliatifs vise à éviter les investigations et les traitements déraisonnables tout en refusant de provoquer intentionnellement la mort. Il faut à ce stade de l'IC éviter les manœuvres de réanimation intempestive (intubation, mise sous drogue inotrope positif) et supprimer les thérapeutiques à visée préventive (Ex : nitrés, anticoagulants, statines...). L'environnement de l'insuffisant cardiaque doit être adapté en fonction des restants de ses aptitudes. Les soins sont centrés sur la communication « Demandez-Répondez-Demandez » : il faut demander ce que les patients comprennent et ce qu'ils désirent savoir et répondre

à leurs questions et clarifier les incompréhensions. Il faut donner l'information considérée comme essentielle à la prise de décisions sur les soins et demander s'ils ont des questions et confirmer ce qu'ils comprennent.

Dans le cadre de ces soins palliatifs il faut assurer une présence calmante avec le patient en fin de vie, le maintenir dans une posture en position assise à 45 degrés de préférence placé près d'une fenêtre ouverte. La pièce doit être aérée avec une direction de l'air sur l'ensemble du visage (la stimulation de la branche V2 du nerf trijumeau a des effets centraux inhibiteurs sur la dyspnée). Le patient sera mis sous oxygène en lunette sans surveillance de la saturation tout en maintenant l'humidité dans la pièce.

Il faut traiter les symptômes :

- **La douleur** : le maître symptôme à ce stade de la maladie, il faut une évaluation détaillée de la douleur (endroit, qualité, durée, facteurs d'aggravation et de soulagement, intensité et incidence sur les fonctions et la qualité de vie). Traitement de la cause sous-jacente si possible. Un traitement pharmacologique est nécessaire tout en respectant les paliers des antalgiques. Un soutien et un conseil psychologique, spirituel et émotionnel doivent accompagner les traitements contre la douleur. La douleur peut en effet être plus difficilement supportable si elle s'accompagne de culpabilité, de peur de la mort, de solitude, d'anxiété, de dépression. Il faut répondre aux questions et expliquer ce qui se passe pour soulager



la peur et l'anxiété. On peut utiliser des techniques de respiration profonde et de relaxation, à moins que le patient ne soit psychotique ou sévèrement déprimé. La distraction, l'utilisation de musique sont des moyens de relaxation efficaces (15).

- **Anxiété et dépression** : une évaluation du bien-être mental est à réaliser de façon régulière pour détecter et traiter précocement une éventuelle dépression et un état d'anxiété. Les opioïdes ou les benzodiazépines à action prolongée peuvent soulager l'anxiété nocturne.

- **Fatigue** : Traiter les facteurs traitables (anémie, hypokaliémie, hypomagnésémie et effets secondaires des médicaments). Les psychostimulants (exemple: méthylphénidate) peuvent être proposés. On peut constater les avantages en 1-2 jours.

- **Nausées anorexie** : pour y remédier il faut contrôler la dyspnée et la douleur. Il faut réviser la biochimie et la médication (ex : digoxine). Il faut évaluer l'apport alimentaire, envisager les suppléments et des stimulateurs de l'appétit.

- **Oedèmes** : il faut une détection précoce par une surveillance du poids. Les diurétiques sont maintenus jusqu'à la fin avec une restriction liquidienne et du sodium, mais prudente pour ne pas se balancer vers la déshydratation.

- **Dyspnée** : A ce stade la dyspnée est réfractaire au traitement habituel et à l'oxygénothérapie. Les opioïdes trouvent toutes leur place ici pour calmer ce symptôme. Leur rôle est bien établi dans les cas de dyspnée réfractaire (16). Ils diminuent la perception de la dyspnée centrale, ils diminuent l'anxiété liée à la dyspnée, la sensibilité à l'hypercapnie, la sensibilité à l'hypercapnie, la consommation d'oxygène et ils diminuent la pré et la post charge (en diminuant les reflexes vasculaires sympathiques par dilatation artériolaire et veineuse) (17). Il faut une titration progressive, une augmentation de 30% si nécessaire (2,5 à 5 mg toutes les 6 heures). La voie d'admission est orale de préférence. Exemple : Codéine 30-60 mg per os ou Morphine 2,5-5 mg po (18). La titration se fera selon l'effet ou les effets secondaires intolérables, on peut passer à une libération prolongée une fois que les symptômes sont contrôlés par une dose stable. Il faut accompagner le traitement d'un laxatif. Les effets indésirables des opioïdes sont la sédation, la confusion, les nausées (à prévoir et à traiter par métoclopramide, prochlorperazine et halopéridol), la constipation (une prescription de laxatifs impérative).

## 7- QUI PEUT DISPENSER SES SOINS PALLIATIFS ?

Ils doivent être dispensés par une équipe multidisciplinaire, comprenant des infirmières spécialisées, le médecin de famille qui s'avère le principal prestataire de soins de fin de vie selon une étude récente (19), le cardiologue et des professionnels de la santé associés (kinésie thérapeute, psychologue..) avec une équipe spécialisée en médecine palliative.

L'introduction des soins palliatifs doit se faire précocement en parallèle avec d'autres traitements initiés pour prolonger la vie des insuffisants cardiaques (médication, défibrillateur triple chambre, assistance ventriculaire, dialyse...). La décision d'impliquer les soins palliatifs devrait être basée sur une évaluation des symptômes et des besoins plutôt que sur une estimation pronostique. Sinon les patients et leurs parents risquent d'en être privés (20)

## 8- CONCLUSION

L'insuffisance cardiaque avancée est associée à un fardeau de symptômes (physiques, psychosociaux et spirituels) entraînant une souffrance globale et des symptômes similaires avec une intensité comparable au cancer. Il faut favoriser l'introduction précoce des soins palliatifs dans la trajectoire et ce parallèlement à d'autres traitements actifs. Des soins palliatifs adéquats exigent des traitements qui tiennent compte des besoins de la fin de vie. Les efforts de collaboration sont déterminants pour la mise en place de ses soins palliatifs. Les opioïdes gardent une place importante à ce stade de la maladie mais on aura besoin d'essais bien conçus. Dans notre contexte tunisien on a besoin de services spécialisés qui permettent d'instaurer des soins palliatifs à nos insuffisants cardiaques en fin de vie qui sont actuellement pris en charge dans des services de cardiologie ou confiés à leurs parents sans aucun soutien ni accompagnement.

## RÉFÉRENCES

- 1 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *European Heart Journal* (2012) 33, 1787–1847
- 2 Kannel WB, Ho K, Thorn T. Changing epidemiological features of cardiac failure. *Eur Heart J* 1994; 72 (suppl): S3-9
- 3 Norwegian cancer registry, Oslo 1980

- 4 Delahaye F. Epidemiology of heart insufficiency. *Ann Cardiol Angéiol (Paris)* 2001;50:6-11
- 5 HUNT SA. ACC/AHA2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult. *Circulation*, 2005; 112: e154-235
- 6 SWEDBERG K. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure : executive summary (update 2005). *Eur Heart J*, 2005 ; 26 : 1115-40
- 7 METRA M. Advanced chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*, 2007; 9: 684-94.
- 8 GOODLIN SJ. Consensus statement : Palliative and supportive care in advanced heart failure. *J Card Fail*, 2004 ; 10 : 200-9.
- 9 The SUPPORT Principal Investigators. A controlled trial to improve care for seriously ill hospitalized patients. The study to understand prognoses and preferences for outcomes and risks of treatments (SUPPORT). *JAMA*, 1995; 274: 1591-8.
- 10 Janssen D et al (2012) *journal of palliative medicine*, 15 : 447-456)
- 11 Réf 11. D. Schoevaerds, B. Choteau, P. Cornette, D. Vanpee, C. Swine, Place des soins palliatifs dans la prise en charge de l'insuffisance cardiaque terminale, *Louvain Médical*, 123, septembre 2004, 166-170
- 12 *European Journal of Cardiovascular Nursing* 2003; 2;213-17
- 13 Shah, Ankit B et al. *Reviews in cardiovascular medicine* (2013), 14 (1) 41-48) (Goodlin, SJ et al (2012). *Journal of cardiac Failure* 18(10): 776- 783
- 14 *Journal of the American Heart association* 2010, 120 : 2597-2606
- 15 Googlin *JACC* 2009 , 54: 386-396) (Jaarsma, *Europ J Heart Failure* 2009, 11: 433-443
- 16 *Cochrane Review* 2002, Jennings et autres. *Thorax*) (Abernethy et autres, *BMJ* 2003) (Oxberry et autres. *Eur J Heart Fail*. 2011;13:1006-12
- 17 Jennings. *Thorax*. 2002; Ahmedzai S. *Oxford textbook of palliative medicine*. 2e. 1998
- 18 Johnson et autres. *Eur J Heart Fail* 2002 Dec;4(6):753-6
- 19 Rutten. *Family Practice*. 2012
- 20 Mckelvie, RS et al (2011). *Canadian journal of cardiology* ; 27: 319-338

# METHYLATION DES PROMOTEURS DE GENES ASSOCIES A LA CANCEROGENESE COLORECTALE : IMPACT CLINIQUE ET PRONOSTIC POUR DES PATIENTS TUNISIENS

R. ABDELMAKSOU-DAMMAK <sup>1</sup>, A. SAADALLAH-KALLEL <sup>1</sup>, I. MILADI-ABDENNADHER <sup>1</sup>, A. KHABIR <sup>2</sup>,  
T. SALLEMI-BOUDAWARA <sup>2</sup> ET R. MOKDAD-GARGOURI <sup>1</sup>

*1 : Centre de Biotechnologie de Sfax, laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes, Sfax ;  
université de Sfax, BP"K"3038, Sfax –Tunisie.*

*2 : Service d'Anatomopathologie, CHU Habib Bourguiba, Sfax.*

## Résumé

Le cancer colorectal (CCR) résulte de l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques dans les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale. Les modifications épigénétiques, en particulier la méthylation des îlots CpG de l'ADN, sont reconnues comme des altérations moléculaires communes dans les tumeurs humaines. Des efforts considérables ont été déployés pour déterminer la cause et le rôle de la méthylation aberrante de l'ADN dans la cancérogenèse colique. Cette méthylation aberrante touche des gènes clés impliqués dans la transformation néoplasique des cellules et peut donc servir de biomarqueur pour la détection précoce de l'ADN tumoral dans les selles et le sang et comme un outil de suivi des patients atteints de CCR. Cette revue vise à résumer l'ensemble des résultats de l'étude de la méthylation d'ADN des patients du Sud Tunisien atteints de cancer colorectal sporadique, afin de mettre en évidence l'impact de cette méthylation aberrante sur la néoplasie colorectale. Nous avons trouvé des taux de méthylation variables ayant des corrélations significatives avec les paramètres clinicopathologiques et la survie des patients. En conclusion, nous avons identifié certains gènes qui pourront être utilisés comme marqueur de diagnostic et de pronostic du cancer colorectal chez les patients du sud tunisien.

**Mots Clés :** Cancer colorectal, Méthylation d'ADN, Paramètres cliniques, Sud Tunisien.

## Summary

Colorectal cancer (CRC) results from accumulation of genetic and epigenetic alterations in the intestinal mucosa. Epigenetic changes, including DNA methylation, are recognized as common molecular modifications in human tumors. Considerable efforts have been made to determine the cause and the role of aberrant DNA methylation in colon carcinogenesis. This aberrant methylation touches key genes involved in neoplastic transformation. The DNA methylation of specific promoters can be used as a biomarker for the early detection of tumor DNA in stool and blood and as a tool for monitoring patients with CRC. This revue aimed to summarize the results of the DNA methylation study of south Tunisian patients with colorectal cancer, to put in evidence the incidence of aberrant methylation of this colorectal neoplasia. We found variable rates of methylation with significant correlations with clinicopathological features and patients survival. In conclusion, we identified some genes that can be used as marker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer patients.

**Keywords:** Colorectal Cancer, DNA Methylation, Clinical Features, South Tunisia.

## INTRODUCTION

La cancérogenèse est un processus complexe, caractérisé par l'accumulation progressive d'altérations génétiques et épigénétiques qui résultent de l'instabilité du génome et qui conduisent à la dérégulation de l'expression de toute une cascade de gènes et de voies de signalisation. Ces changements aboutissent à l'obtention de cellules néoplasiques ayant acquis plusieurs avantages sélectifs [1, 2]. Le cancer colorectal apparaît suite à une série de changements histologiques, chacun étant accompagné de modifications génétiques spécifiques.

Dans le monde, près d'un million de personnes développent chaque année un cancer colorectal, et le taux de mortalité de la maladie avoisine les 33% [3]. Dans le Sud de la Tunisie, les CCRs sont assez fréquents chez l'homme, représentant 7,8% de tous les cancers. Ils occupent la 2<sup>ème</sup> position chez la femme et la 6<sup>ème</sup> place chez l'homme [4].

Les facteurs génétiques jouent un rôle prédominant dans la carcinogenèse colorectale [5]. Selon les incidences respectives et les caractéristiques moléculaires, les cancers colorectaux peuvent être classés en deux grandes catégories, à savoir les CCRs héréditaires et les CCRs sporadiques.

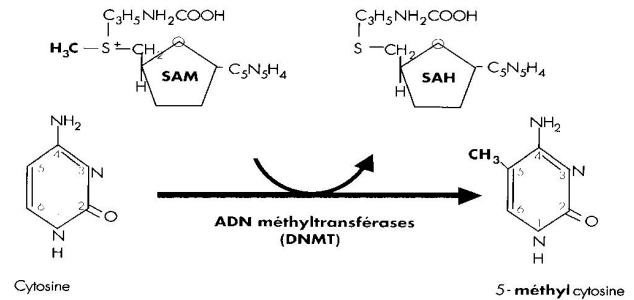
Les cancers sporadiques sont des cancers n'ayant pas de causes héréditaires mais apparaissant suite à des mutations somatiques touchant l'ADN des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale. En effet, plusieurs gènes ont été identifiés comme impliqués dans la carcinogenèse colique. Certains sont des oncogènes (KRAS, CTNNB1), d'autres sont des gènes suppresseurs de tumeur (APC, P53) ou des gènes de réparation de l'ADN (MLH1, MYH) [6]. A ces altérations génétiques s'ajoutent les facteurs environnementaux communs à une population donnée et d'autres propres à l'individu [7].

Avec l'augmentation de l'intérêt porté à l'épigénétique, il a été démontré que des phénomènes comme l'hyperméthylation des promoteurs des GSTs, l'hypométhylation globale de l'ADN ainsi que les modifications post-traductionnelles des histones ont une part importante dans le processus de cancérogenèse colorectale [8].

La méthylation de l'ADN est une modification chimique covalente, ayant pour résultat l'addition d'un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) sur un résidu cytosine. Elle se produit essentiellement sur les cytosines associées aux dinucléotides CpG, souvent localisées au niveau des promoteurs et des premiers

exons non codants d'environ 50% des gènes humains [9]. Cette réaction est assurée par les ADN méthyltransférases ou DNMT [Figure 1 ; 10].

**Figure 1 :** Réaction de méthylation de l'ADN



## L'HYPERMETHYLATION DES PROMOTEURS DE GENES DANS LE CCR :

Il est clairement admis que l'hyperméthylation des îlots CpG est considérée comme un événement majeur impliqué dans le processus de carcinogenèse. La recherche dans cette discipline a mis l'accent sur les GSTs en tant que cibles majeures de la méthylation. Dans cette revue, nous nous sommes intéressés à la modification épigénétique de différents gènes impliqués dans la transformation cellulaire comme les suppresseurs de tumeurs (p16INK4a, APC, WIF1, UCHL1), les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (MLH1), de l'apoptose (DAPK, RASSF1A et RARβ2) et de l'adhésion cellulaire (CDH1) [11-13].

### 1. Le gène RASSF1 (Ras-Associated domain Family 1):

Le gène RASSF1 est un suppresseur de tumeur localisé au niveau du bras court du chromosome 3 (3p21.3). Le rôle de RASSF1A est de moduler le cycle cellulaire et l'apoptose induite par l'activation de diverses voies de signalisation passant par la protéine oncogénique Ras [14]. Ce gène est souvent inactivé par hyperméthylation de son promoteur dans divers types de cancers tel que le cancer du poumon à petite cellule [15], le cancer du cavum [16] et le cancer du sein [17]. Inactivation de RASSF1A, associée à la méthylation aberrante de son promoteur, a été décrite dans un grand nombre d'échantillons colorectaux cancéreux et de lésions précancéreuses

et le taux de méthylation rapporté de ce gène dans les CCR varie entre 12 et 81 % [18].

## 2. Le gène *DAP-Kinase* (*Death-Associated Protein Kinase*):

La DAP-Kinase est une protéine pro-apoptotique qui joue le rôle d'un médiateur positif de l'apoptose passant par les récepteurs de mort et induite par le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et le récepteur Fas [19, 20]. Plus d'une centaine d'études ont rapporté une inactivation du gène codant la DAP-Kinase par hyperméthylation de son promoteur dans divers cancers, dont le CCR [21].

L'hyperméthylation de DAP-Kinase est détectable chez les patients atteints de CCRs sporadiques dans 53 à 81,2% des cas [22, 23].

## 3. Le gène *RAR $\beta$ 2* (*Retinoic Acid Receptor beta 2*):

Le gène *RAR $\beta$ 2* est un suppresseur de tumeur qui est sous-exprimé dans des lignées cellulaires de carcinome à cellules squameuses [24] et dans les tumeurs primaires du poumon, du sein, du nasopharynx, et du col de l'utérus [16, 25-27]. Dans le CCR, l'inactivation du promoteur *RAR $\beta$ 2* par hyperméthylation a été démontrée en premier lieu dans les cellules de cancer du côlon puis dans les tumeurs primaires ; ou il a été observé que la méthylation de *RAR $\beta$ 2* était plus élevée dans les tumeurs que dans les muqueuses normales associées et qu'elle est responsable de la perte de la protéine [28-30]. Le taux de méthylation rapporté dans la littérature est de l'ordre de 85% [31].

## 4. Le gène *CDH1* (*E-cadherin*):

La glycoprotéine transmembranaire E-cadherine, responsable de l'adhésion intercellulaire dépendante du calcium dans le tissu épithélial, joue un rôle important dans l'embryogenèse, la polarisation, la différenciation et la migration cellulaire [32]. Une dérégulation de l'expression du gène *CDH1* est souvent observée dans les tumeurs métastasées. Dans le CCR, le gène *CDH1* est méthylé dans 40 à 56% des cas [33,34].

## 5. Le gène *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*):

Le gène *APC* est un suppresseur de tumeur qui intervient entre autre dans la régulation du taux cytosolique de la  $\beta$ -caténine [35]. L'inactivation du

gène *APC* par mutation est l'aberration la plus communément observée dans les tumeurs colorectales. Plusieurs études ont montré que l'hyperméthylation du promoteur de ce gène peut entraîner sa perte d'expression dans les tumeurs qui ne présentent pas de LOH au niveau de ce locus, avec une fréquence qui varie entre 10 et 50% [36-39].

## 6. Le gène *MLH1* (*human MutL Homolog 1*):

Le gène *MLH1* code pour un membre du complexe de réparation des mésappariements au cours de la réplication de l'ADN [40]. Des mutations constitutionnelles de ce gène sont responsables du syndrome HNPCC [41]. Dans les cas de CCR sporadique, ce gène est inactivé par hyperméthylation de son promoteur dans 10 à 50% des cas [42-44]. Cet événement semble se mettre en place de façon précoce au cours de la carcinogenèse colorectale [45]. L'hyperméthylation du promoteur de *MLH1* est associée au phénotype MSI-H et à la mutation V600E de l'oncoprotéine *BRAF* [46].

## 7. Le gène *p16INK4a*:

*p16INK4a* est un inhibiteur *CDK4* (kinase dépendante de la cycline 4) qui agit spécifiquement sur la phase G1/S du cycle cellulaire par un contrôle négatif de l'état de phosphorylation de rétinoblastome [47]. La méthylation de *p16INK4a* a été rapportée à une fréquence de 7-53% dans des tumeurs malignes colorectales et dans 0-25% au niveau de la muqueuse colique normale [48-50]. Certaines études montrent que la méthylation de *p16INK4a* est un événement précoce lors de la carcinogenèse colorectale, tandis que d'autres suggèrent qu'il s'agit d'un événement tardif [51,52].

## 8. Le gène *WIF1* (*Wnt Inhibitory Factor 1*):

Le gène *WIF-1* est un suppresseur de tumeurs qui fonctionne en tant qu'inhibiteur sécrété de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Il a été démontré que l'expression du gène *WIF-1* est réprimée par méthylation de son promoteur dans différents cancers, notamment celui des poumons, de la prostate, de la vessie et du nasopharynx [53-55]. Le promoteur du gène *WIF1* est fréquemment méthylé dans les CCRs. Des études antérieures ont montré un taux de méthylation très élevé de ce gène, corrélé avec une perte de l'expression [56]. En effet, Lee et al. ont montré que parmi 7 promoteurs étudiés, la

méthylation de WIF-1 était la plus élevée (74%) dans une grande série de patients atteints de cancers colorectaux [57].

#### 9. *Le gène UCHL1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1):*

UCHL1 (ou PARK5/PGP9.5) est un membre de la classe UCH des enzymes de débubiquitination (DUBs), exprimé spécifiquement dans les neurones et représente 1 à 5% de toutes les protéines solubles du cerveau [58]. Le rôle exact de la protéine UCHL1 dans la cancérogenèse est complexe car elle fonctionnerait comme un oncogène ou un GST selon le type de cancer. L'expression du gène UCHL1 est réprimée par méthylation de son promoteur dans différents types de cancers comme celui du côlon [59]. En effet, des études antérieures ont montré une méthylation aberrante du promoteur UCHL1 dans les tumeurs colorectales primaires, ainsi que dans les lignées cellulaires de cancer du côlon, avec des taux avoisinant les 73% [59, 60]. Cependant, une autre étude a montré que le promoteur d'UCHL1 est hypométhylé dans les cancers colorectaux métastatiques. Ceci suggère que l'hypométhylation de ce promoteur serait le mécanisme responsable de la réexpression de ce gène à des stades avancés du CCR, faisant de lui un marqueur potentiel pour les CCRs métastatiques [61].

### RESULTATS DE L'ETUDE EPIGENETIQUE CHEZ LES PATIENTS DU SUD TUNISIEN ATTEINTS DE CANCER COLORECTAL :

Notre travail a porté sur une panoplie de gènes impliqués dans la carcinogenèse colorectale, à savoir : les suppresseurs de tumeurs (p16INK4a, APC, WIF1, UCHL1), les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (MLH1), de l'apoptose (DAPK, RASSF1A et RARβ2) et de l'adhésion cellulaire (CDH1) ; et nous avons comme objectif la détermination du statut de méthylation des régions promotrices de ces gènes. L'étude a été réalisée sur une série de 83 adénocarcinomes lieberkuhniens prélevés chez des patients du sud tunisien atteints d'un CCR sporadique. Les fréquences de méthylation ont été comparées avec les données de la littérature et corrélées avec les paramètres clinicopathologiques.

Nous avons trouvé des taux de méthylation variables chez nos patients (Figure 2 ; tableau 1). Les différents pourcentages de méthylation que

nous avons trouvé se rapprochent de ce qui a été décrit dans la littérature (tableau 1). L'importance de l'étude du statut de méthylation de tous ces gènes réside dans les corrélations avec les divers paramètres clinicopathologiques qui peuvent en sortir ainsi que dans les différences de survie globale chez les patients. L'association avec ces paramètres pourrait nous renseigner sur les marqueurs de suivi et de pronostic.

**Tableau 1 :** Résultats de l'étude du statut de méthylation des différents gènes et comparaisons par rapport à la littérature.

Gène	Fréquence	Fréquence Théorique (référence)
RARβ2	80,8%	~85% [31]
DAPK	47,2%	53-81,2% [22,23]
RASSF1A	35,6%	12-81% [18]
CDH1	46,6%	40-56% [33,34]
P16	47,2%	7-53% [48-50]
MLH1	53,4%	10-50% [42-44]
APC	58,9%	10-50% [39]
WIF1	87,95%	74% [57]
UCHL1	68,57%	73% [59,60]

#### 1. *Associations avec les paramètres cliniques des patients :*

Pour la plupart des gènes étudiés, nous avons trouvé des corrélations significatives avec les facteurs cliniques liés à une plus grande agressivité de la maladie.

En effet, la perte d'expression du gène RARβ2 suite à la méthylation de son promoteur corrèle avec la surexpression de COX-2 (p=0.014) [11], cette dernière est impliquée dans le processus inflammatoire et la progression tumorale. En effet, RARβ2 peut réguler la transcription de COX-2 directement en se fixant sur le promoteur ou indirectement en inhibant le facteur transcriptionnel AP1 qui régule à son tour positivement l'expression de COX-2 [62-64].

Concernant l'E-cadhérine, nous avons trouvé une association significative entre les résultats de méthylation et d'immunohistochimie (p=0,005). En effet, son expression a été observée dans 83.3% des cas (50/60). Parmi les 50 cas positifs, 32 (64%) ont montré l'absence totale de méthylation du gène CDH1 tandis que seuls 2 cas avaient un statut méthylé, ce qui suggère l'importance de cette altération épigénétique dans la perte d'expression de la protéine d'adhésion dans les CCRs [11].

Ce résultat est en accord avec le travail de Garinis et al. qui ont rapporté une association significative entre la diminution de l'expression de l'E-cadhérine et l'hyperméthylation de son promoteur, dans environ 80% des carcinomes [33].

L'analyse de la méthylation concomitante des deux gènes p16INK4a et MLH1 a montré qu'elle est fortement associée avec le stade de la maladie ( $p=0,024$ ) et la taille tumorale ( $p=0,021$ ) [12]. La méthylation de p16INK4a est plus fréquente chez les patients dont la tumeur est de taille élevée ( $p=0,035$ ) [12]. Selon d'autres travaux, le profil de méthylation de p16INK4a est associé avec le type mucineux, le stade tumoral avancé, l'atteinte ganglionnaire et un mauvais pronostic [52, 65]. En ce qui concerne le statut de méthylation du promoteur MLH1, l'hyperméthylation de ce gène tend à être corrélée avec la localisation proximale de la tumeur ( $p=0,063$ ) comme il a été déjà décrit dans la littérature [66].

L'analyse univariée a montré que la méthylation du promoteur WIF-1 est significativement corrélée avec l'agressivité de la maladie comme la présence de métastases ( $p=0,039$ ) et l'invasion vasculaire ( $p=0,029$ ). L'analyse de l'expression de WIF-1 a donné lieu à une corrélation significative entre la MSP et la RT-PCR ( $P = 0,001$ ). En effet, alors que l'ARNm de WIF-1 a été observé seulement dans 9,5% des échantillons avec un profil héli-méthylé, il a été détecté dans 100% des échantillons non méthylés. Ceci suggère que cette méthylation du promoteur de WIF1 est responsable de sa perte d'expression dans les tissus tumoraux [13]. Nos résultats sont en accord avec Taniguchi et al. qui ont montré un taux de méthylation très élevé de ce gène, corrélé avec une perte de l'expression [56].

Pour le gène APC, l'analyse statistique a révélé une association significative entre l'hyperméthylation du gène APC et le statut MSI-H ( $p=0,002$ ) et avec la forme sauvage du gène BRAF. Ce résultat concorde avec celui d'Iacopetta et al. [44].

Dans notre série d'étude, la méthylation du gène UCHL-1 corrèle significativement avec l'invasion des ganglions lymphatiques ( $p = 0,029$ ). L'analyse de l'expression de son ARNm a révélé une corrélation significative entre les résultats de la MSP et ceux de la RT-PCR ( $p=0,016$ ), suggérant que cette méthylation entraîne la perte d'expression de UCHL-1 dans les tissus tumoraux. Ces résultats sont en accord avec une étude récente montrant que l'expression accrue d'UCHL1 était significativement associée à l'invasion des ganglions lymphatiques [67].

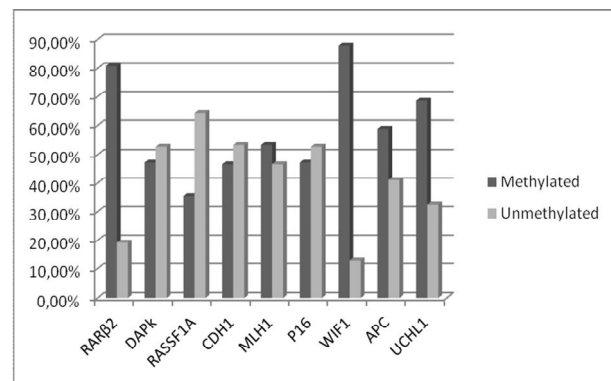
## 2. Associations avec la survie des patients :

En utilisant la méthode de Kaplan-Meier, nous avons trouvé que l'hyperméthylation des gènes RAR $\alpha$ 2 et MLH1 est associée avec une durée réduite de la survie des patients (Figure 3: A,B ; respectivement  $p \log \text{rank} = 0,026$  ;  $p \log \text{rank} = 0,007$ ).

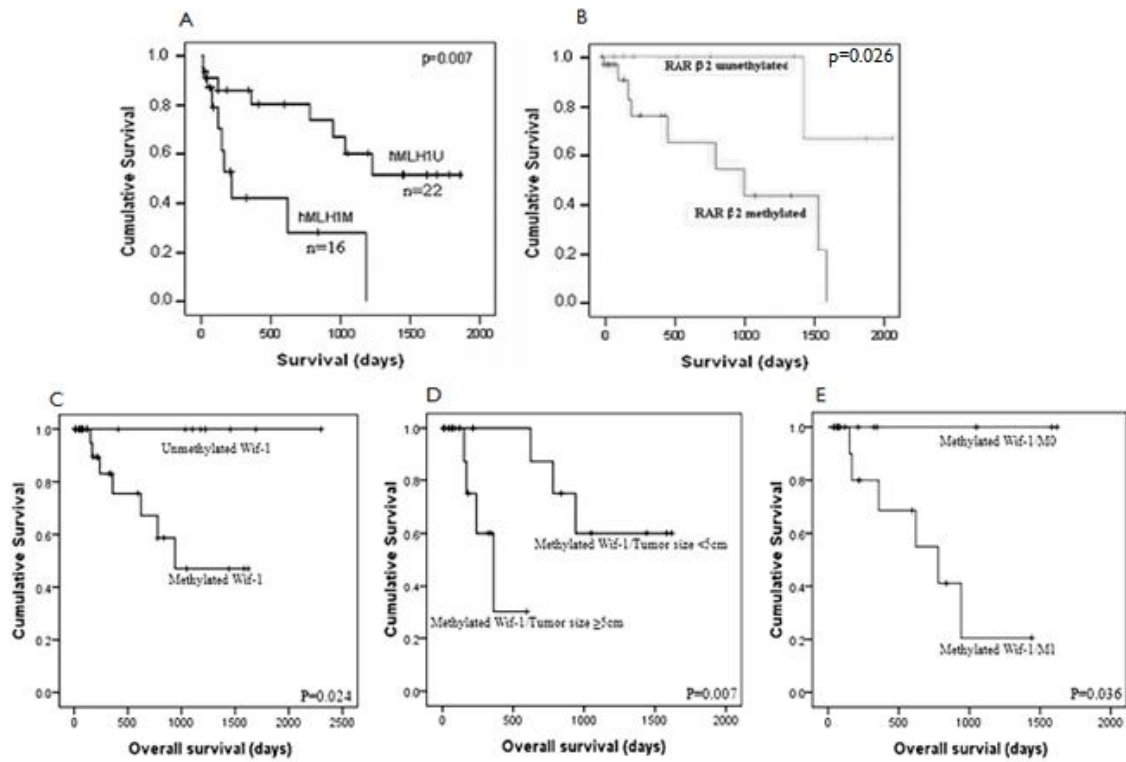
Concernant le gène de réparation d'ADN MLH1, nous avons trouvé, en utilisant l'analyse multivariée, qu'en plus de la taille tumorale, l'hyperméthylation de ce gène constitue un facteur indépendant de pronostic dans les CCRs.

Les courbes de survie ont montré que la durée de la survie globale est significativement réduite pour des patients ayant un promoteur WIF-1 méthylé ((Figure 3C ;  $p \log \text{rank} = 0,024$ ). De plus, en considérant le groupe de patients ayant un profil de méthylation positif, nous avons constaté que la durée de survie globale est significativement prolongée pour ceux ayant une taille tumorale réduite ( $p=0,007$ ) et une absence de métastase ( $p=0,036$ ) (Figure 3D, 3E).

**Figure 2 :** Histogramme illustrant les différences de méthylation entre les différents gènes étudiés.



**Figure 3 :** Courbes de Kaplan Meier montrant l'effet de la méthylation aberrantes des promoteurs de certains gènes sur la survies patients tunisiens atteints de cancer colorectal sporadique.





## CONCLUSION

L'étude des modifications épigénétiques qui modulent la transformation cellulaire néoplasique a suscité un intérêt grandissant au cours de ces dernières années et les efforts se sont consentis pour en sortir une liste de gènes qui pourront être utilisés comme marqueur de diagnostic et de pronostic de la maladie. Dans ce présent travail, nous avons étudié le statut de méthylation de 9 gènes qui jouent des rôles importants dans différents processus cellulaires. Nous avons mis en évidence que l'hyperméthylation de RAR $\beta$ 2, MLH1 et WIF1 est un événement fréquent dans les carcinomes recto-coliques corrélé à un mauvais pronostic. Nous avons aussi montré que l'hyperméthylation de CDH1 et WIF1 est le mécanisme majeur de la perte d'expression des protéines correspondantes dans les CCRs. Ces gènes constituent donc des marqueurs de mauvais pronostic pour les patients originaires du Sud tunisien atteints de cancer colorectal.

## REFERENCES

- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74
- Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ. Colorectal cancer. *The Lancet* 2010; 375(9719): 1030-1047.
- Sellami A, Sellami-Boudawara T, Hsairi M, Jliidi R, Achour N, Zitoun I et al. Incidence des cancers dans le gouvernorat de Sfax Année 2000-2002. *Registre du cancer du sud tunisien* 2007; 2: 18-20.
- Heavey PM, McKenna D, Rowland IR. Colorectal cancer and the relationship between genes and the environment. *Nutri Cancer* 2004; 48: 124-141.
- Bodmer WF. Cancer genetics: colorectal cancer as a model. *J Hum Genet* 2006; 51(5): 391-396.
- Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer --analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England Journal of Medicine* 2000; 343: 78-85.
- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999; 286(5439): 481-6.
- Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4: 988-993.
- Szyf M. Targeting DNA methylation in cancer. *Bull Cancer* 2006; 93: 961-972.
- Miladi-Abdennadher I, Abdelmaksoud-Dammak R, Ayadi L, Khabir A, Frikha F, Kallel L et al. Hypermethylation of RAR $\beta$ 2 correlates with high COX-2 expression and poor prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Tumor Biology* 2010; 31(5):503-11.
- Miladi-Abdennadher I, Abdelmaksoud-Dammak R, Ayadi L, Khabir A, Frikha F, Kallel L et al. Aberrant Methylation of hMLH1 and p16INK4a in Tunisian patients with sporadic colorectal adenocarcinoma. *Bioscience Report*, 2011; 31(4):257-64.
- Abdelmaksoud-Dammak R, Miladi-Abdennadher I, Saadallah-Kallel A, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Frikha M et al. Downregulation of WIF-1 and Wnt5a in patients with colorectal carcinoma: clinical significance. *Tumor Biology* 2014; 35(8):7975-82.
- Agathangelou A, Cooper W N, Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 2005; 65, 3497-3508
- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat. Genet.* 2000; 25:315-319.
- Fendri A, Masmoudi A, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M et al. Inactivation of RASSF1A, RAR $\beta$ 2 and DAP-kinase by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Therapy* 2009; 8:(5)1-8
- Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, Boujelbane N, Sellami-Boudawara T, Daoud J et al. Aberrant methylation of RASSF1A is associated with poor survival in Tunisian breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136(2):203-10
- Fernandes MS, Carneiro F, Oliveira C, Seruca R. Colorectal cancer and RASSF family--a special emphasis on RASSF1A. *Int J Cancer* 2013; 132(2):251-8.
- Cohen O, Feinstein E, Kimchi A. DAP-kinase is a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J* 1997; 16: 998-1008.
- Cohen O, Inbal B, Kissil JL, Raveh T, Berissi H, Spivak-Kroizaman T et al. DAP-kinase participates in TNF- $\alpha$  and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain. *J Cell Biol* 1999; 146:141-148.
- Gozuacik D, Kimchi A. DAPK protein family and cancer. *Autophagy* 2006; 2(2):74-9.
- Mittag F, Kuester D, Vieth M, Peters B, Stolte B, Roessner A et al. DAPK promoter methylation is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2006; 240(1):69-75.
- Pehlivan S, Artac M, Sever T, Bozcuk H, Kilincarslan C, Pehlivan M. Gene methylation of SFRP2, P16, DAPK1, HIC1, and MGMT and KRAS mutations in sporadic colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 201(2):128-32.
- Liu ZM, Ding F, Guo MZ, Zhang LY, Wu M, Liu ZH. Downregulation of retinoic acid receptor-b2 expression is linked to aberrant methylation in esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2004; 110: 771-5.
- Yang Q, Mori I, Shan L, Nakamura M, Nakamura Y, Utsunomiya H et al. Biallelic inactivation of retinoic acid receptor  $\beta$ 2 gene by epigenetic change in breast cancer. *Am J Pathol* 2001; 158: 299-303.
- Virmani AK, Rathi A, Zochbauer-Muller S, Sacchi N, Fukuyama Y, Bryant D et al. Promoter methylation and silencing of the retinoid acid receptor- $\beta$  gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1303-7.
- Ivanova T, Petrenko A, Gritsko T, Vinokourova S, Eshilev E, Kobzeva V et al. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor- $\beta$ 2 gene in cervical cancer. *BMC Cancer* 2002; 2:1-7.
- Côté S, Sinnett D, Momparler RL. Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoterregion of the retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 1998; 9:743-50.

29. Sun SY. Retinoic acid receptor  $\beta$  and colon cancer. *Canc Biol Ther* 2004; 3:87-8.
30. Youssef EM, Estecio MRH, Issa JP. Methylation and regulation of expression of different retinoic acid receptor- $\beta$  isoforms in human colon cancer. *Canc Biol Ther* 2004; 3: 82-6.
31. Xu XL1, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Sun MH, Gu J, Du X et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10(23):3441-54.
32. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 619-627.
33. Garinis GA, Menounos PG, Spanakis NE, Papadopoulos K, Karavitis G, Parassi I et al. Hypermethylation-associated transcriptional silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas. *J Pathol* 2002; 198: 442-449.
34. Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest* 2004; 84: 884-893
35. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW et al. Constitutive transcriptional activation by  $\beta$ -catenin – Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 1997; 275:1784-7.
36. Hiltunen MO, Alhonen L, Koistinaho J, Myöhänen S, Pääkkönen M, Marin S et al. Hypermethylation of the APC adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. *Int J. Cancer* 1997; 70:644-648.
37. Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000; 60:4366-4371.
38. Chen J, Röcken C, Lofton-Day C, Schulz HU, Müller O, Kutzner N et al. Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis. *Carcinogenesis* 2005; 26(1):37-43.
39. Lin SY, Yeh KT, Chen WT, Chen HC, Chen ST, Chiou HY et al. Promoter CpG methylation of tumor suppressor genes in colorectal cancer and its relationship to clinical features. *Oncol Rep* 2004; 11:341-348.
40. Jascur T, Boland C.R. Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. *Int J Cancer* 2006; 119:2030-2035.
41. Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, Wyllie AH, Sharp L, Burn J et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997; 6:105-110.
42. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002; 196:1-7.
43. Yang H, Hoshino K, Sanchez-Gonzalez B, Kantarjian H, Garcia-Manero G. Antileukemia activity of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid. *Leuk Res* 2005; 29: 739-748.
44. Iacopetta B, Grieu F, Li W, Ruskiewicz A, Caruso M, Moore J et al. Gene methylation is inversely correlated with features of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006; 119(10): 2272-2278.
45. Kawakami K, Ruskiewicz A, Bennett G, Moore J, Grieu F, Watanabe G et al. DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2006; 94(4):593-598.
46. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006; 38: 787-93.
47. Liggett W H, Sidransky J D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:1197-1206.
48. Liang JT, Chang KJ, Chen JC, Lee CC, Cheng YM, Hsu HC et al. Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3N0M0 stage colorectal cancers: Association with DNA replication error and shorter survival. *Oncology* 1999; 57:149-156.
49. Wiencke JK, Zheng S, Lafuente A, Lafuente MJ, Grudzen C, Wrensch MR et al. Aberrant methylation of p16INK4a in anatomic and gender-specific subtypes of sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999; 8:501-506.
50. Trzeciaka L, Henniga E, Kolodziejski J, Nowacki M, Ostrowski J. Mutations, methylation and expression of CDKN2a/p16 gene in colorectal cancer and normal colonic mucosa. *Cancer Letters* 2001; 163:17-23.
51. Ramirez N, Bandres E, Navarro A, Pons A, Jansa S, Moreno I et al. Epigenetic events in normal colonic mucosa surrounding colorectal cancer lesions. *Eur J Cancer* 2008; 44, 2689-269.
52. Wettergren Y, Odin E, Nilsson S, G'oran C, Gustavsson B. P16INK4a gene promoter hypermethylation in mucosa as a prognostic factor for patients with colorectal cancer. *Mol. Med* 2008; 14:412-417.
53. Wissmann C, Wild PG, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M et al. WIF-1, a component of the Wnt pathway, is downregulated in prostate, breast, lung, and bladder cancers. *J Pathol* 2003; 201(2):204-212.
54. Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, Mikami I et al. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 4717-7420.
55. Fendri A, Khabir A, Hadri-Guiga B, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M et al. Epigenetic alteration of the Wnt inhibitory factor-1 promoter is common and occurs in advanced stage of Tunisian nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Invest* 2010; 28:896-903.
56. Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene* 2005; 24:7946-7952.
57. Lee BB, Lee EJ, Jung EH, Chun HK, Chang DK, Song SY et al. Aberrant Methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 Genes in Plasma as a Biomarker for Early Detection of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15:6185-6191.
58. Jackson P, Thompson RF. The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Neurol. Sci* 1981; 49:429-438.
59. Okochi-Takada E, Nakazawa K, Wakabayashi M, Mori A, Ichimura S, Yasugi T et al. Silencing of the UCHL1 gene in human colorectal and ovarian cancers. *Int J Cancer* 2006; 119(6):1338-44.
60. Yu J, Tao Q, Cheung KF, Jin H, Poon FF, Wang X et al. Epigenetic identification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 as a functional tumor suppressor and biomarker for hepatocellular carcinoma and other digestive tumors. *Hepatology* 2008; 48(2):508-18.
61. Mizukami H, Shirahata A, Goto T, Sakata M, Saito M, Ishibashi K et al. PGP9.5 methylation as a marker for metastatic colorectal cancer. *Anticancer Research* 2008; 28(5A):2697-2700.
62. Li M, Song S, Lippman SM, Zhang XK, Liu X, Lotan R et al. Induction of retinoic acid receptor beta

suppresses cyclooxygenase-2 expression in esophageal cancer cells. *Oncogene* 2002; 21:411-8.

63. Lin F, Xiao D, Kolluri SK, Zhang X. Unique anti-activator protein-1 activity of retinoic acid receptor beta. *Cancer Res* 2000; 60:3271-80.

64. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett.* 2004;215:1-20

65. Guan RJ, Fu Y, Holt PR, Pardee AB. Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. *Gastroenterology* 1999; 116.

66. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA et al. BRAF Mutation Is Frequently Present in Sporadic colorectal Nonpolyposis Colorectal Cancer Cancer with Methylated hMLH1, But Not in Hereditary. *Clin Cancer Res* 2004; 10:191-195.

67. Ma Y, Zhao M, Zhong J, Shi L, Luo Q, Liu J et al. Proteomic profiling of proteins associated with lymph node metastasis in colorectal cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 2010; 110(6): 1512-9.

# CHOLÉSTEATOME IATROGÈNE APRÈS MYRINGOPLASTIE

## IATROGENIC CHOLESTEATOMA AFTER MYRINGOPLASTY

B.HAMMAMI, S.KALLEL, F.MAALEJ, S.AYEDI, I.CHARFEDDINE, M.MNEJJA, A.GHORBEL

*Service ORL, CHU Habib Bourguiba, Faculté de Médecine de Sfax*

### Résumé

**Objectif :** Etudier le cholésteatome iatrogène après myringoplastie afin de dégager les facteurs en cause et planifier leur traitement.

**Matériel et méthodes :** Etude rétrospective portant sur 11 oreilles opérées d'un cholésteatome iatrogène après une myringoplastie entre 2002 et 2012.

**Résultats :** Il s'agissait de 11 oreilles atteintes d'un cholésteatome iatrogène parmi 300 oreilles opérées d'une myringoplastie soit une incidence de 3,6%. Le délai d'apparition des symptômes par rapport à la myringoplastie était de 18 mois en moyenne (extrêmes de 3 mois et 4 ans). Il s'agissait de récurrence de l'otorrhée dans tous les cas. L'examen avait montré une opacité blanchâtre derrière le néotympan dans 4 cas et au niveau du conduit auditif externe dans 4 cas. La TDM a évoqué le diagnostic dans 3 cas. Quatre patients ont été réopérés, sous anesthésie locale, d'une ablation de perle de cholésteatome au niveau du conduit auditif externe alors que sept patients ont été réopérés sous anesthésie générale. Le cholésteatome a été localisé au niveau hypotympanique dans deux cas et au niveau protympanique dans un cas, alors qu'il était diffus antro-attical et mésotympanique dans 4 cas.

**Conclusion :** Le cholésteatome iatrogène est une complication rare de la myringoplastie. Une surveillance post opératoire est nécessaire pour le diagnostiquer précocement.

**Mots clés :** cholésteatome, iatrogène, myringoplastie, tomodensitométrie, chirurgie

### Summary

**Objective:** To study cases of iatrogenic cholesteatoma after myringoplasty to identify the factors involved and plan their treatment.

**Materials and Methods:** Study is a retrospective analysis of 11 patients (11 ears) with iatrogenic cholesteatoma after myringoplasty.

**Results:** There were 11 ears among 300 ears operated a myringoplasty an incidence of 3.6%. The time to onset of symptoms compared to myringoplasty was 18 months on average (range, 3 months and 4 years). This was the recurrence of otorrhea in all cases. The examination showed a whitish opacity behind the neotympanum in 4 cases at the external auditory meatus in 4 cases. CT spoke diagnosis in 3 cases. Four patients were reoperated under local anesthesia ablation Pearl cholesteatome in the external ear canal while seven patients underwent reoperation under general anesthesia. Cholesteatoma was located at hypotympanique level in two cases and protympanique level in one case, while diffuse antralatticalmésotympanique and in 4 cases.

**Conclusion:** The iatrogenic cholesteatoma is a rare complication of myringoplasty with a post-operative monitoring is required for early diagnosis.

**Key words:** cholesteatoma, iatrogenic, myringoplasty, tomodensitometry, surgery

Article reçu 6/2012

Accépté 2/2013

## INTRODUCTION

La myringoplastie est la fermeture chirurgicale d'une perforation tympanique par une greffe. La greffe peut être à type de tissu adipeux, aponévrose temporale superficielle ou profonde ou encore péricondre avec ou sans cartilage. La mise en place de cette greffe peut être réalisée par différentes voies d'abord. C'est un geste qui nécessite un décollement minutieux de la peau du conduit auditif externe en veillant à ne pas garder de l'épiderme dans la caisse du tympan. À défaut, le geste sera compliqué de survenue d'un cholestéatome iatrogène. Certaines localisations ou caractéristiques de la perforation initialement opérée peuvent être plus à l'origine de ce type de complication et nécessitent alors une attention plus particulière lors de la myringoplastie.

L'objectif de notre travail est d'étudier les caractéristiques de perforation pouvant être pourvoyeur de la survenue de cholestéatome iatrogène après myringoplastie.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

Nous avons mené une étude rétrospective à propos de 300 oreilles opérées d'une myringoplastie. Parmi ces oreilles, onze ont été reprises pour cholestéatome iatrogène entre 2002 et 2012.

Nous avons étudié les caractéristiques démographiques des malades. Les caractéristiques de la perforation lors de la première chirurgie ont été analysées ainsi que la stabilité de l'oreille lors de la chirurgie première.

La tomodensitométrie pré myringoplastie a été réétudiée et analysée.

La technique de myringoplastie a été étudiée : matériaux utilisés, technique de mise en place (underlay ou overlay) ainsi que le geste mastoïdien. Nous avons évalué les suites post myringoplastie afin de chercher des facteurs favorisant la survenue de cholestéatome iatrogène.

## RESULTATS (Tableau)

L'âge moyen de nos patients était de 46 ans avec sex-ratio de 0,37 (3 hommes et 8 femmes).

La perforation tympanique initiale, ayant bénéficié de myringoplastie chez les malades ayant développés un cholestéatome iatrogène, siégeait du côté droit dans 5 cas et du côté gauche dans 6 cas. Elle était large dans 2 cas, centrale dans un cas, touchant un seul quadrant dans 2 cas et deux quadrants dans 6 cas. Elle n'était marginale que

dans aucun cas. Une myringosclérose associée a été trouvée dans 4 cas.

Ces patients avaient des signes rhinologiques à type d'hypertrophie des cornets inférieurs dans 4 cas.

Nous avons utilisé, comme greffe pour la myringoplastie, l'aponévrose temporale superficielle dans 10 cas et le cartilage conchal dans un cas. La mise de la greffe était faite au-dessous de l'épaisseur du tympan au-dessus du manche du marteau (underlay)

Lors de la myringoplastie, le fond de la caisse était inflammatoire dans un cas et polypoïde dans deux cas. Ces deux derniers ont eu une antrotomie d'aération. La chaîne ossiculaire était complète et mobile dans tous les cas.

Les patients ont été hospitalisés en post opératoire pendant une durée moyenne de 4 jours. Ils étaient suivis à la consultation externe de façon régulière, par examen otoscopique à un mois, deux mois, trois mois, six mois puis chaque année.

Une TDM du rocher a été pratiquée à la moindre suspicion clinique de cholestéatome iatrogène.

Le délai d'apparition des symptômes par rapport à la myringoplastie était de 18 mois en moyenne (extrêmes de 3 mois et 4 ans). Il s'agissait de récurrence de l'otorrhée dans tous les cas. Un seul malade avait une otorrhée post opératoire qui a résisté au traitement médical. L'aggravation de l'hypoacousie était associée dans 2 cas.

L'examen avait montré :

- Une opacité blanchâtre derrière le néotympan dans 4 cas.

- Une opacité blanchâtre au niveau du conduit auditif externe dans 4 cas.

- Aspect opaque de la totalité du tympan (greffe utilisée : péricondre)

La TDM a évoqué le diagnostic dans 3 cas. Elle a été pratiquée chez 7 patients en montrant :

- Opacité en boule retro tympanique dans un cas. (Figure 1)

- Opacité non spécifique de la caisse du tympan dans 2 cas.

- Opacité antroatticiale dans un cas.

- Opacité antroatticiale et de la caisse du tympan dans 2 cas.

- Opacité de toute la caisse du tympan et des cellules mastoïdiennes dans un cas.

- Lyse du mur de la Logette dans 4 cas.

- La chaîne ossiculaire était intacte dans tous les cas.

-Aucun cas de lyse du tegmen tympani ni du tegmen antri ni de dénudation de canal du facial n'ont été trouvés.

La chirurgie du cholestéatome iatrogène a consisté en l'ablation d'une perle de cholestéatome siégeant au niveau du conduit auditif externe sous anesthésie locale dans 4 cas.

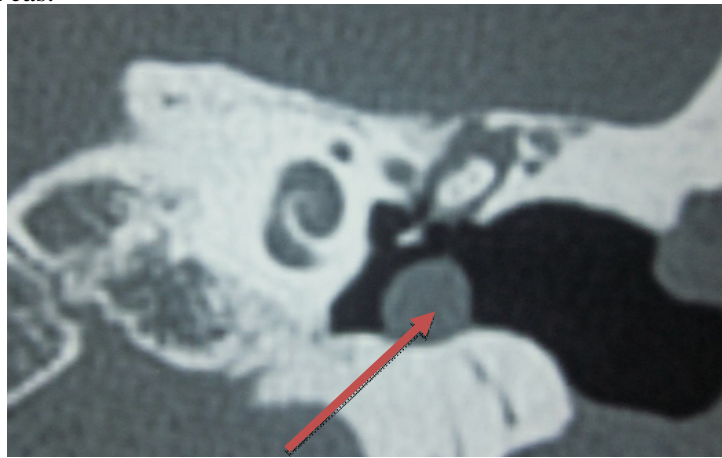
Alors que la chirurgie a été faite sous anesthésie générale pour les sept autres patients. Ces derniers ont eu une tympanoplastie en technique fermée a été réalisée. La voie du conduit a été réalisée dans 3 cas et la voie retro auriculaire dans 4 cas. Nous avons réalisé une eantroatticotomie dans 3 cas et une mastoïdectomie dans un cas.

Le cholestéatome a été localisé au niveau :

- Hypotympanique dans deux cas.
- Protympanique dans un cas.
- Diffus antroattical et mésotympanique dans 4 cas.

La chaîne ossiculaire était intacte dans tous les cas. Une lyse du cardes a été trouvée dans 3 cas. Cette lyse a été reconstruite par du cartilage conchale dans tous les cas.

Les suites opératoires étaient simples avec guérison dans tous les cas après un recul moyen de 39 mois (entre 9 et 87 mois).



**Figure 1 :** TDM du rocher, coupe coronale, Opacité en boule retro tympanique, manche du marteau paraît normal

**TABLEAU : CARACTERISTIQUES DES OREILLES DES MALADES AYANT PRESENTE UN CHOLESTEATOME IATROGENE APRES MYRINGOPLASTIE**

âge	sexe	oreille	perforation	FDC	greffe	délai	clinique	TDM (opacité)	Cholestéatome	Geste	
40	m	d	ant sup	inf	ATS	1 an	Cholé du CAE		CAE	AL	ablation par voie du conduit
62	f	g	inf	polypoïde	ATS	1 an	Cholé du CAE		CAE	AL	ablation par voie du conduit
66	f	d	inf	sain	ATS	2ans	Opacité tympanique retro	mastoïdienne et caisse	diffus	AG	mastoïdectomie
28	f	g	large	sain	ATS	4ans	Opacité tympanique retro	antroatticale et caisse	diffus	AG	antroatticotomie
44	f	d	post	sain	ATS	2ans	Opacité tympanique retro	caisse	protympanum	AG	ablation par voie du conduit
59	f	d	large	sain	ATS	2ans	Otorrhée	caisse	hypothmpanum	AG	ablation par voie du conduit
31	m	g	inf	sain	ATS	1 an	Otorrhée	caisse	hypothmpanum	AG	ablation par voie du conduit
57	m	d	post inf	sain	cartilage	1 an	Cholé du CAE		CAE	AL	ablation par voie du conduit
38	f	g	inf	sain	ATS	1 an	Cholé du CAE		CAE	AL	ablation par voie du conduit
40	f	g	centrale	polypoïde	ATS	2ans	Opacité tympanique retro	antroatticale et caisse	diffus	AG	antroatticotomie
50	f	g	inf	sain	ATS	3mois	Otorrhée	antroatticale	diffus	AG	antroatticotomie

m :masculin ;f :féminin ;d :droite ;g :gauche ;FDC :fond de la caisse ; ATS :aponévrose temporelle superficielle ; cholé : cholestéatome, CAE :conduit auditif externe ;AL :anesthésie locale ;AG :anesthésie générale.

## DISCUSSION

Le cholésteatome après myringoplastie est un échec anatomique de cette chirurgie. Son incidence varie entre 1 et 5 % des myringoplasties. Il siège plus fréquemment au niveau de l'oreille moyenne. La localisation au niveau du conduit auditif externe est plus rare (0,5 à 1%)[1, 2, 3, 4].

Le cholésteatome iatrogène peut se présenter le plus fréquemment sous forme localisée d'un kyste sphérique blanc nacré, d'où le nom de perle, ou parfois de squames diffuses.

La localisation postéro-supérieure de la perforation est dite dangereuse et représente l'un des critères prédictifs de cholésteatome dans l'absolu. Après myringoplastie, il n'y a pas de localisation qui est corrélée plus à la survenue de cholésteatome iatrogène. Par contre, la technique overlay est souvent corrélée à la survenue de tel échec.

Le diagnostic doit être évoqué, lors de la surveillance, devant la réapparition de l'otorrhée ou la chute de l'audition après la stabilisation des seuils auditifs.

L'aspect clinique évocateur est une opacité sphérique de taille variable au niveau du tympan ou de la paroi du conduit auditif externe.

L'imagerie basée sur la tomodensitométrie n'est pas systématique. Elle n'est pas indiquée devant des boules bien limitées du tympan ou du conduit auditif externe dont les bords sont accessibles à l'examen. La tomodensitométrie du rocher serait indiquée devant un aspect blanchâtre de limites indéterminées [5, 6].

Le traitement dépend du siège et de l'extension des lésions. Il est souvent possible sous anesthésie locale surtout s'il s'agit d'une perle bien limitée de petite taille au niveau du conduit auditif externe ou du tympan. Dans ces cas la voie intra-méatique est indiquée. La tympanoplastie en technique fermée, et rarement en technique ouverte, est indiquée dans les formes extensives non contrôlable par voie intraméatique seule. [7,8]

La prévention du cholésteatome iatrogène passe par unavivement des berges de la perforation avec vérification de la face postérieure du reliquat tympanique. La mise de la greffe doit respecter l'orientation du lambeau tympanique. La vérification de l'angle antérieur du lambeau tympano-méatique est un garant pour prévenir cet échec anatomique [9].

## CONCLUSION

La surveillance post opératoire des tympanoplasties simples est nécessaire non seulement pour l'évaluation fonctionnels mais aussi pour un diagnostic précoce d'apparition d'un cholésteatome iatrogène. Dans ce cas une prise en charge adéquate s'impose.

## REFERENCES

- 1- Desaulty A1, Lansiaux V, Machiels S, Gael JF. Failures after tympanoplasty. *Rev LaryngolOtolRhinol (Bord)*. 1996;117(5):357-61.
- 2- Deguine O, Folia M, Fraysse B. Tympanoplastie extra-fibreuse : technique et résultats. *J Fr ORL* 2001;50:124-8.
- 3- Martin DW, Selesnick SH, Parisier SC. External auditory canal cholesteatoma with erosion into the mastoid. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999; 121: 298-300.
- 4- Grain P, Deglos J, Delos M. External auditory canal cholesteatoma. *Arch Otolaryngol*. 1997; 123: 62-65.
- 5- Venkatraman G, Mattox DE. External auditory canal wall cholesteatoma: a complication of ear surgery. *ActaOtolaryngol*. 1997; 117: 293-297.
- 6- Vrabec JT, Chaljub G. External canal cholesteatoma. *Am J Otol*. 2000; 21: 608-614.
- 7- Holt JJ. Ear canal cholesteatoma. *Laryngoscope* 1992; 102: 608-613.
- 8- Sakamoto M, Kitahara N. Spontaneous external auditory canal cholesteatoma complicated by rheumatoid arthritis—case report and review of the literature. *Auris Nasus Larynx*. 2002; 29: 191-194.
- 9- Triglia JM, Gillot JC, Giovanni A, Cannoni M. Le cholésteatome de l'oreille moyenne chez l'enfant. *Ann OtolaryngolChirCervicofac*1993 ; 110 : 437-443

# INFARCTUS INFÉRIEUR DU MYOCARDE : QUELS PARAMÈTRES ECHOCARDIOGRAPHIQUES PEUT-ON RETENIR POUR DÉTERMINER UNE EXTENSION ISCHÉMIQUE AU VENTRICULE DROIT ?

R. HAMMAMI<sup>1</sup>, F. TRIKI<sup>1</sup>, L. ZAKHAMA<sup>2</sup>, L. ABID<sup>1</sup>, D. ABID<sup>1</sup>, M. AKROUT<sup>1</sup>, S. MALLEK<sup>1</sup>, M. HENTATI<sup>1</sup>, S. KAMMOUN<sup>1</sup>

*Service de Cardiologie de SFAX<sup>1</sup>*

*Service de Cardiologie de l'Hôpital des Forces de Sécurité Intérieures (FSI)<sup>2</sup>*

## Résumé

L'infarctus du ventricule droit (VD), souvent de diagnostic difficile, complique 40 à 50% des infarctus inférieurs du myocarde. L'objectif de ce travail est de déterminer la place de l'échocardiographie dans le diagnostic d'une extension au ventricule droit d'un infarctus inférieur et d'étudier en particulier l'apport des nouvelles techniques de doppler.

Méthodes : Nous avons mené une étude prospective incluant 31 patients hospitalisés dans le service de Cardiologie de Sfax, durant l'année 2010, pour infarctus inférieur du myocarde. Tous les malades ont bénéficié d'une échocardiographie-doppler durant les premières 48 heures. Une comparaison des données échocardiographiques avec celles d'une population témoin a été réalisée.

Résultats : L'âge moyen était de 59,9±13 ans avec une nette prédominance masculine. Une extension électrique au VD a été observée chez 10 malades (32,8%). La fraction d'éjection du ventricule droit était statistiquement plus abaissée chez les malades que chez les témoins ( $p < 0,001$ ). Le mouvement systolique de l'anneau tricuspide (TAPSE) était significativement diminué chez les patients avec infarctus inférieur comparé aux témoins et chez les patients avec signes électriques d'infarctus du ventricule droit comparés au reste des malades (12,22mm vs 18,16mm;  $p < 0,001$ ). La vitesse du flux systolique à l'anneau tricuspide S était significativement plus basse chez les patients comparés aux témoins (15,72 vs 18,55,  $p < 0,001$ ). En comparant les patients ayant des signes électriques d'infarctus du VD au reste des malades, nous avons constaté une diminution significative de la vitesse tricuspide S (11,87 vs 17,56cm/s,  $p < 0,001$ ). Un index de Tei  $> 0,5$  permettait de poser le diagnostic d'un IDM du VD avec une sensibilité de 40% et une spécificité de 91%.

Conclusion : L'étude de la fonction du ventricule droit en échocardiographie doit intégrer plusieurs paramètres à la fois. L'étude des paramètres du doppler tissulaire semblent sensible, facile et très contributive au diagnostic d'infarctus du ventricule droit.

**Mots clés :** Infarctus, Ventricule droit, Echocardiographie, Doppler

Article reçu 6/2012

Accépté 2/2013



## INTRODUCTION

L'infarctus du ventricule droit (IDM du VD) est une entité non rare, compliquant 40 à 50% des infarctus inférieurs du myocarde (1). Le diagnostic d'une atteinte ischémique du VD est souvent basé sur la présence de signes cliniques droits et/ou de signes électriques dans les dérivations droites. Cependant ces signes sont inconstants souvent fugaces et dans certains cas, seule l'échocardiographie pourrait poser le diagnostic d'un infarctus du VD.

L'objectif de ce travail est de relever l'apport de l'échocardiographie notamment l'apport des techniques de doppler tissulaire dans le diagnostic positif précoce d'une extension au VD d'un IDM inférieur.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

Il s'agit d'une étude prospective incluant 31 patients consécutifs hospitalisés à la phase aiguë d'un infarctus inférieur du myocarde, durant l'année 2010. Nous avons comparé les données échocardiographiques de nos patients à celles de témoins d'âge et de sexe similaires.

### 1-Populations

a-Critères d'inclusions :

- Patients

Nous avons inclus les patients hospitalisés pour un premier IDM inférieur, à la phase aiguë (les premières 24 heures). Le diagnostic d'IDM de topographie inférieure a été posé sur l'association d'une douleur infarctoïde (>30 minutes) à un sus décalage du segment ST persistant dans le territoire inférieur.

- Témoins

Nous avons inclus des sujets d'âge et de sexe appariés à nos patients sans facteurs de risque cardio-vasculaire (à part le tabac) et qui sont apparemment sains.

b-Critères d'exclusions :

Nous avons exclus les patients présentant :

- Des antécédents de cardiopathie ischémique.
- Une valvulopathie significative autre qu'ischémique.

-Des antécédents de cardiomyopathies dilatées, restrictives et hypertrophiques.

-Des antécédents de cœur pulmonaire aigu ou de cœur pulmonaire chronique.

-Un trouble de rythme (FA, flutter,...) ou conducteur chronique (malade appareillé..).

### 2- Données cliniques

Nous avons relevé à l'interrogatoire les données démographiques (âge, sexe), les facteurs de risques cardiovasculaires et la chronologie de la douleur thoracique.

Un examen minutieux a été pratiqué chez tous les patients à l'admission pour éliminer les diagnostics différentiels. Nous avons relevé la pression artérielle systolique et diastolique (une hypotension a été considérée à partir d'une pression artérielle systolique < 100 mmHg), la fréquence cardiaque, les signes d'insuffisance ventriculaire gauche (IVG) et les signes d'insuffisance cardiaque droite (IVD).

### 3-Electrocardiogramme

Après avoir posé le diagnostic positif d'IDM inférieur, nous avons précisé chez tous les patients les signes électriques d'extension au ventricule droit (sus décalage de ST de 1 mm ou plus en V3R, V4R), les troubles du rythme essentiellement la fibrillation auriculaire, la tachycardie ventriculaire et la fibrillation ventriculaire et les troubles conductifs de haut degré.

### 4-Etude échocardiographique

Pendant les premières 48 heures de l'hospitalisation et sans retarder le geste de reperfusion coronaire, tous les patients ont bénéficié d'un examen échocardiographique conventionnel associé à un mode DTI pulsé. L'échocardiographie a été réalisée chez les patients ayant présenté un trouble de rythme ou conducteur aigu après la reprise du rythme sinusal et dans les mêmes délais (48 heures).

De la même façon, un examen échocardiographique a été réalisé chez tous les témoins après un repos d'au moins de 30 min.

a-Appareil d'échocardiographie doppler

C'est une machine de type Agilent SONOS 5500, système M2424A, États-Unis dotée d'une sonde 2,4 MHz, et équipé par un Doppler pulsé, continu et couleur. Les échocardiogrammes sont réalisés

par un seul opérateur et dans les mêmes conditions d'éclairage.

#### b-Paramètres recueillis

Les échocardiogrammes sont effectués selon les nouvelles recommandations de la société Américaine d'échocardiographie (SAE) (2).

- Etude de la fonction systolique du VD

\*Fraction de raccourcissement du VD (FRVD): A partir de l'incidence apicale 4 cavités centrée sur les cavités droites. La FRVD a été considérée normale lorsque  $>35\%$  (2).

\*Fraction d'éjection du VD (FeVD): On parle de dysfonction systolique du VD lorsque  $FeVD < 55\%$  (2).

\*Déplacement systolique de l'anneau tricuspide ou TAPSE (Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion): C'est un paramètre de fonction longitudinale (figure 2). Une valeur  $<16\text{mm}$  est en faveur d'une dysfonction systolique ventriculaire droite (3).

\*Vitesse de l'onde systolique à la paroi latérale de l'anneau tricuspide en Doppler tissulaire (onde Sa): Elle est mesurée à la partie latérale de l'anneau tricuspide. Une valeur  $<10\text{cm/s}$  correspond à une dysfonction ventriculaire droite (3). Comme le TAPSE, ce paramètre perd de valeur en cas de fuite tricuspide importante.

- Etude de la fonction diastolique du VD

\*Analyse du flux tricuspide en doppler pulsé et évaluation de la pression atriale droite en doppler tissulaire: En coupe apicale 4 cavités, nous avons mesuré en doppler pulsé à l'extrémité des valves tricuspides les vitesses des ondes Et et At et le temps de décélération Td (figure 3).

En mode doppler Tissulaire appliqué à la paroi latérale du VD,

nous avons mesuré la vitesse des ondes proto-diastolique Eat et télé-diastolique Aat (figure 4). Un rapport  $Et/Eat > 6$  suggère une élévation de la pression atriale droite.

Selon les recommandations de la société Américaine d'échocardiographie (2), on classe la dysfonction diastolique du VD selon ce schéma:

- $Et/At < 0,8$  : trouble de la relaxation

- $Et/At > 2,1$  avec  $Td < 120\text{ms}$  : trouble restrictif

- $Et/At$  entre 0,8 et 2,1 et  $Et/Eat > 6$  : profil pseudo-normal

- $Et/At$  entre 0,8 et 2,1 et  $Et/Eat < 6$  : profil normal

\* Surface de l'oreillette droite (OD) en coupe apicale 4 Cavités: L'OD a été considérée comme dilatée à partir d'une surface télé-systolique  $>18\text{cm}^2$  et sa dilatation est en faveur de l'élévation des pressions de remplissage du VD.

\* Indice de performance myocardique ou index de Tei au niveau du ventricule droit: (figure 5). Un index de Tei mesuré par doppler continu dépassant 0,55 indique une dysfonction ventriculaire droite.

#### 5- L'analyse statistique

Les données ont été saisies et analysées au moyen du logiciel SPSS version 17.0.1. Les résultats étaient exprimés en moyenne  $\pm$  déviations standard. Pour les variables qualitatives, nous avons utilisé le test de Chi 2 et pour les variables quantitatives nous avons utilisé le test *t* de Student. La différence était considérée significative lorsque  $p < 0,05$ . La courbe de ROC a été utilisée pour déterminer les valeurs seuils des différents paramètres permettant le diagnostic d'IDM du VD avec une sensibilité et spécificité maximales.

INFARCTUS INFÉRIEUR DU MYOCARDE : QUELS PARAMÈTRES ÉCHOCARDIOGRAPHIQUES PEUT-ON RETENIR POUR DÉTERMINER UNE EXTENSION ISCHÉMIQUE AU VENTRICULE DROIT ?

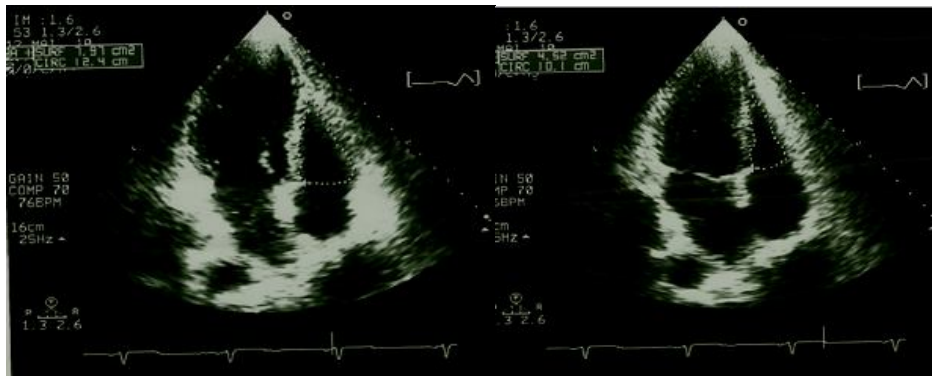


FIGURE1: CALCUL DE LA FRACTION DE RACCOURCISSEMENT A PARTIR DE LA SURFACE DU VENTRICULE DROIT TELEDIASTOLIQUE PUIS TELESYSTOLIQUE.

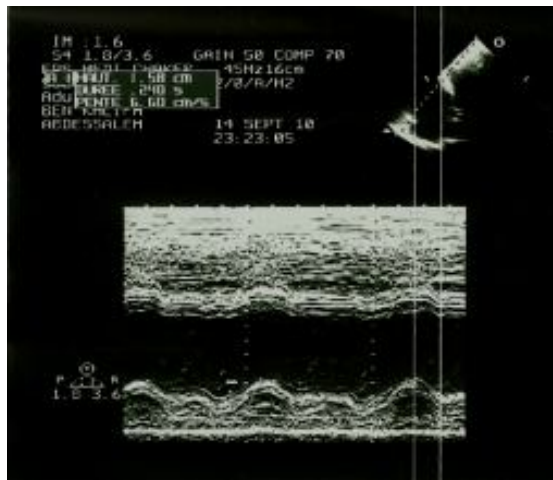


FIGURE2 : MESURE DE L'EXCURSION SYSTOLIQUE DE L'ANNEAU TRICUSPIDE EN MODE TM

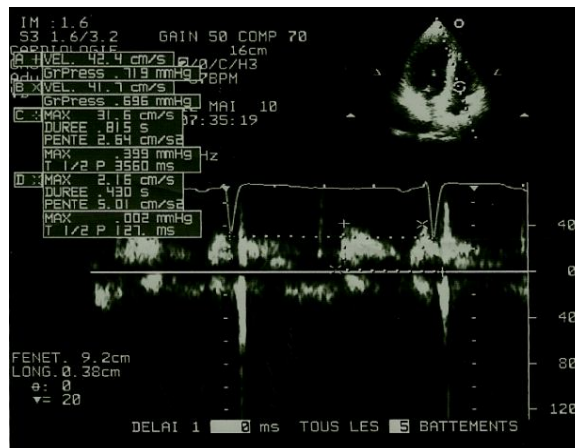
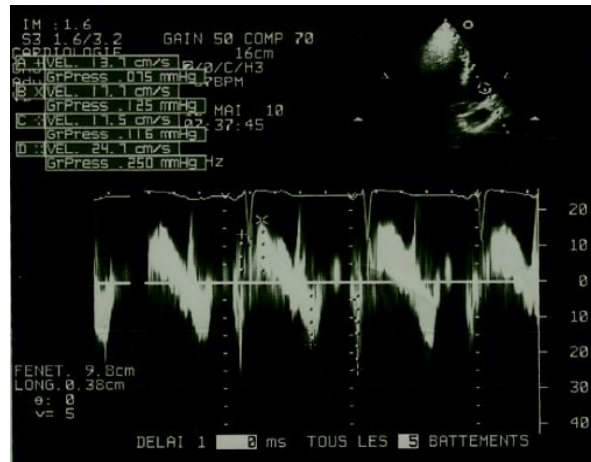
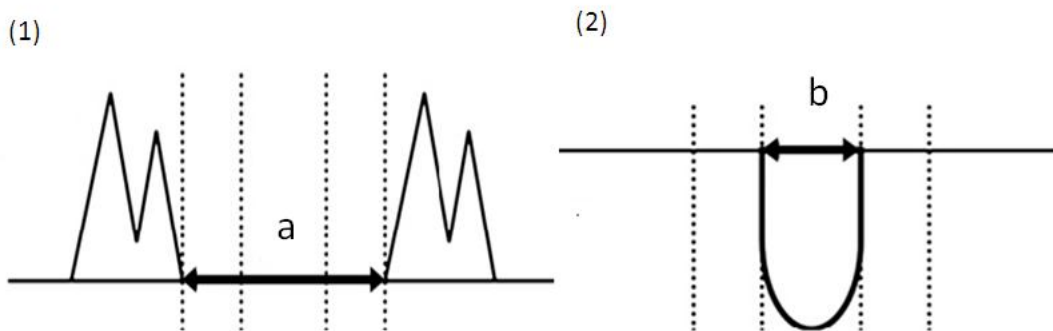


FIGURE3 : DOPPLER PULSE AU NIVEAU DE L'EXTREMITÉ DES VALVES TRICUSPIDE : MESURE DE LA VELOCITÉ DES ONDES E ET A



**FIGURE 4 : DOPPLER TISSULAIRE AU NIVEAU DE LA PAROI LATÉRALE DU VD : MESURE DES VELOCITES DES ONDES SYSTOLIQUES SA, PROTO-DIASTOLIQUE EA ET TELEDIASTOLIQUE AA**



**FIGURE 5 : MESURE DE L'INDEX DE TEI : (1) FLUX TRICUSPIDIEN (2) FLUX PULMONAIRE**

## RESULTATS

### 1-Données cliniques et électriques

31 patients dont 26 hommes et 5 femmes ont été inclus dans notre étude et ont été comparés à 30 témoins de sexe et d'âges appariés. Nos malades étaient essentiellement de sexe masculin (SR=5,02) et relativement jeunes avec un âge moyen de 59,9±13ans (extrême : 17ans, 90ans). Les témoins avaient un âge moyen de 58,03±9 ans avec un sexe ratio=5.

L'infarctus du myocarde était diagnostiqué à 8,46±6,3 heures par rapport au début de la douleur. Une dyspnée a été notée chez 5 patients dont 4 était dans un tableau d'insuffisance ventriculaire gauche et 2 en état de choc cardiogénique.

Dix patients (32,25%) ont présenté une extension électrique de l'ischémie au ventricule droit dont seulement cinq avaient des signes cliniques d'insuffisance cardiaque droite.

Les patients ayant un IDM du VD avaient significativement une pression artérielle systolique plus basse que le reste des malades, un pic de CPK plus élevé, des complications hémodynamiques (tableau 1).

**TABLEAU 1 : COMPARAISON DES DONNÉES CLINIQUE, BILOGIQUES ET ELECTROCARDIOGRAPHIQUE SELON L'EXTENSION ELECTRIQUE DE L'IDM AU VD:**

	<u>Patients</u> <u>(31 patients)</u>	<u>VD(-)</u> <u>(21 patients)</u>	<u>VD(+)</u> <u>(10 patients)</u>	<u>p</u>
<u>Diabète</u>	<u>38,7%</u>	<u>33,3%</u>	<u>50%</u>	<u>0,37</u>
<u>HTA</u>	<u>41,9%</u>	<u>38,1%</u>	<u>50%</u>	<u>0,53</u>
<u>Heure</u> <u>douleur/diagnostic</u> <u>de l'IDM</u>	<u>8,46±6,3</u>	<u>8,76±7,8</u>	<u>7,8±4,35</u>	<u>0,73</u>
<u>FC (batt/min)</u>	<u>70,8±20</u>	<u>74,1±19</u>	<u>64,1±19</u>	<u>0,2</u>
<u>PAS (mmHg)</u>	<u>130,7±28</u>	<u>138,8±23</u>	<u>113,8±21</u>	<u>0,01</u>
<u>PAD (mmHg)</u>	<u>77,3±16</u>	<u>80±16</u>	<u>71±16</u>	<u>0,19</u>
<u>Hypotension :</u> <u>nombre patients (%)</u>	<u>5(16,1%)</u>	<u>1(4,8%)</u>	<u>4(40%)</u>	<u>0,013</u>
<u>IVG : nombre</u> <u>patients (%)</u>	<u>4(12,9%)</u>	<u>0</u>	<u>4 (40%)</u>	<u>&lt;0,01</u>
<u>IVD : nombre</u> <u>patients (%)</u>	<u>5(16,1%)</u>	<u>0</u>	<u>5(50%)</u>	<u>&lt;0,01</u>
<u>EDC : nombre</u> <u>patients (%)</u>	<u>2(6,4%)</u>	<u>0</u>	<u>2(20%)</u>	<u>0,03</u>
<u>Pic de CPK (UI/l)</u>	<u>1886,35±629</u>	<u>1721,6±591</u>	<u>2232,3±590</u>	<u>0,03</u>
<u>BAV haut degré :</u>	<u>3(9,6%)</u>	<u>1(4,8%)</u>	<u>2(20%)</u>	<u>0,23</u>

FC : fréquence cardiaque, PAS : pression artérielle systolique, PAD : Pression artérielle diastolique, IVG : insuffisance ventriculaire gauche, IVD : insuffisance ventriculaire droite, CPK : créatinine phosphokinase , EDC : état de choca, BAV : bloc auriculo-ventriculaire, p : comparaison des groupes VD (+) et VD(-).

## 2- Données échocardiographique

L'échocardiographie transthoracique a été réalisée systématiquement chez tous les malades après un délai moyen de 22,58±13 heures par rapport au début de la douleur thoracique. Nous avons comparé les différents paramètres échocardiographiques chez les patients et les témoins et dans le groupe des malades entre ceux ayant présenté une extension électrique au ventricule droit (groupe VD+) et le reste des patients (groupe VD-).

a- Etude de la fonction systolo-diastolique du VG :

La fraction d'éjection du ventricule gauche chez nos patients était de 55,01±8,1% et elle était comparable entre les patients avec IDM du VD et le reste des patients. La vitesse de l'onde Sa à la paroi latérale était également comparable chez les 2 groupes, cependant la vitesse Sa à la paroi septale était significativement plus basse chez les patients avec atteinte du VD (p=0,02) (Tableau 2).

**TABLEAU 2 : ETUDE DE LA FONCTION SYSTOLIQUE DU VG SELON L'ATTEINTE ISCHEMIQUE DU VENTRICULE DROIT**

	<u>Témoins</u>	<u>Patients</u> (31 patients)	<u>VD(-)</u> (21 patients)	<u>VD (+)</u> (10 patients)
<u>FeVG(%)</u>	<u>63,83±6,12</u>	<u>55,01±8,17***</u>	<u>56,8±6,36</u>	<u>51,27±10,46</u>
<u>Sa latérale</u> (cm/s)	<u>13,51±2,29</u>	<u>12,1±3,1*</u>	<u>12,09±2,99</u>	<u>12,23±3,65</u>
<u>Sa septale</u> (cm/s=)	<u>11,2±1,05</u>	<u>9,9±2,08**</u>	<u>10,58±1,94</u>	<u>8,82±1,9α</u>

Comparaison entre les témoins et les patients \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 ; Comparaison entre les groupes VD+ et VD- : αp<0,05

Le trouble de la fonction diastolique le plus fréquent chez nos malades était le trouble de la relaxation (48,4%). Trois patients seulement avaient des pressions de remplissages élevées et ce sont tous des patients ayant présenté des signes d'IDM du VD. Il n'y avait pas par contre de différence significative concernant le type de profil mitral entre les 2 groupes (figure 6).

b- Etude de la fonction systolo-diastolique du VD :

- Etude de la fonction systolique du VD:

Le ventricule droit était plus significativement dilaté chez les patients ayant présenté un IDM du VD par rapport au reste des malades (STDVD:  $17,35 \pm 3,22 \text{ cm}^2$  vs  $13,6 \pm 3,66 \text{ cm}^2$ ;  $p=0,01$ ). La fraction de raccourcissement du VD était significativement plus basse chez les patients par rapport aux témoins et parmi les malades ce paramètre était plus altéré chez les patients ayant une extension électrique au VD comparés au reste des patients, mais sans différence significative. De même, la fraction d'éjection systolique du VD était plus basse chez les patients que chez les témoins avec une différence statistiquement significative ( $p=0,003$ ). Elle est encore plus altérée dans le groupe VD+ mais sans différence statistique comparés au groupe VD-.

Les paramètres étudiant la fonction systolique longitudinale du VD (TAPSE et vitesse du flux systolique à l'anneau tricuspide en doppler tissulaire (Sa)) étaient significativement plus diminués chez les patients comparés aux sujets sains. Ces paramètres étaient également plus altérés dans le groupe VD+ comparés au groupe VD- avec une différence statistique significative (tableau 3).

D'ailleurs, la vitesse de l'onde systolique à la paroi latérale du VD et le TAPSE sont fortement corrélés ( $p=0,006$ ,  $r=0,48$ ) alors que ses deux paramètres n'étaient pas corrélés ni à la FEVD ni à la FEVG.

- Etude de la fonction diastolique du VD:

L'analyse du flux tricuspide en doppler pulsé n'a pas relevé de différence statistique entre les patients et les témoins ni entre le groupe VD+ et le groupe VD-. Le rapport E/A tricuspide était significativement plus bas chez les malades comparés aux témoins ( $p=0,03$ ) mais l'atteinte électrique du VD ne semble pas influencer ce rapport qui est resté comparable entre le groupe VD+ et VD- ( $p=0,81$ )

Cependant en mode doppler tissulaire, la vitesse de l'onde Ea était significativement plus basse chez les patients que chez les sujets sains ( $p=0,001$ ) et chez les patients ayant une extension du VD que chez les patients sans extension au VD ( $p=0,002$ ). Il n'y avait pas de différence significative concernant la vitesse de l'onde Aa chez les patients présentant un IDM et chez les témoins et même au sein des 2 groupes de malades (tableau 4). En se basant sur le type de profil tricuspide, nous avons trouvé que le type de profil restrictif et pseudo-normal étaient significativement plus fréquents dans le groupe VD (+) que dans le groupe VD(-) (figure 6).

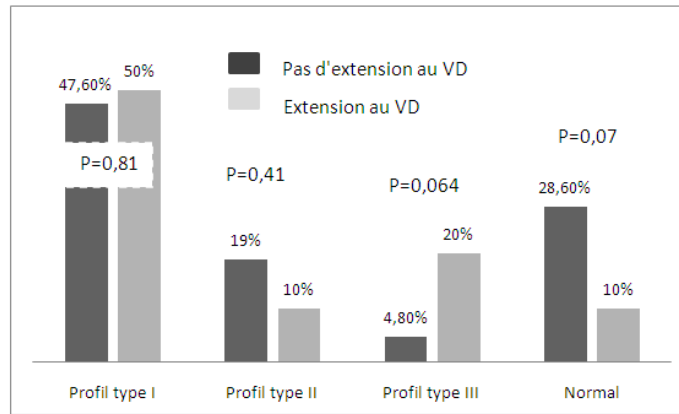
La surface de l'OD signe indirect des pressions de remplissages du VD était plus importante chez les patients que chez les témoins mais sans différence statistique significative alors que l'OD était significativement plus dilatée chez les malades avec IDM du VD par rapport au reste des patients ( $p=0,004$ ).

Tous ces éléments plaident en faveur de dysfonction diastolique plus marquée avec une élévation des pressions de remplissage plus importante chez les patients présentant une nécrose du VD.

➤ Index de Tei droit

L'étude de l'indice de Tei en doppler continu a relevé que ce paramètre était plus élevé chez les patients comparés aux sujets sains (respectivement  $0,4 \pm 0,11$  vs  $0,3 \pm 0,06$ ;  $p < 0,001$ ) et au sein des malades il était plus élevé dans le groupe VD(+) comparés au groupe VD(-) avec une différence statistiquement significative (respectivement  $0,48 \pm 0,12$  vs  $0,38 \pm 0,09$ ;  $p=0,01$ ).

En utilisant la courbe de ROC, nous avons trouvé qu'un indice de  $tei > 0,5$  permet de porter le diagnostic d'un IDM du VD avec une sensibilité de 40% et une spécificité de 91%. Cependant l'indice de Tei n'était pas corrélé à la vitesse de l'onde Sa à la paroi latérale du VD et à la valeur d'excursion de la paroi latérale de l'anneau tricuspide.



**FIGURE 6: COMPARAISON DU PROFIL MITRAL SELON L'EXTENSION ELECTRIQUE DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE INFERIEUR AU VENTRICULE DROIT**

**TABLEAU 3: ETUDE DE LA FONCTION SYSTOLIQUE DU VENTRICULE DROIT EN CAS D'INFARCTUS INFERIEUR DU MYOCARDE ETENDU OU NON ELECTRIQUEMENT AU VD**

	Témoins (30 sujets)	Patients (31sujets)	VD(-)	VD(+)
FRVD(%)	56,43±8,57	39,01±12,46***	41,21±13,13	34,39±9,96
FeVD(%)	66,57±6,49	51,13±11,65**	50,98±18,51	43,36±14,12
TAPSE (mm)	21,32±1,99	16,24±3,41***	18,15±2,12	12,22±1,45£££
Sa (cm/s)	18,55±1,8	15,72±4,16***	17,56±2,67	11,87±4,16£££

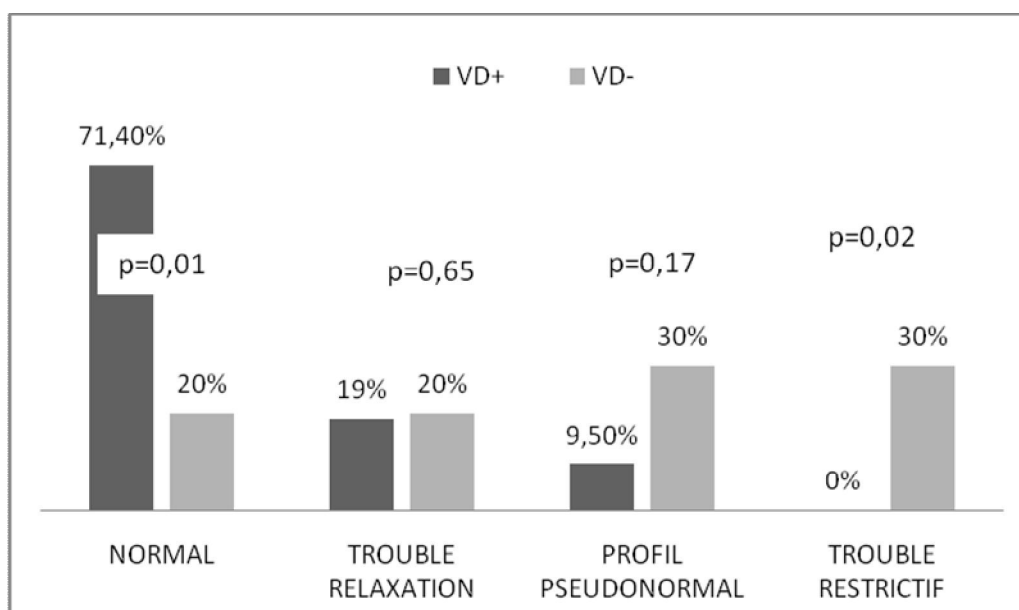
Comparaison entre les témoins et les patients \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 ; Comparaison entre les groupes VD+ et VD- : £ p<0,05, ££ p<0,01, £££ p<0,001



**TABEAU 4 : ETUDE DE LA FONCTION DIASTOLIQUE DU VD AU COURS DE L'IDM INFÉRIEUR**

	Témoins	Patients	VD(-) (21 patients)	VD(+) (10 patients)
E tricuspide (cm/s)	52,27±11,77	47,69±12,08	49,96±9,69	42,91±15,5
A tricuspide (cm/s)	42,97±12,1	45,16±10,5	46,67±10,25	42,01±10,84
E/A (tricuspide)	1,31±0,43*	1,09±0,33*	1,1±0,24	1,07±0,47
Ea paroi lat VD (cm/s)	17,16±4,06***	13,39±1,5***	15,02±4	9,96±3,27££
Aa paroi lat VD (cm/s)	20,02±2,59	19,35±5,58	20,27±5,88	17,42±4,56
Ea/Aa	0,87±0,25*	0,72±0,29*	0,78±0,3	0,59±0,23
E/Ea	3,21±1,01*	3,78±1,5*	3,6±1,36	4,44±1,69
Surface OD (cm <sup>2</sup> )	16,87±2,78	19,29±7	16,92±3,7££	24,28±9,61££

Comparaison entre les témoins et les patients \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 ; Comparaison entre les groupes VD+ et VD- : £ p<0,05, ££ p<0,01, £££ p<0,001



**FIGURE 7 : REPARTITION DU PROFIL TRICUSPIDE SELON L'EXTENSION OU NON DU VD AU COURS DE L'IDM INFÉRIEUR**

## DISCUSSION

L'extension au VD d'un IDM inférieur est d'un impact thérapeutique et pronostic considérables puisque d'un part cette entité impose d'éviter certains médicaments et d'autre part elle peut majorer le taux de complications à la phase aigue jusqu'à 9,7 fois et le taux de mortalité jusqu'à 5,1 fois (4). Le sus décalage de ST dans les dérivationes droites considéré dans plusieurs études (5,6) comme le gold standard dans le diagnostic d'IDM du VD est en effet un signe transitoire pouvant être absent chez la moitié des patients avec IDM du VD 10 à 12 heures après l'installation de la douleur (7). D'où l'intérêt d'un examen échocardiographique minutieux avec une évaluation précise de la fonction systolodiastolique du VD.

L'étude échocardiographique du VD n'est pas facile vu la complexité géométrique de cette cavité. Certains signes sont considérés comme des signes directs d'IDM du VD tels que l'akinésie de la paroi postérieure du VD présent dans 50% des cas (8), la dilatation du VD avec augmentation du rapport VD/VG, observé également dans 50% des cas et la présence d'un septum paradoxal qui est un signe moins spécifique (8,9). Dans notre série 3 patients seulement ont présenté une akinésie de la paroi postérieure du VD et aucun cas de SIV paradoxal. L'étude de la cinétique du VD est intéressante mais l'absence de trouble cinétique ne peut pas infirmer un IDM du VD.

L'étude de la fonction systolique du VD fait intervenir plusieurs paramètres selon les nouvelles recommandations (2), aucun paramètre à lui seul ne pourrait conclure du stade de la dysfonction systolique du VD, certains paramètres sont considérés comme peu ou pas valide comme la fraction d'éjection systolique selon la méthode de Simpson, au contraire la fraction de raccourcissement du VD, l'analyse de la fonction longitudinale par le TAPSE ou le pic de vitesse de l'onde S en doppler tissulaire sont les paramètres les plus retenus et les plus validés pour la détermination de la fonction systolique, cela dépend en fait de la cardiopathie sous jacente à étudier.

Selon le sous groupe de l'étude VALLIANT ECHO (10), incluant 522 patients hospitalisés pour infarctus du myocarde et ayant bénéficié d'une étude échocardiographique du VD, la fraction de raccourcissement du VD était considérée comme un facteur pronostic indépendant de la survenue d'insuffisance cardiaque, de mort subite, d'AVC et

mortalité à long terme après la survenue d'un infarctus du myocarde. La limite majeure pour ce paramètre est qu'il est très dépendent de l'opérateur puisque le VD est une cavité très trabéculée et la connaissance des limites de l'endocarde est très délicate. L'utilisation de contraste (11) et de détection automatique des bords de l'endocarde améliore significativement la qualité de l'image et la valeur diagnostic et rend ce paramètre bien corrélé à la fraction d'éjection isotopique ou réalisée par IRM. Dans notre série, la FRVD était plus basse chez les patients comparés aux sujets sains mais il n'y avait pas de différence statistique entre le groupe VD+ et VD-. En effet cette mesure se fait en coupe apicale 4 cavités et ne considère que la paroi latérale et septale du VD et donc une nécrose de la paroi antérieure ne sera pas prise en considération et peut aboutir à une fraction de raccourcissement normale en présence d'un IDM du VD. De plus dans une étude récente de Pinedo et al (12) ce paramètre est de reproductibilité médiocre puisque la variabilité inter-observateur est de 22% et la variabilité intra-observateur de 19%.

La mesure de l'excursion du plan de l'anneau tricuspide est une technique simple, non influencée par la structure complexe et la forme asymétrique du VD. Dans une étude récente (13), ce paramètre a été démontré bien corrélé à la fraction d'éjection isotopique du VD ( $r=0,92$ ,  $p<0,001$ ) et la fraction d'éjection déterminée par IRM ( $r^2=0,65$ ;  $p<0,0001$ ). Dans l'étude d'Alam et al (14), incluant 71 patients admis pour IDM, et dans l'étude de Kakouros et al (15) portant sur 38 patients atteint d'IDM inférieur, les auteurs ont démontré une diminution significative de l'amplitude du mouvement annulaire tricuspide chez les patients ayant une extension au VD par rapport au reste des malades. Ces constatations concordent avec les résultats de notre étude. Samed et al (16) ont trouvé une mortalité plus élevée chez les patients hospitalisés à la phase aigue d'un IDM inférieure à partir d'une valeur de  $TAPSE \leq 15$  mm. Certains échocardiographistes pensent que ce paramètre dépend énormément de l'angle de tir du TM à la paroi latérale du VD et donc peut être de reproductibilité médiocre mais dans l'étude de Pinedo et al (12), la variabilité inter-observateur de cette mesure était faible de 1,92 mm en absolue et de 11% en relatif ainsi que la variabilité intra-observateur était de 1,06 mm en absolue et de 6% en relatif ce qui prouve l'excellente reproductibilité de ce paramètre dans l'évaluation de la fonction du VD.

Le doppler tissulaire est une nouvelle technique qui a amélioré l'étude de la fonction du VD. Yilmaz et al (17) dans une série de 48 patients admis pour IDM inférieur, ont noté que la vélocité annulaire tricuspide systolique Sa est diminuée de façon significative chez les patients avec IDM du VD par comparaison aux patients sans atteinte du VD [(8,5±0,84cm/s vs 16,63±2,31cm/s, p<0,001]. Ces résultats sont concordent avec les données de notre série. Ozdemir et al (18) et ont montré que le seuil de Sa<12cm/s permet de diagnostiquer l'IDM du VD avec une sensibilité de 81% et une spécificité de 82%, alors que dans la série de kakouros et al (15) le même seuil avait une spécificité de 87% mais peu de sensibilité (43%). La mesure de la vitesse de pic de l'onde systolique Sa à la paroi latérale du VD semble bien validée pour le diagnostic de l'IDM du VD et elle est bien corrélée dans notre série à la valeur de TAPSE chez tous le malade. Ce paramètre est en plus bien reproductible puisque dans l'étude de Pinedo et al(12) la variabilité inter-observateur de 1,64 cm/s en absolue et de 11% en relatif et la variabilité intra-observateur de 0,9 cm/s en absolue et 7% en relatif.

En plus d'une dysfonction systolique l'IDM du VD s'associe constamment à une dysfonction diastolique. Dans les études antérieures (14,17,18), l'IDM du VD est associé à une diminution significative de la vitesse de l'onde proto-diastolique (E) du flux tricuspide et (Ea) en doppler tissulaire alors que l'onde télé-diastolique (A) ne semble pas être modifiée. Ces données sont en fait en concordance avec nos résultats, cependant ces mesures sont influencées par les conditions de charge et l'âge du patient.

L'index de Tei est très contributif dans l'évaluation du ventricule droit puisqu'il étudie à la fois la diastole et la systole. Il est en plus reproductible et peu dépendant de la qualité de l'image. Au cours de l'atteinte ischémique du VD, il y aura un allongement du temps de la relaxation isovolumétrique au dépend du temps de la contraction isovolumétrique ce qui aboutit à une élévation de cet index. Dans l'étude d'Ozdemir et al (18), cet indice était plus élevé chez les patients avec IDM du VD que chez le reste des patient, de plus un index>0,7 était en faveur de nécrose du VD avec une spécificité de 80% et une sensibilité de 94%. Dans la même étude, les auteurs ont comparés ce paramètre chez 3 groupes selon l'artère coupable de l'IDM au cours de l'angioplastie et ont conclut qu'un Index>0,7 est

aussi en faveur d'une lésion au niveau de la coronaire droite proximale avec une spécificité de 91%, une sensibilité de 78%. Alors que dans la série de kakouros et al (15), un indice de Tei droit>0,6 permet d'identifier l'IDM du VD avec une sensibilité de 78% et une spécificité de 61%. Dans notre série, cet indice était d'un grand intérêt dans le diagnostic de l'IDM du VD puisqu'un indice de tei>0,5 permet déjà de porter le diagnostic avec une spécificité de 91% mais une sensibilité modérée de 40%.

#### Limites de l'étude :

Ce travail comporte des limites représentées essentiellement par l'absence d'un suivi prospectif échocardiographique de cette population à fin de déterminer d'une part la valeur pronostique des paramètres échographiques identifiés et d'autres part l'évolution de la fonction ventriculaire droite à distance de l'infarctus. Cette population est en plus composée d'un faible échantillon, ce qui peut sous estimer sur le plan statistique les différences entre le groupe des patients ayant présenté une extension électrique au VD et le reste des patients.

#### **CONCLUSION**

L'atteinte du VD au cours de l'IDM inférieur conditionne le pronostic en particulier à la phase aigue. L'échocardiographie doppler en absence de signes clinique et électriques est un moyen facile et non invasif pour poser le diagnostic de l'IDM du VD à temps. L'excursion systolique de la paroi latérale de l'anneau tricuspide en mode TM, le pic de vitesse de l'onde systolique de la paroi latérale du VD en doppler tissulaire ainsi que l'indice de Tei en doppler continu ou tissulaire semblent les paramètres les plus contributifs au diagnostic. D'autres nouvelles techniques telles que « le strain », « le strain rate » et l'échocardiographie tridimensionnelle sont encore au cours d'évaluation mais semblent prometteuses.

#### **REFERENCES**

1. Abraham TP, Nishimura RA. Myocardial Strain: Can we finally measure contractility. J Am Coll Cardiol 2001;37:731-4.
2. Lawrence G, Waman W, Afilalo J et al. Guidelines for the Echocardiographic Assessment of the right Heart in Adults: A report from the American Society of Echocardiography. J Am Soc Echocardiogr 2010; 23:685-713.

3. Hugues T, Ducreux D, Bertora D, Berthier B, Lemoigne F, Padovani B. Évaluation de la fraction d'éjection ventriculaire droite par la mesure du déplacement de l'anneau tricuspide. *Ann Cardiol Angiol* 2010;59:61-66.
4. Pereira AC, Franken RA, Sprovieri SR, Golin V. Impact on hospital mortality and morbidity of right ventricular involvement among patients with acute left ventricular infarction. *Sao Paulo Med J*. 2006;124:186-91.
5. Candell-Riera J, Figueras J, Valle V, et al: Right ventricular infarction: Relationships between ST segment elevation in V4R and hemodynamic, scintigraphic, and echocardiographic findings in patients with acute inferior myocardial infarction. *Am Heart J* 1981;101:281-87.
6. Braat SH, Brugada P, Den DK, et al: Value of lead V4R for recognition of the infarct coronary artery in acute inferior myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1984; 53:1538-41.
7. Fijewski TR, Pollack ML, Chan TC, et al: Electrocardiographic manifestations: Right ventricular infarction. *J Emerg Med* 2002; 22:189-194.
8. Baudouy M, Benoît Ph, Blaive B et al. Le ventricule droit. *Medicoarma*, 330, Paris : Générale Graphique, 1995;96.
9. Alam M, Wardell J, Anderson E, Samed BA, Nordlander R. Right ventricular function in patients with first inferior myocardial infarction: Assessment by tricuspid annular motion and tricuspid annular velocity. *Am Heart J* 2000; 139:710-5.
10. Anaveker NS, Skali H, Bourgon M et al. Usefulness of right ventricular fractional area change to predict death, heart failure, and stroke following myocardial infarction (from the VALIANT ECHO study). *Am J Cardiol* 2008; 101:607-12.
11. VandenBosch AE, Meijboom FJ, McGhie JS, et al. Enhanced visualization of the right ventricle by contrast echocardiography in congenital heart disease. *Eur J Echocardiogr* 2004; 5:104-10.
12. Pinedo M, Villacorta E, Tapia C, Arnold R, López J, Revilla A, Gómez I, Fulquet E, San Román JA. Inter- and intra-observer variability in the echocardiographic evaluation of right ventricular function. *Rev Esp Cardiol*. 2010; 63:802-9.
13. Hugues T, Ducreux D, Bertora D et al. Evaluation de la fraction d'éjection ventriculaire droite par la mesure du déplacement de l'anneau tricuspide. *Ann Cardiol Angiol* 2010;59:61-66.
14. Alam M, Wardell J, Anderson E et al. Right ventricular function in patients with first inferior myocardial infarction: Assessment by tricuspid annular motion and tricuspid annular velocity. *Am Heart J* 2000;139:710-15.
15. Kakouros N, Kakouros S, Lekakis J, Rizos I, Cokkinos D. Tissue Doppler imaging of the tricuspid annulus and myocardial performance index in the evaluation of right ventricular involvement in the acute and late phase of a first inferior myocardial infarction. *Echocardiogr*. 2011;28(3):311-9.
16. Samad BA, Alam M, Jensen Urstad K. Prognostic impact of right ventricular involvement as assessed by Tricuspid annular motion in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2002;90:778-81.
17. Yilmaz M, Erol MK, Acikel M, Sevimil S, ALP N. Pulsed Doppler tissue imaging can help to identify patients with right ventricular infarction. *Heart vessels* 2003;18:112-6.
18. Ozdemir K, Altunkeser BB, İçli A, Ozdil H, Gok H. New parameters in identification of right ventricular myocardial infarction and proximal right coronary artery lesion. *Chest* 2003;124: 219-26.

# IS REDO MITRAL BALLOON VALVULOPLASTY AS SAFE AND EFFICIENT AS A FIRST PROCEDURE ?

DORRA ABID, AHMED SIALA, LEILA ABID, FATENTRIKI, TARAK SALLEMI, MALEKAKROUT, MOURADHENTATI, SAMIR KAMMOUN.

*Cardiology department, Hedi Chaker Hospital, 3029, Sfax, Tunisia*

## Summary

*Introduction:* Since its introduction in 1984, mitral balloon valvuloplasty became the treatment of choice for mitral stenosis. After a successful procedure, the major event on long follow up is restenosis which treatment is discussed between surgery or redo mitral balloon valvuloplasty (mbv).

*Methods:* Our study was a retrospective and descriptive one. In Hedichaker hospital between 1998 and 2008, 302 patients underwent ambv. Among these patients 35 required a new mitral balloon valvuloplasty during follow-up. In this study we report the immediate and long term results of this redo procedure and compare our results with the initial group of 302 patients who got a first mbv.

*Results:* Both groups were similar in terms of age (34 +/- 13 for de novo group versus 32 +/-11 for redo group) and female percentage 77 % vs 85 % (p=0,24). There was no difference between groups in term of pre procedural mitral valve area: (0.98 +/- 0.21 for the 302 patients and 1.01 +/- 0.20 for the 35 others), valve morphology quantified using the Wilkins score and pulmonary systolic pressures. The procedure was successful for 85 % of patients of the de novo group and only 77 % for the redo group (p =0.10). There was no exceed in major immediate complications such as hemopericardium, acute severe mitral regurgitation or death. During follow up eight cases or restenosis were noticed among the 35 patients group within a mean period of 20 months versus 41 cases in the other group. But the difference wasn't statistically significant.

*Conclusion:* Repeat mbv results in good immediate and long term outcomes with no exceed of complications especially in patients with favorable anatomic forms.

**Key words:** Mitral balloon valvuloplasty, restenosis, redux, mitral stenosis, rheumatic fever

## INTRODUCTION

Mitral stenosis became less and less frequent due to the decrease of rheumatic fever incidence but it is still frequent in developing countries where rheumatic fever is endemic (1). Since its introduction in 1984 (2), mitral balloon valvuloplasty became the treatment of choice of mitral stenosis with high rates of success and few complications (3). After a successful procedure, the major event on long follow up is restenosis which is used to be treated with mitral valve replacement. Nowadays redo mitral balloon valvuloplasty seems to be a good solution for this issue. The aim of this study was to prove that redo mbv is as safe and efficient as a first procedure.

## METHODS

Our study was descriptive and retrospective. In the cardiology department of HediChaker hospital, 302 patients underwent a mitral balloon valvuloplasty for the first time between 1998 and 2008 (group redo mbv). Among these patients, thirty five required a new valvuloplasty (group novo mbv). We compared these two groups in terms of epidemiologic, echographic, procedural characteristics and mbv results.

The demographic and clinical features were obtained through medical observations.

The echographic assessment of the mitral valve was performed with the transthoracic approach measuring mitral valve area using both methods: planimetry and the pressure half time by Doppler. Mean and maximum pressure gradients were measured. We searched for a concomitant mitral regurgitation, an aortic valve disease, a tricuspid regurgitation and calculated the level of systolic pulmonary pressure. The left atrium diameter and area were analyzed. We conclude the exam with the evaluation of the Wilkins score taking into account valve thickening and mobility, calcifications and sub valvular damage. The mitral valve was judged suitable for mbv if Wilkins score was less or equal than eight.

The trans esophageal approach was realized for all patients 24 hours before mitral balloon commissurotomy in order to exclude a left atrium thrombus considered as the main contraindication to mbv and to verify the regurgitation degree which is sometimes difficult to assess using only the trans thoracic approach.

All percutaneous mbv procedures were performed by the anterogradetransvenous approach using the Inoue balloon system.

The mitral valvuloplasty was judged successful if the mitral area became more than 1.5 cm<sup>2</sup> without an increase of mitral regurgitation under second degree. The immediate result evaluation was assessed by hemodynamic measurements in cath lab and 24 hours later using echography. The aim of echography was to measure the mitral area, assess commissure split and search an increase of mitral regurgitation degree.

Long term follow up was achieved using medical observations and sometimes phone calls. Regular echographic exams were performed. Restenosis was defined as a mitral area becoming less than 1.5 cm<sup>2</sup> after initially successful mbv.

Data were presented as mean  $\pm$  SD. Comparison of hemodynamic variables was done using student t-test and chi-square test. Kaplan-Meier estimates were used to determine freedom from restenosis and event-free survival

## RESULTS

Both groups were similar in terms of age, sex distribution, baseline mitral area, anatomic features, preexisting mitral regurgitation and level of pulmonary pressure. We noted a significant difference in atrial fibrillation at hospital admission: 26 % in group Novo mbv versus 8 % in group redo mbv. All these characteristics are summarized in table 1.

**Table 1: baseline demographic and echographic characteristics**

	Group novo mbv (302)	Group redomvb (35)	p
Age (years)	34.44 +/- 13	32.03 +/- 11	0.24
gender			
female	233 (77%)	30 (85%)	0.24
male	69 (23%)	5 (15%)	
Mitral area (cm <sup>2</sup> )	0.98 +/- 0.21	1.05 +/- 0.20	0.09
Wilkins <8	203 (67%)	22 (62%)	0.604
>8	99 (33%)	13 (38%)	
Mitral regurgitation	129 (42%)	9 (25%)	0.053
PAP (mmHg)	50.62 +/- 16.8	49.23 +/- 16.7	0.71
Atrial fibrillation	81 (26%)	3 (8%)	0.018

PAP : pulmonary artery pressure

Immediate results were evaluated directly in cath lab then with echography. We obtained a success rate of 87 % in group novo mbv versus 77% in group redo mbv but the difference wasn't significant. In the other hand we compared hemodynamic results and we noticed a better increase in mitral valve area for novo mbv group rising to 1.89 cm<sup>2</sup> versus 1.74cm<sup>2</sup> for group redo mbv (p = 0.017) and a lower level of atria pressure 13.78 mmhg for group novo mbv 16.59mmhg for group redo mbv (p= 0.019) whereas pulmonary pressure decreased with similar rates.

We noticed a little number of immediate complications summarized in table 3. We found only two cases of acute severe mitral regurgitation representing 5.7 % of the redo mbv group population versus 19 cases in group novo mbv(5%). This difference wasn't statistically significant. This mitral regurgitation was already present and increased after procedure in one case and was new in the second. These two patients underwent a mitral valve replacement after 4 and six months. One procedure was complicated by tamponade needing urgent surgery with a good late evolution.

**Table 2: Immediate echographic and hemodynamic results**

	Group novo mbv (302)	Group redo mbv (35)	p
Success (%)	262 (87%)	26 (77%)	0.104
Post procedural mitral area (cm <sup>2</sup> )	1.89 +/- 0.36	1.74 +/- 0.29	0.017
Post procedural atria pressure (mmHg)	13.78 +/- 6.47	16.59 +/- 5.59	0.019
PAP (mmHg)	35.43 +/- 12.8	33.38 +/- 7.6	0.38

**Table 3: Mitral balloon valvuloplasty immediate complications.**

Complications	Group novo mbv	Group redo mbv
Death	2(0.6%)	0
Embolism	2(0.6%)	0
Tamponade	1(0.3%)	1
Severe mitral regurgitation	17(5%)	2(5.7%)

Long follow up showed no differences between both groups. We noted no death in redo group in a mean follow up of 39.7 +/- 29 months. Eight patients developed restenosis in group redo mbv with a delay of 20 months (22.8%) versus 41 patients of group novo mbv (13.57 %) in a delay of 53 months. Among these eight patients four got a third mitral balloon valvuloplasty with a good result, one patient underwent a mitral valve replacement, two patients were lost on follow up and one patient refused surgery.

**Table 4: adverse events during long follow-up**

Events on follow up	Group novo mbv	Group redo mbv
Restenosis	41 (13.57%)	8 (22.8%)
New valvuloplasty	35 (11.5 %)	4 (11.4%)
Valve replacement	24 (7.9%)	1 (2.85%)

## DISCUSSION

Mitral balloon valvuloplasty is nowadays the treatment of choice for rheumatic mitral stenosis with high success rates related in all studies. It took the place of classic surgical commissurotomy. Restenosis is considered as the main cause of functional deterioration after a successful mbv (4). Restenosis rates range from 3 to 70 % with a one to three years delay (5) (6) (7). The most common mechanism is commissural refusion. In old studies, the mitral valve replacement (MVR) was considered as the only possible treatment for restenosis after surgical or percutaneous commissurotomy (8) because of the severity of the anatomic morphology. The problem is that surgical reintervention results in high operative risk and a lot of anti thrombotic therapy complications. The aim of our study was to prove that redo mbv was a good treatment for restenosis without major events. Few studies in literature reported results of repeat mitral balloon valvuloplasty after a successful initial procedure. Most of these studies included a small number of patients with a short follow up.

Our cohort included 35 patients with a mean age of 32 years and female were predominant with a sex ratio of 5.66. Our patients were younger than patients from occidental studies of Chmielak et al (9) or Pathan et al (10) and similar to Turkish Nuran et al (11) and Iranian Naser et al (12) studies.

Our population was characterized by a smaller number of patients with atrial fibrillation, more suitable valve anatomy attested with the Echo Wilkins score. Mitral valve area before procedure was at the same level than other authors.

**Table 5: epidemiologic and echographic characteristics from literature**

	<b>Our study</b>	<b>Lung et al (13)</b>	<b>Chmielak et al (9)</b>	<b>Naser et al (12)</b>	<b>Pathan et al (10)</b>	<b>Nuran et al (11)</b>
Number	35	53	67	25	36	20
Gender (f) %	85%	89%	-	-	75%	95%
Age (years)	32	39	52	40	58	37
AF %	8%	11%	41%	32%	61%	-
Wilkins >8	38 %	-	7.5 +/- 1.3	9.56	50 %	85 %
MVA (cm <sup>2</sup> )	1.05 +/- 0.22	1.03 +/- 0.22	1.17 +/- 0.16	0.97	1.1	1.2 +/- 0.2

MVA : mitral valve area; AF: Atrial fibrillation

Procedure success was defined as a mitral valve area becoming above 1.5 cm<sup>2</sup> without significant mitral regurgitation (14) (15). Our procedure was successful in 77 % of cases. Pathan et al (10) reported a success rate of 75 % but the population of his study was old (mean age 58 years) and most of them were in atrial fibrillation with an unfavorable valve anatomy. Lung et al (13) reported a higher success rate of 91 %. This rate is perhaps due to inclusion criteria. In fact Lung included young patients with commissural refusion and excluded patients with calcifications and comorbidities. Turkish study of Nuran et al (11) showed a success in 90 % of cases but this study included only 20 patients and excluded those in atrial fibrillation which is a condition known to have a poor prognosis value on immediate results (16). Fawzi et al (17) in their study between 1989 and 2003 included 56 patients. Procedure was done with a good result in 93 %. Fawzi et al demonstrated that suitable anatomic morphology was the strongest predictive factor of immediate results.

Severe mitral regurgitation represents the major complication of mitral balloon valvuloplasty and may lead to urgent surgery. Its frequency ranges from 1 to 10 % among studies about a first mitral valvuloplasty (18) (19). Due to the small number of patients in studies concerning redo mbv, we noticed few complications. Severe MR occurred in 2 cases over 53 in Lung (13) study, 1 case over 67 in Chmielak cohort (9) and 2 cases in our population. We noted a single case of tamponade and no death. These results prove that repeated valvuloplasty is a safe technique.

Long term follow up showed 8 cases of restenosis (22.8 %) in a delay of 20 months and needing

reintervention but no death occurred. Our follow up wasn't long enough after a redo mbv. Lung et al (13) reported a 74 % rate of survival without new intervention at 5 years. Chmielak et al (9) noted a rate of 77.3 % of survival with no need for mitral reintervention. Predictive factors of events like surgery or third mbv or heart failure in this last study were previous surgical commissurotomy and Wilkins score >7. Pathan et al (10) identified higher echographic scores, smaller post procedural mitral valve area and higher pulmonary pressure levels as factors of poor prognosis after redo mbv. These predictive factors are similar to those identified for first procedures (20) (21). Fawzi et al (17) reported a 40 % rate of restenosis on long follow up in his study over 56 patients. Turgeman et al (22) focused on the necessity to select the suitable patients for repeated mbv. The strongest predictive factor of success was the restenosis mechanism and the commissural refusion results in the best immediate and long term results. The valve anatomy includes also the subvalvular components which interfere with the final results. Repeated mitral balloon valvuloplasty is not the only treatment for restenosis following a first successful procedure. Many patients are referred to surgeons for usually a mitral valve replacement due to the valve anatomy judged unsuitable for a new mbv. In fact restenosis occurs more likely in older patients with high echographic scores. That's why most of the patients used to undergo surgery. Many studies compared results of redo mbv and surgery. Kim et al (23) demonstrated that redo mitral balloon valvuloplasty is doing as good as surgery in the first four years. Then surgery results seemed to turn better due to the frequent necessity for reintervention in the group of patients treated with a new mbv. 9 years survival free of adverse events



was 90 % in surgery group versus 36 % in redo group. Naser et al (12) reported high peri operative mortality for surgery (13.6 %) due to patients' selection. That why redo mbv is better in early follow up with lower rates of in hospital deaths. Mitral valvuloplasty costs also less than surgery in developing countries where rheumatic fever is still endemic and needs fewer days of hospitalization.

## STUDY LIMITATIONS

It is a monocentric retrospective study with a small number of patients and a relatively short follow-up. This makes statistical analyses harder and less reliable.

## CONCLUSION

Repeat mitral balloon valvuloplasty seems to be an efficient and a safe strategy for the treatment of restenosis after a first successful procedure. It is sure very important to include suitable patients with the optimal echographic characteristics and the commissural refusion as restenosis mechanism.

## CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest to declare

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Doctor Faïçal Elleuch who performed some of procedure for his friendliness and availability.

## REFERENCES

1. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K et al. *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC.* Eur Heart J 2012;33:1787–1847.
2. Lock JE, Khalilullah M, Shrivastava S, et al. Percutaneous catheter commissurotomy in rheumatic mitral stenosis. N Engl J Med 1985 et 313:1515–8.
3. Cohen DJ, Kuntz RE, Gordon SPF, et al. Predictors of long-term outcome after percutaneous mitral valvuloplasty. N Engl J Med 1992 et 327:1329.
4. Iung B, Cormier B, Ducimetière P et al. Résultats à 5 ans de la commissurotomie mitrale percutanée à partir d'une série de 606 patients. Arch Mal Coeur 1996 (89): 1591–8.
- 5- Song J-K, Song J-M, Kang D-H, et al. Restenosis and adverse clinical events after successful percutaneous mitral valvuloplasty: immediate post-procedural mitral valve area as

an important prognosticator. Eur Heart J. 2009 May et 30(10):1254-62.

- 6- Wang A, Krasuski RA, Warner JJ, et al. Serial echocardiographic evaluation of restenosis after successful percutaneous mitral commissurotomy. J Am Coll Cardiol. 2002 Jan 16 et 39(2):328-34.
- 7- Lau KW, Ding ZP, Quek S, Kwok V, Hung JS. Long-term (36 - 63 months) clinical and echocardiographic follow-up after Inoue balloon mitral commissurotomy. Cathet Cardiovasc Diagn. 1998 Jan et 43(1):33-8.
8. Cohen DJ, Kuntz RE, Gordon SPF et al. Predictors of long-term outcome after percutaneous balloon mitral valvuloplasty. N Engl J Med 1992;327(19):1329-35
9. Chmielak Z, Klopotoski M, Kruk M, Demkow M, Konka M, Chojnowska L, Hoffman P, Witkowski A, Ruzyllo W. Repeat Percutaneous Mitral Balloon Valvuloplasty for Patients with Mitral Valve Restenosis. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 2010; 76:986–992.
10. Pathan AZ, Mahdi NA, Leon MN, et al: Is redo percutaneous mitral balloon valvuloplasty (PMV) indicated in patients with post-PMV mitral restenosis?. JAmCollCardiol 1999 ; 34:49–54.
11. Yazıcıoğlu N, Arat Ozkan A, Orta Kılıçkesmez K et al. Immediate and Follow-Up Results of Repeat Percutaneous Mitral Balloon Commissurotomy for Restenosis After a Successful First Procedure. *Echocardiography* 2010;27(7):765-9
12. Aslanabadi N, Golmohammadi A, Sohrabi B, Kazemi B. *Repeat Percutaneous Balloon Mitral Valvotomy vs Mitral Valve Replacement in Patients With Restenosis After Previous Balloon Mitral Valvotomy and Unfavorable Valve Characteristics.* Clin. Cardiol 2011; 34( 6) 401–406.
13. Iung B, Garbarz E, Michaud P, et al: Immediate and midterm results of repeat percutaneous mitral commissurotomy for restenosis following earlier percutaneous mitral commissurotomy. Eur Heart J 2000 ;21:1683–1689.
14. Palacios IF. Farewell to surgical mitral commissurotomy for many patients. *Circulation* 1998;97:223-226.
15. Block PC, Tuzcu EM, Palacios IF. Percutaneous mitral balloon valvotomy. *Cardiol Clin.* 1991;9:271-287.
16. Leon MN, Harrell LC, Simosa HF et al. Mitral Balloon Valvotomy for Patients With Mitral Stenosis in Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1145–52
17. Fawzi ME, Hassan W, Shoukri M et al. Immediate and long-term results of mitral balloon valvotomy for restenosis following previous surgical or balloon mitral commissurotomy. *Am J Cardiol* 2005;96:971–975
18. Iung B, Nicoud-Houel A, Fondard O, et al. Temporal trends in percutaneous mitral commissurotomy over a 15-year period. *Eur Heart J* 2004;25 (8): 701-707.
19. Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease. The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology 2007.
20. Chmielak Z, Kruk M, Demkow M, Klopotoski M, Konka M, Ruzyllo W. Long-term follow-up of patients with percutaneous mitral commissurotomy. *Kardiologia Pol* 2008 ; 66:525–530.
21. Iung B, Garbarz E, Michaud P et al. Late results of percutaneous mitral commissurotomy in a series of 1024 patients. Analysis of late clinical deterioration: Frequency, anatomic findings, and predictive factors. *Circulation* 1999;99:3272–3278.

# MUTATIONS DU GENE KRAS CHEZ LES PATIENTS DU SUD TUNISIEN ATTEINT DE CANCER COLORECTAL: SIGNIFICATION CLINIQUE

R. ABDELMAKSOU-DAMMAK<sup>1</sup>, A. SAADALLAH-KALLEL<sup>1</sup>, I. MILADI-ABDENNADHER<sup>1</sup>, A. KHABIR<sup>2</sup>,  
T. SALLEMI-BOUDAWARA<sup>2</sup> ET R. MOKDAD-GARGOURI<sup>1</sup>

*1 : Centre de Biotechnologie de Sfax, laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes, Sfax ;  
université de Sfax, BP"K"3038, Sfax –Tunisie.*

*2 : Service d'Anatomopathologie, CHU Habib Bourguiba, Sfax.*

## Résumé

Les mutations du gène KRAS se produisent dans environ 50% des cancers colorectaux (CCR) et sont associées à une prolifération anarchique et à un échappement à l'apoptose. Dans cette étude, nous avons recherché des mutations au niveau de l'exon 2 du gène KRAS dans 37 tumeurs de patients atteints de CCR sporadique, originaires du sud tunisien, afin de chercher des corrélations entre l'état muté de KRAS et les paramètres clinicopathologiques de nos patients. En comparaison avec KRAS de type sauvage, les tumeurs avec KRAS muté avaient plus fréquemment une taille de la tumeur > 5 cm ( $p = 0,036$ ), une invasion des ganglions lymphatiques ( $p = 0,032$ ), un stade TNM avancé ( $p = 0,009$ ) et une inflammation du stroma ( $p = 0,009$ ). Nous suggérons que les mutations du gène KRAS sont donc corrélées à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un cancer colorectal

**Mots clés:** cancer colorectal, KRAS, mauvais pronostic.

## Summary

KRAS mutation occurs in 50% of colorectal cancers (CRC) and has been suggested to be associated with proliferation and decreased apoptosis. In this study, we analyzed the mutational state of KRAS in 37 CRCs and compared the clinicopathological features between KRAS-mutated and wild-type CRCs. KRAS-mutated CRCs had a tumor size > 5 cm ( $p=0.036$ ), lymph node involvement ( $p = 0.032$ ), advanced TNM stage ( $p = 0.009$ ) and stromal inflammation ( $p = 0.009$ ). We concluded that KRAS mutation are correlated with poor prognostic in colorectal cancer patients.

**Key words:** Colorectal cancer, KRAS, Poor prognostic.

## INTRODUCTION

Le cancer colorectal (CCR) représente un problème majeur de santé publique, en particulier dans les pays développés [1]. Les mécanismes génétiques de la séquence adénome-carcinome dans ce cancer ont déjà été bien définis [2]. Bien qu'il ait été suggéré que dans la progression du CCR, l'accumulation de mutations multiples dans un grand nombre d'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur est plus pertinente que la séquence réelle des événements, il a également été rapporté que les mutations qui touchent un gène ou un autre ont des impacts différents sur la progression de la maladie [3]. La croissance et la progression de l'adénome est souvent accompagnée par des altérations dans le gène KRAS, suivie par la perte d'autres gènes suppresseurs de tumeur. Ces événements sont à la base de la transformation maligne dans les adénocarcinomes localement invasifs [3].

Le gène KRAS est un oncogène qui appartient à la famille des gènes ras (H-, Ki et N-ras). Il code pour une protéine avec un poids moléculaire de 21 KDa, située à l'intérieur de la membrane plasmique interne (liaison guanosine triphosphate/guanosine diphosphate) et qui module la prolifération et la différenciation cellulaire [4]. Les mutations oncogéniques de KRAS se produisent au début de la cancérogenèse colorectale et ont été identifiées dans 35-42% des CCRs et 50% des tumeurs de phénotype CIN [5-7]. Près de 97 % de ces mutations sont causées par 7 différentes substitutions de paires de bases de l'ADN dans les codons 12 et 13 de l'exon 2, résultant en une substitution d'acide aminé dans la protéine [8]. Ces mutations peuvent aussi toucher, mais moins fréquemment, le codon 61 [8].

Selon les études, la valeur pronostique des mutations KRAS dans l'évolution du CCR est actuellement incertaine et contradictoire [8-12]. Cependant, il est bien établi que les mutations du gène KRAS ont des conséquences biologiques et fonctionnelles qui pourraient influencer le choix du protocole thérapeutique dans le CCR [13].

En effet, la présence de ces mutations dans la tumeur est responsable de l'activation des protéines RAS et MAPK en aval de l'EGFR, provoquant l'activation constitutive des voies de signalisation dépendantes du récepteur EGFR [14]. Ainsi, la valeur prédictive et pronostique des mutations de KRAS semble importante uniquement chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique traités avec un anticorps anti-EGFR [14].

L'objectif de la présente étude était d'étudier le statut mutationnel du gène KRAS, afin de savoir si les mutations sont en corrélation avec le comportement clinique et le pronostic des patients du Sud Tunisiens atteint de cancer colorectal sporadique.

## MATERIEL ET METHODES

### *Caractéristiques des patients :*

Un total de 37 adénocarcinomes primaires sporadiques ont été collectés entre Janvier 2003 et Décembre 2007, de patients ayant subi une résection chirurgicale radicale au service de chirurgie digestive du CHU Habib Bourguiba (Sfax, Tunisie). Aucun des patients n'a eu une chimiothérapie préopératoire ou postopératoire. Au moment de la chirurgie, l'âge des patients allait de 35 à 81 ans (moyenne 62,4 an) et le sex-ratio était de 1:1,17. Les sous-types histologiques ont été classés selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les carcinomes ont été organisés selon le stade TNM.

### *Analyse des mutations :*

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée par la méthode phénol/chloroforme [15], à partir de 23 échantillons congelés et 14 échantillons inclus dans la paraffine. La quantité d'ADN a été vérifiée par NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) et stocké à -20 ° C pour une utilisation ultérieure.

L'exon 2 du gène KRAS a été amplifié en utilisant les amorces oligonucléotidiques spécifiques F «5'-GCCTGCTGAAAATGACTGAA-3'» et R «5'-AGAATGGTCCTGCACCAGTAA-3'».

Les réactions de PCR contenaient chacune 0,2 uM de chaque amorce, 200 uM de dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampon 1XPCR, 1 unité de Taq DNA polymérase (Fermentas) et 100 ng d'ADN dans un volume total de 50 ul. Le programme de PCR était de 5min à 94°C ; 35 cycles de 30 s à 94 ° C, 30 s à 57°C et 30 s à 72 ° C, puis 7 min à 72 ° C. Le produit de PCR de 167 pb de KRAS a été purifié puis séquencé automatiquement dans les deux directions à l'aide du kit de séquençage « BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit » sur « ABI 3130 Genetic Analyser » (Applied Biosystems, CA, USA).

*Analyse statistique :*

La signification statistique de l'association entre le statut mutationnel de KRAS et les paramètres clinico-pathologiques a été évaluée par le test chi carré. La survie globale a été analysée par la méthode de Kaplan-Meier et les différences dans les courbes de survie ont été comparées par le test du log-rank. L'analyse a été réalisée en utilisant le logiciel SPSS version 20.0.

**RESULTATS**

*Analyse des mutations de KRAS*

Dans le présent travail, la recherche de mutations au niveau des codons 12 et 13 de l'exon 2 du gène KRAS a été réalisée sur 37 échantillons tumoraux. 15,38% des échantillons investigués présentaient des mutations (6/37) (Tableau 1).

Le séquençage des produits de PCR a permis de détecter la présence de deux mutations à l'état hétérozygote: au niveau du codon 12: p. G12D (c.35G> A) et le codon 13: p.G13D (c.38G> A) (Figure 1).

*Corrélations des mutations de KRAS avec les paramètres clinico-pathologiques*

Nous avons trouvé une corrélation significative des mutations du gène KRAS avec différents paramètres clinico-pathologiques : la taille de la tumeur > 5 cm (p = 0,036), l'invasion des ganglions lymphatiques (p = 0,032), le stade TNM avancé (p = 0,009) et le grade élevé d'inflammation du stroma (0,009) (Tableau 2).

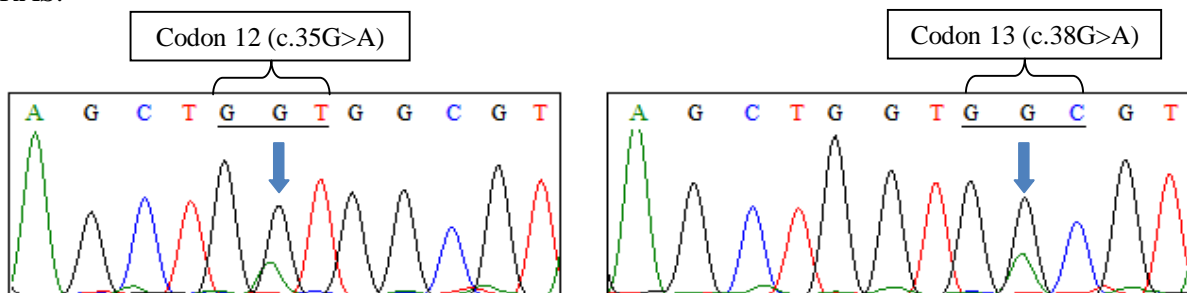
*Corrélations des mutations de KRAS avec la survie globale des patients*

En utilisant la méthode de Kaplan-Meier, nous avons analysé la relation entre la survie des patients et la présence de mutations dans le gène KRAS. Cependant, les données de survie étaient disponibles seulement pour 12 des 35 échantillons testés. Nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les tumeurs avec KRAS muté et la survie globale des patients porteurs de ces mutations.

**Tableau 1:** Mutation identifiées dans KRAS et leurs fréquences dans le CCR

Mutation KRAS	Changement Nucléotidique	N	Fréquence dans CCR [20]
G12D	c.35G>A	3	33.5%
G13D	c.38G>A	3	18.94%

**Figure 1:** Chromatogrammes montrant les mutations des codons 12 et 13 identifiées dans le gène KRAS.



**Tableau 2:** Associations des mutations de KRAS avec les paramètres clinico-pathologiques des patients.

<i>Paramètres Clinico-pathologiques</i>	<i>Total</i>	<i>Statut Mutationnel</i>		<i>p-valeur</i>
		<b>Mutant</b>	<b>Sauvage</b>	
<b>Patients</b>	<b>37</b>	6	31	
<b>Genre</b>				0.498
Homme	20	4	16	
Femme	17	2	15	
<b>Age (an)</b>				0.959
≤60	12	2	10	
>60	25	4	21	
<b>Taille Tumorale (cm)</b>				<b>0.036</b>
<5	20	1	19	
≥5	16	5	11	
<b>Stade TNM</b>				<b>0.009</b>
I+II	15	1	14	
III	7	3	4	
IV	5	0	5	
<b>Invasion lymphatique</b>				<b>0.032</b>
N0	23	2	21	
N1	10	4	6	
<b>Invasion Vasculaire</b>				0.173
Absent	20	5	15	
Présent	6	0	6	
<b>Inflammation du Stroma</b>				<b>0.009</b>
Importante	5	3	2	
Moyenne	8	0	8	
Faible	5	0	5	
<b>MSI</b>				0.639
MS-Low/MS-Stable	13	3	10	
MSI-High	7	1	6	

## Discussion

Les mutations du gène KRAS se produisent au début de la cancérogenèse colorectale et causes une expression dérégulée de plusieurs protéines oncogéniques [3]. La recherche de mutations au niveau des codons 12 et 13 de l'exon 2 du gène KRAS a montré la présence de deux mutations à l'état hétérozygote au niveau du codon 12 (G12D) et codon 13 (G13D). Pour ces mutations, il a déjà été établie que les traitements par l'Erlotinib / Géfitinib, qui sont EGFR-TKI (inhibiteur de la tyrosine kinase), ne sont pas efficaces pour le cancer colorectal métastatique [14]. Cependant, le traitement par des inhibiteurs de l'EGFR ne semble pas avoir la même valeur pronostique dans les cancers colorectaux métastatiques, selon le type de mutation identifié [16]. En effet, chez les patients porteurs de la mutation G13D, une thérapie avec le cetuximab (inhibiteur d'EGFR) combiné avec la chimiothérapie a donné une amélioration de la survie sans rechute et de la survie globale par rapport aux patients présentant d'autres mutations du gène KRAS, alors qu'aucune différence significative n'a été retrouvée pour les patients avec KRAS sauvage [17-19].

Par ailleurs, nous avons observé une association significative entre les mutations KRAS et diverses caractéristiques clinico-pathologiques. En fait, nous avons trouvé une corrélation significative des mutations KRAS avec la taille de la tumeur > 5 cm ( $p = 0,036$ ), l'invasion des ganglions lymphatiques ( $p = 0,032$ ), le stade TNM avancé ( $p = 0,009$ ) et le grade d'inflammation développée du stroma ( $0,009$ ), ce qui est cohérent avec le fait que le gène KRAS muté est un facteur de mauvais pronostic dans CCR. Ces résultats sont en ligne avec plusieurs études. En effet, Barault *et al.* ont montré que les mutations du gène KRAS sont en corrélation avec une faible survie dans une série de patients atteint de cancers du côlon [11]. De même, Conlin *et al.* ont observé que les patients qui présentent une mutation de KRAS ont un pronostic nettement plus grave que ceux sans mutations [12].

En conclusion, notre travail est une ébauche à l'étude de la relation entre les mutations de KRAS et leurs effets sur le mécanisme de la cancérogenèse, chez les patients du sud tunisien atteints de CCR. Cependant, nous devons confirmer nos résultats sur une population plus large.

## REFERENCES

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 33-64.
2. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
4. Khosravi-far R, Der CJ. The ras signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13: 67-89.
5. Bos JL, Fearon ER, Hamilton ER, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ *et al.* Prevalence of ras mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-297.
6. Boughdady IS, Kislinda AR, Haboubi NY, Schofield PF. K-ras gene mutation in adenomas and carcinomas of the colon. *Surg Oncol* 1992; 1: 275-282.
7. Finkelstein SD, Sayeg R, Christensen S, Swalsky PA. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1993; 71: 3827-3838.
8. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D *et al.* Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28(3): 466-74.
9. González-Aguilera JJ, Oliart S, Azcoita MM, Fernández-Peralta AM. Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol* 2004; 27(1): 39-45.
10. Bazan V, Agnese V, Corsale S, Calò V, Valerio MR, Latteri MA *et al.* Specific TP53 and/or Ki-ras mutations as independent predictors of clinical outcome in sporadic colorectal adenocarcinomas: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) prospective study. *Ann Oncol* 2005; 16 (4): 50-55.
11. Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM *et al.* Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer* 2008; 122(10): 2255-9.
12. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005; 54(9): 1283-6.
13. Yokota T. Are KRAS/BRAF mutations potent prognostic and/or predictive biomarkers in colorectal cancers? *Anticancer Agents Med Chem* 2012; 12: 163-71.
14. Rothenberg ML, LaFleur B, Levy DE, Washington MK, Morgan-Meadows SL, Ramanathan RK *et al.* Randomized phase II trial of the clinical and biological effects of two dose levels of gefitinib in patients with recurrent colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23(36): 9265-74.
15. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY; Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; 6-4.

16. Mao C, Huang YF, Yang ZY, Zheng DY, Chen JZ, Tang JL. KRAS p.G13D mutation and codon 12 mutations are not created equal in predicting clinical outcomes of cetuximab in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer* 2013; 119(4): 714-21.
17. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S et al. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 2010; 304(16): 1812-20.
18. Bando H, Yoshino T, Shinozaki E, Shinozaki E, Nishina T, Kadowaki S et al. Clinical outcome of Japanese metastatic colorectal cancer patients harbouring the KRAS p.G13D mutation treated with cetuximab + irinotecan. *Jpn J Clin Oncol.* 2012; 42(12):1146-51.
19. Tejpar S, Bokemeyer C, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Van Cutsem E. Influence of KRAS G13D mutations on outcome in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol* 2012; 30(29): 3570-3577.
20. Faulkner NE, Da Silva MM, Heim RA, Horten BC, Rohlfs EM, Rosenblum LS et al. KRAS mutation analyses of more than 16,500 colorectal carcinomas. *Molecular Markers Abstract* 2010; 96.

# LA REPARATION DES TRAUMATISMES DORSOLOMBAIRES, EN DROIT TUNISIEN : A TRAVERS UNE ÉTUDE DE 100 EXPERTISES\*

ZOUHIR KHEMAKHEM<sup>1</sup>, HOUJEM GHORBEL<sup>2</sup>, MOHAMED HEDI KALLEL<sup>3</sup>, SAMYA MAROUAN<sup>4</sup>, MOHAMED ZAHER BOUDAOUARA<sup>5</sup>

*1-Service de Médecine Légale, CHU Habib BOURGUIBA 3029 Sfax*

*2-Médecine de Contrôle, CNAM, Sfax Centre*

*3-Service de Rhumatologie, CHU Hédi CHAKER 3029 Sfax*

*4- Service de Médecine du Travail, CHU Abderrahman MAMI Ariana Tunis*

*5- Service de Neurochirurgie, CHU Habib BOURGUIBA 3029 Sfax*

*Faculté de Médecine de Sfax, Université de Sfax –TUNISIE-*

## Résumé

Quelle réparation attendue et pour quelle victime de traumatisme dorsolombaire ?

Questions posées et réponses escomptées par tant les médecins experts, les médecins administrateurs, les avocats des parties, les magistrats, que les assureurs impliqués dans la procédure.

Ce travail permettra de comprendre tant le profil victimologique, que les problématiques éventuellement posées par la réparation des victimes de ce type de traumatisme en droit tunisien.

## Summary

Repaired victims, of road accidents and work accidents in Tunisia, are regalement by specifics laws. This paper expose some problematic, about lumbar trauma.

Profile of victims and philosophical reparation of they victims well be analyzed.

## 1-INTRODUCTION

Les traumatismes dorsolombaires constituent une entité fréquente en traumatologie, toute forme médico-légale confondue, en Tunisie.

Les Accidents de la Voie Publique (AVP) sont les plus pourvoyeurs de ces traumatismes, suivis par les Accidents du Travail (AT).

Les problématiques posées par ce type de traumatisme sont les suivants : Quel bilan séquellaire prévu ? Quelle évaluation de l'Incapacité Permanente Partielle (IPP) attendue ?

Quel profil victimologique des traumatisés dorsolombaires, en Tunisie.

Les objectifs de cet article sont de savoir le Dommage Corporel Conséquent à ce type de traumatisme et de déduire les taux d'IPP, selon le cadre juridique, actuellement en vigueur en Tunisie.

## 2-PATIENTS ET METHODES

Il s'agit d'une étude rétrospective, sur une période de 4 ans, allant de 2010 – 2013, à partir de

l'activité expertale menée au CHU Habib BOURGUIBA de Sfax.

Nous avons choisi comme critères d'inclusion les paramètres victimologiques et médico-légaux (durée de repos, date de consolidation, taux d'IPP, préjudices annexes), figurant sur les données recueillies des expertises en matière d'AVP et d'AT, menées par un ou trois experts judiciaires près des tribunaux de Sfax (Capital du Sud Tunisien) et des sociétés d'assurances.

Nous avons opté comme critères d'exclusion les paramètres suivants : lorsque la durée de repos et des soins est inférieur à 5 jours, ou lorsque le patient n'est pas encore consolidé au moment de l'expertise, ou lorsque les lésions dorsolombaires relèvent des agressions et d'autres accidents de la vie courante.

## 3-RESULTATS

Sur les 100 expertises médico-légales, nous avons trouvé 68 patients de sexe masculin, contre 32 de sexe féminin, avec un sex-ratio égal à 2.12.



L'âge des patients de notre série est réparti globalement en :

- Adultes > 18 ans = 92 cas
- Enfants = 8 cas
- Adultes en plein âge d'activité (20-45 ans) = 86 cas, (parmi les 92 cas)

La durée de repos initialement attribué à ces patients va de 9 jours, jusqu'à 120 jours, avec une durée de repos moyenne de 15 à 30 jours.

Le traumatisme rachidien a été isolé ou quasi unique chez 24 patients, alors qu'il était associé chez 76 patients, sachant que le traumatisme crânien a été associé chez 67 patients de notre série.

Sur le plan des formes médico-légales, les AVP ont touché 72 patients de notre série, alors que les AT ont été responsables de 28 victimes de traumatismes dorsolombaires.

Quant au bilan séquellaire, nous avons inventorié des séquelles dorsolombaires uniques dans 38 % des cas, ou associées dans 62 % des cas.

Pour les séquelles dorsolombaires observées, nous avons noté une douleur avec une raideur minime chez 51 patients, une douleur avec raideur moyenne chez 37 patients et une douleur avec raideur importante chez 11 patients.

Il est à noter qu'un patient a présenté une aggravation d'un état antérieur (hernie lombaire intra spongieuse).

Pour les séquelles associées, elles ont été dominées par le syndrome subjectif des traumatisés du crâne, observé sur 60 victimes, vient ensuite la douleur associée à une raideur des membres dans 18 % des cas, et enfin la douleur plus ou moins une note de raideur cervicale, observée chez 12 patients.

La consolidation médico-légale a été fixée par le ou les médecins experts, d'une façon moyenne, entre 6 mois et 1 an pour les AVP, alors qu'elle était en moyenne entre 1an et 2ans pour les AT.

Pour le taux d'incapacité permanente partielle (IPP), il variait de 0 % à 95 %, avec un taux moyen, allant de 8 à 15%.

D'une façon comparative pour les taux d'IPP attribués par les médecins experts, selon les formes et les cadres médico-légaux, nous avons trouvé les considérations médico-légales suivantes:

Pour l'IPP en matière d'AVP, les affaires ont été traduites devant des instances judiciaires civiles de Réparation Juridique du Dommage Corporel dans les ¾ des cas, suivies par la procédure à l'amiable, devant les sociétés d'assurances dans un ¼ des cas.

Dans ce domaine, les IPP partent de 0 % (en l'absence de toute séquelle objective ou subjective, alléguée par le sujet expertisé) à 95 % (séquelles très graves et invalidantes, avec troubles sexuels et sphinctériens graves notés chez une victime).

L'IPP a été en moyenne de 10 à 25 %.

Quant aux préjudices annexes, c'est, essentiellement, le préjudice moral et esthétique qui est dans 80% modéré, et le préjudice professionnel qui est moyen dans 84%.

En matière des accidents du travail (AT), nous avons noté un recours judiciaire contre la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie (CNAM) dans 90 % des cas, avec un taux d'IPP compris entre 12 % à 50 %, et un taux d'IPP moyen, allant de 15 à 25 %.

## 4-DISCUSSION

### 4-1-SUR LE PLAN VICTIMOLOGIQUE

Nous avons constaté que la fréquence d'âge des patients de notre série, est comprise entre 20 et 45 ans, ce qui représente le plein âge d'activité socioprofessionnelle.

Ce résultat est bien corroboré avec celui de l'Observatoire National des Accidents de Circulation en Tunisie pour ces dernières années [1-3].

Par ailleurs, il existe une prédominance masculine, toutes formes médico-légales confondues. En effet, les AVP (avec les ¾ des cas), ainsi que les AT (avec le ¼ des cas) en Tunisie, tout comme dans le reste du monde sont plus frappant pour les personnes de sexe masculin, étant données leurs plus de facteurs exposant à ces types d'accidents.

Sur le plan de sémiologie médico-légale, si le bilan lésionnel initial figurant sur les certificats médicaux initiaux est déterminant pour l'imputabilité des séquelles, éventuellement, au traumatisme dorsolombaire, la gravité de ce dernier n'est pas toujours déterminante pour la constatation des séquelles dorsolombaires.

Par conséquent, il n'existe pas toujours une corollaire entre la gravité du traumatisme initial et la séquelle, éventuellement, observée sur la même victime [4].

Les dites séquelles dorsolombaires vont de la simple lombalgie, sans raideur rachidienne, à celle associée à une raideur variant de la discrète, passant par la minime, modérée, moyenne, peu importante, jusqu'à l'importante, avec possibilité d'ankylose rachidienne.

Il peut s'agir, par ailleurs d'une hernie discale, plus ou moins associée à une lombosciatique, plus ou moins associée à des troubles sphinctériens et ou sexuels, selon la gravité des séquelles dorsolombaires, des niveaux médullaires atteints et des interventions subies par cette victime.

Bref, la séquelle dorsolombaire peut aller de la simple douleur à la paraplégie avec troubles neurologiques sphinctériens et sexuels.

Nous pensons que la prévention, des séquelles dorsolombaires, passe, inéluctablement, par la prévention des accidents de la vie courante, et surtout dans notre contexte tunisien par la prévention des AVP et des AT.

La prévention des AVP trouve sa place, grâce au respect des règles élémentaires de la sécurité routière, telles que la marche sur les bas côté pour les piétons, le port du casque pour les motocyclistes, le port des ceintures de sécurité, tant pour le conducteur que les passagers des véhicules, la limitation des vitesses, et le respect total et absolu du code de la route par tous les intervenants.

Quant à la prévention des AT, c'est surtout le respect des règles élémentaires de la sécurité au travail, selon les spécificités de chaque profession. Par exemple, la construction d'échafaudages, pour les travailleurs du secteur du Bâtiment, est utile pour prévenir toute sorte de chute...

#### **4-2-SUR LE PLAN DE REPARATION DU DOMMAGE CORPOREL**

Pour le AVP, la réparation a été judiciaire d'emblée, dans les  $\frac{3}{4}$  des cas, puis la réparation a été choisie par les victimes, à l'amiable ; sachant qu'elle soit entre les mains propres de l'assureur, dans le  $\frac{1}{4}$  des cas. Cet assureur jouera le rôle tant de conciliateur que de régulateur.

Le recours judiciaire, après instance d'amiable, a été adopté par les victimes, en consultant leurs avocats de défense, dans 15 % des cas, et ce, surtout lorsque ces victimes se sentent insatisfaites de leurs réparations initiales par les caisses d'assurance.

Pour les AT, la réparation administrative par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie (CNAM), a été menée d'emblée, dans les  $\frac{4}{5}$  des cas, suivie par la réparation judiciaire d'emblée, dans le  $\frac{1}{5}$  des cas, soulignant ainsi le droit de la sécurité sociale [5].

Le recours judiciaire, après instance administrative, a été préféré par les  $\frac{3}{4}$  des victimes, et bien entendu après consultation de leurs avocats de défense, et

toujours pour motif d'insatisfaction indemnitaire de l'initiale réparation administrative, par la CNAM!

Il faut savoir qu'il existe actuellement des propositions de fourchettes d'IPP, mais qui sont doubles, selon le cadre juridique, en question (AVP versus AT).

Pour les AVP, le barème actuellement en vigueur, figure sur le Journal Officiel de la République Tunisienne (JORT). Il s'agit d'un barème officiel indicatif des taux d'IPP des victimes des accidents de circulation en Tunisie, promulgué le 11 juillet 2007 au JORT [6].

Ce barème a fait suite à la réclamation de la Loi des assurances, relative à l'indemnisation des victimes des accidents de circulation en Tunisie, du 15 août 2005, comme outil de réglementation tant pour les médecins légistes que les médecins compétents en réparation juridique du dommage corporel [6].

Pour les AT, il existe un barème officiel indicatif des taux d'IPP des victimes des accidents du travail et des maladies professionnelles en Tunisie, du 31 mars 1995, figurant au Journal Officiel de la République Tunisienne (JORT) [7].

Ce barème a fait juste l'application des Lois en vigueur, relatives à la réparation et à l'indemnisation des victimes des Accidents du Travail /Maladies Professionnelles, en Tunisie, en 1994 dans le secteur privé [8] et en 1995 dans le secteur public [9].

Quant aux expertises en AVP, l'expert est, généralement, unique, sauf en cas de délit de fuite de la part du responsable de l'accident de circulation, ou de manque de police d'assurance de la part, toujours, du responsable de l'accident, ou même lorsque ce responsable serait un véhicule de l'État, et dans ces cas, ça serait un collège d'experts, nommé par le magistrat ou le président de la chambre concernée par la réparation juridique des AVP.

En cas de Contre Expertise, émanant sa demande de l'une des parties adversaires ou même du juge, prenant entre ses mains l'affaire en cause, il serait question de nommer deux ou trois, voire plus de nombre d'experts, selon la complexité de l'affaire judiciaire.

En matière des expertises médicales en AT, si l'attribution administrative initiale de l'IPP se fait dans le cadre d'une commission médicale de la CNAM, traitant la réparation des victimes d'AT, en s'aidant des avis d'un médecin spécialiste sapiteur, pour la réponse aux différentes questions soulevées par l'ordre du jours de la dite commission, cette attribution sera ordonnée par le juge cantonal d'habitude, territorialement compétent, pour

désigner un collègue de 3 experts, et qui sont, aussi et généralement, un Médecin Légiste, un Médecin du Travail, et un Médecin spécialiste de l'Appareil Locomoteur ou, le cas échéant, un médecin Spécialiste en Neurochirurgie.

Cette contre-expertise, dans le cadre de ce recours judiciaire, contre la CNAM, se voit en cas d'insatisfaction, notamment de la victime, qui se sent lésée dans son patrimoine et est insuffisamment indemnisée. L'IPP moyenne attribuée par les médecins experts de recours, va de 15 à 25 %, attestant l'avantage de ce recours judiciaire vers la montée du palier du simple capital octroyé à la victime, au palier de rente viagère lorsque ce taux d'IPP est supérieur ou égal à 15%, comme cela a été prévu par la législation tunisienne [10].

## 5-CONCLUSION

Les victimes de traumatismes dorsolombaires, sont de profil varié, mais généralement, il s'agit d'adultes jeunes, de sexe masculin, en pleine activité socioprofessionnelle.

Les AVP en sont la cause la plus incriminée dans ce type de traumatisme. Ils constituent, en effet, un véritable problème de santé publique en Tunisie. L'IPP conséquente est variable, selon le bilan séquentiel, se basant sur le barème de référence promulgué le 11 juillet 2007 au JORT.

Les AT posent, généralement, en matière de traumatisme dorsolombaire une véritable problématique d'insatisfaction des victimes de leur réparation administrative par la CNAM, d'où les recours judiciaires fréquents et des résolutions délicates pour des experts, de tendances différentes, ramenant au choix, après parfois de longues discussions médico-légales, à l'attribution des taux d'IIP supérieurs ou égaux à 15%, de nature à donner la possibilité d'octroi d'une rente viagère pour la victime en question, et par conséquent à une réparation plus équitable aux yeux des citoyens, en général.

## REFERENCES

- [1]Journal de l'Observatoire National des Accidents de la Voie Publique en Tunisie de 2010.
- [2]Journal de l'Observatoire National des Accidents de la Voie Publique en Tunisie de 2011.
- [3]Journal de l'Observatoire National des Accidents de la Voie Publique en Tunisie de 2012.
- [4]Daligand L, Loriferne D, Reynaud CH-A, Roche L. L'évaluation du dommage corporel, Collection de Médecine Légale et de Toxicologie Médicale, Masson, Paris, 1988 :39-91.
- [5]Mouelhi A, Droit de la sécurité sociale, 2<sup>ème</sup> édition augmentée et actualisée, Tunis, 2005.
- [6]Code des assurances, Publications de l'Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, Tunis, 2009.
- [7]Barème officiel indicatif des taux d'Incapacité Permanente Partielle des victimes des accidents du travail et des maladies professionnelles en Tunisie, du 31 mars 1995, figurant au Journal Officiel de la République Tunisienne (JORT) de 1995.
- [8]Loi n°94-28 du 21 février 1994, portant régime de réparation des préjudices résultant des accidents du travail et des maladies professionnelles, Journal Officiel de la République Tunisienne, du 22 Février 1994, N°15 : 308-18.
- [9]Loi n°95-56 du 28 juin 1995, portant régime particulier de réparation des préjudices résultant des accidents du travail et des maladies professionnelles dans le secteur public, Journal Officiel de la République Tunisienne, du 04 Juillet 1995, N°53 :1419-24.
- [10]Régime de réparation des préjudices résultant des accidents du travail et des maladies professionnelles, Publications de l'Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, Tunis, 1998 :p65.

# MEDECINE ET DROIT DE L'HOMME EN TUNISIE ET EN DROIT COMPARE

Prof. Ag. Dr. ZOUHIR KHEMAKHEM

Service de Médecine Légale, CHU Habib BOURGUIBA de Sfax  
Faculté de Médecine de Sfax, Université de Sfax –TUNISIE-  
E-mail : [zkhemakhem@voila.fr](mailto:zkhemakhem@voila.fr)

## Résumé

La Déclaration Universelle des Droits de l'Homme telle qu'elle a été stipulée le 10 décembre 1948 à Genève (SUISSE) [1], ainsi que les protocoles additionnels, surtout sociaux, ont été adoptés par plusieurs pays [2,3], dont la Tunisie. Ceci a abouti à des réformes législatives et réglementaires conduisant le pays à plus d'adhésion aux ratifications internationales en matière des Droits de l'Homme et notamment dans un secteur particulièrement sensible pour le citoyen, celui de la santé.

**Mots clés :** Droits de l'Homme, Médecine, Loi, Tunisie, Droit Comparé

## 1-INTRODUCTION

Les Droits de l'Homme en Tunisie, comme d'ailleurs dans le monde, constituent l'une des épineuses problématiques sociales qui ne cessent de poser des enjeux médico-légaux pour quelques situations d'espèces.

Des situations ont été déjà résolues juridiquement, d'autres restent encore ouvertes à des polémiques, surtout d'ordre doctrinal et même éthique.

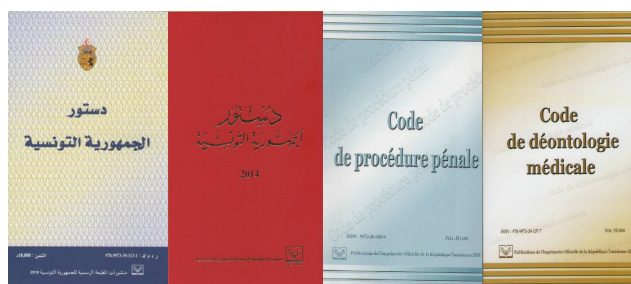
Les objectifs de ce travail sont de connaître les fondements juridiques et réglementaires d'ordre médico-légal, relatifs à la médecine et les questions concernant les Droits de l'Homme en Tunisie, de citer les problèmes médico-légaux inhérents aux failles juridiques, encore en vigueur, et enfin, de proposer des perspectives d'amélioration, se basant sur le droit comparé.

## 2-METHODOLOGIE

Pour réaliser ce travail, nous avons procédé à une relecture et une analyse des textes du droit tunisien en la matière, et notamment la Nouvelle Constitution de la République Tunisienne, promulguée le 31 janvier 2014 [4], qui a remplacé l'ancienne Constitution de 1959 (A l'époque du Président BOURGUIBA) [5], le Code de Déontologie Médicale Tunisien (CDM) [6], le Code de Procédure Pénale Tunisien (CPP) [7], et le Code de la Protection de l'Enfant [8].

Nous essayons de comparer nos données juridiques et doctrinales, actuellement en vigueur, avec le droit et la doctrine étrangers et notamment français, concernant surtout la garde à vue, la grève de la faim, la torture, le majeur incapable de se protéger et l'enfance en danger.

Nous formulons enfin des perspectives, en vue de réformes législatives et réglementaires, favorisant plus de respect des Droits de l'Homme en Tunisie.



La Constitution de 1959

La Constitution de 2014

CPP Tunisien

CDM Tunisien

## 3-RESULTATS

### 3-1-LA GARDE A VUE

L'article 13 bis du Code de Procédure Pénale Tunisien prévoit une durée de 3 Jours, renouvelables, une seule fois, pour garder à vue le suspect, en avisant le Procureur de la République. Il existe la possibilité d'examen médical, mais qui n'est pas systématique, en effet, il peut se faire soit à la demande de la famille du gardé à vue (l'un de ses ascendants ou descendants ou frères ou sœurs ou par le conjoint), et ce soit au cours de cette garde à vue ou à son expiration [7].

### 3-2-LA GREVE DE LA FAIM

Elle n'a pas été définie par les textes de la loi tunisienne.

Mais des formes rapprochées juridiquement (de la part des intervenants), peuvent faire l'objet de répression, telles que:

- L'Aide au Suicide: En effet, l'article 206 du Code Pénal Tunisien, prévoit un emprisonnement de cinq ans, en cas où l'équipe médicale a, éventuellement, assisté l'autolyse du gréviste de la faim [9].

- L'Abstention délictueuse: C'est l'article 2 de Loi n° 66-48 du 3 juin 1966, qui a prévu une sanction de cinq ans d'emprisonnement et de dix mille dinars d'amende, en cas de non assistance à une personne en danger imminent, et faute d'être secourue, la personne peut souffrir d'un préjudice, s'aggraver dans sa situation, ou mourir [10].

### 3-3-LA TORTURE

C'est la Nouvelle Constitution de la République Tunisienne, qui a interdit dans son article 23, toute forme de torture, morale ou physique.

La nouveauté dans cette Constitution est l'annulation du délai de prescription de ce crime, pourtant sa limitation à 15 ans dans un proche arrêté de 2011.

Par ailleurs, c'est l'État qui est le protecteur de la Dignité de l'Homme et de l'Inviolabilité Corporelle, dans ce dit crime [4].

### 3-4-L'INCAPACITE DE SE PROTEGER

La Nouvelle Constitution de la République Tunisienne, dans son article 48, a prévu une interdiction de toute forme de discrimination.

Ce qui est nouveau, c'est que l'État est le protecteur de la Dignité de l'Homme et de l'Inviolabilité Corporelle, ainsi que des possibilités de réinsertion et d'habilitation sociale.

A cet égard, la Loi n° 92-83 du 3 août 1992, relative à la santé mentale et aux conditions d'hospitalisation en raison de troubles mentaux, précise dans son article 3, ce qui suit:

« Toute personne atteinte d'un trouble mental doit être protégée contre toute exploitation, tout abus ou tout traitement inhumain ou dégradant ».

« Elle doit pouvoir bénéficier d'une tutelle qualifiée, lorsque cela est indispensable à la protection de sa personne et de ses biens » [11].

### 3-5-L'ENFANCE EN DANGER

La Nouvelle Constitution de la République Tunisienne, dans son article 47, a proclamé les Droits Constitutionnels de l'Enfant.

En effet, l'État est le protecteur de la Dignité de l'Enfant et de Son Inviolabilité Corporelle, ainsi que Ses Droits à la Santé, à l'Éducation, et à

l'Enseignement, SANS AUCUNE DISCRIMINATION [4].

## 4-DISCUSSION

### 4-1-LA GARDE A VUE

Si l'article 13 bis du Code de Procédure Pénale Tunisien prévoit une durée de 3 Jours, renouvelables, une seule fois, d'autres législations écourtent cette durée à 24 heures seulement, renouvelable une seule fois, sur ordre du procureur de la République ou du Juge d'Instruction (comme pour la France [12]).

Et même, la Cour Européenne des Droits de l'Homme (CEDH) a été plus futuriste et a réclamé en 2011 la suppression de cette période, en se basant sur son article 5, stipulant et consacrant tant le droit à la liberté, que le droit à la sûreté. Elle proposa que l'accusé soit présenté directement à la justice d'urgence, en présence de son avocat de défense!

Ce dernier modèle qui semble être pratiquement l'idéal, puisqu'il évite toute possibilité d'abus, sur le gardé à vue, quelle qu'elle soit! Et ça lui permet tant de ne pas s'écarter de ses traitements médicaux quotidiens, le cas échéant, en cas où il est atteint d'une maladie chronique, évitant, ainsi, la survenue du mal pour cette personne gardée à vue, que de lui éviter un éventuel traitement inhumain et dégradant.

Bien qu'il existe la possibilité d'examen médical, mais qui n'a jamais été systématique et surtout dans ce contexte de privation de liberté, comme vous l'avez remarqué précédemment, cet examen souffre, cependant et encore une fois, de l'absence d'inclusion aux normes des Références Médicales Opposables (RMO)...Ce qui serait un examen hâtif, et ne répondant pas aux conformités des données actuelles et actualisées de la science, comme les prévoyaient l'article 277 du Code des Obligations et des Contrats Tunisien[13], ainsi que l'article 16 du Code Civil Français et la célèbre jurisprudence Française en la matière, représentée évidemment, par l'Arrêt Mercier du 20 mai 1936, soulignant désormais le principe de la nature contractuelle soignant – soigné, et édifiant la responsabilité civile du médecin, chaque fois qu'il peut exister un préjudice au sujet soigné[14].

En effet, le Droit à la sûreté en temps de paix, comme serait le cas en temps de guerre, prévoit les principes des Garanties attendues et même exigées pour protéger l'homme contre toute arrestation ou détention arbitraire.

C'est ainsi, que la Déclaration Universelle des Droits de l'Homme, dans son article 9, stipule que: « Nul ne peut être arbitrairement arrêté, détenu ou exilé » [1].

Par ailleurs, la Constitution du droit tunisien proclame qu'il est interdit de soumettre quelqu'un à une garde à vue ou à une détention arbitraire, et prévoit les garanties juridiques proclamées, telles que le principe de la légalité des délits et des peines, le principe de la présomption de l'innocence, et le principe de l'indépendance de la justice [4].

Ainsi, le recours à certaines mesures privatives, ne peut être envisagé, qu'en vertu des conditions déterminées par la loi, en vigueur [7].

Quoi qu'il en soit, tout gardé à vue, peut bénéficier sur les plans juridiques, judiciaires et doctrinaux de garanties médicales au cours et au décours de cette période provisoire de privation de liberté [15].

De même et pour assurer la meilleure garantie procédurale, la trilogie procédurale suivante doit être bien respectée : premièrement, le ministère public est la partie chargée de l'accusation, secondairement, l'inculpé a la possibilité de se défendre et finalement, le juge statue sur l'affaire.

#### 4-2-LA GREVE DE LA FAIM

Si les textes de la loi tunisienne, n'ont pas défini la grève de la faim, cette entité bizarroïde sous nos climats de culture arabomusulmane, interdisant toute sorte de porter atteinte délibérée au sujet du corps de soi, ne cesse de couler les encres du fait de la survenance de morts par ce mobile dans les locaux d'incarcération de la Tunisie et surtout à la fin de l'année 2012, où nous avons noté deux décès consécutifs de jeunes tunisiens arrêtés dans des affaires purement politiques, sans qu'ils étaient traduits devant la justice! [16].

A cet égard, la Déclaration de Malte sur ce sujet, doit être scrupuleusement observée par les autorités tunisiennes, tant politiques, que judiciaires, policières, et médicales [17].

Par ailleurs, des débats juridiques, de doctrine et même des débats éthiques ne cessent de couler l'encre des juristes, et les grandes questions dilemmatiques posées sont les suivantes : Est-ce que le Gréviste de Faim a le droit de Refuser les soins, au titre de l'inviolabilité de son corps, en étant propriétaire de son corps ? Versus, Est ce que l'incidence « grave » sur la personne adapte l'étendue de la dignité de l'Homme pour l'indisponibilité de son corps, et impose par ce fait

des soins urgents de sauvetage, en étant juste un dépositaire de son corps ? [18].

#### 4-3-LA TORTURE

Si la Nouvelle Constitution de la République Tunisienne, qui a interdit dans son article 23, toute forme de torture, morale ou physique, et était futuriste, en supprimant tout délai de prescription de ce crime, et en s'engageant à ce que l'État soit le véritable le protecteur de la Dignité de l'Homme et de l'Inviolabilité Corporelle, dans ce dit crime, la législation tunisienne, bien qu'elle ait ratifiée les conventions internationales en la matière de dissuasion de ce crime [4], lui reste beaucoup de pas à faire, afin d'éradiquer à jamais ce crime, étant donnée que nous observons encore ce crime après la révolution tunisienne, et même jusqu'au début de l'an 2014!

Un Comité National de Prévention et de Lutte Contre la Torture est en cours de vote et de constitution, au sein de l'Assemblée Nationale Constituante de la Tunisie en fin de février 2014. Ce Comité aurait le temps de discuter les dossiers en préavis, (au Ministère de la Justice, des Droits de l'Homme et de la Justice Transitionnelle, émanant du nouveau gouvernement tunisien en février 2014), un par un, et éventuellement de déterminer les imputabilités et les responsabilités des tortionnaires, éventuellement.

Par ailleurs, l'examen médical des victimes présumées, doit répondre au protocole d'Istanbul, s'agissant d'un Manuel pour enquêter efficacement sur la torture et autres peines ou traitements cruels, inhumains ou dégradants. C'est un Manuel pour enquêter efficacement sur la torture et autres peines ou traitements cruels, inhumains ou dégradants, formulé en 2004, par un comité d'experts [19].

Sur les plans médicolegaux et éthiques, le médecin pénitentiaire ou le médecin légiste ou n'importe quel médecin requis ou avisé pour répondre à une mission expertale, émanant d'une autorité judiciaire requérante, dans le sens de détermination d'une éventuelle imputabilité entre les lésions observées sur un sujet incarcéré, ou juste gardé à vue, doit en répondre avec beaucoup de circonspection, en pouvant s'aider dans ce travail expertal difficile par l'avis des sages, étant données la complexité d'un certain nombre de lésions observées [20].

#### 4-4-L'INCAPACITE DE SE PROTEGER

Les « incapables » ou ce qui est préférable les « personnes protégées », ou plus récemment, les « majeurs incapables de se protéger », renvoient les hypothèses où la présomption juridique d'autonomie est renversée.

D'une façon générale, deux principes gouvernent les incapacités: le principe de subsidiarité et de nécessité. La subsidiarité renvoie à la présomption d'autonomie, et signifie que les incapacités ne peuvent qu'avoir un caractère exceptionnel, toutefois, l'intervention judiciaire est subsidiaire par rapport à toute autre intervention sociale ou médicale. Le principe de nécessité restreint la liberté individuelle dans le cadre de ce qui est strictement nécessaire à la protection de la personne en cause [21].

En droit tunisien, plusieurs situations font appel à ce sujet, comme pour les cas d'espèce dans les maladies mentales, et en général, les majeurs incapables de se protéger [22] et les maladies contagieuses [23], qui ont le droit, comme pour les autres (tel le toxicomane en période d'injonction thérapeutique, le malade emprisonné...et donc des situations de malades où ils vivent un phénomène de privation de leur liberté), à la sûreté face à une éventuelle hospitalisation forcée.

En effet, l'hospitalisation des personnes atteintes de maladies mentales, en mode d'Hospitalisation d'Office (HO), doit être requise en cas d'impossibilité de recueillir le consentement de la personne au moment opportun, ou si son état impose des soins urgents, ou si son état représente une menace pour sa sécurité ou pour celle d'autrui.

Toute la lourdeur de la « protocolisation » juridique et judiciaire, doit être relativisée, selon qu'il s'agit d'une hospitalisation libre (sans aucun protocole), hospitalisation à la demande d'un tiers (où le protocole est allégé), ou de l'Hospitalisation d'Office (ayant une « protocolisation » lourde) [24-25-26]. Sachant que la cour de cassation française, dans un arrêt récent, refuse la « protocolisation » des règles de sortie en cas d'hospitalisation libre, au motif des droits de la personne malade et des libertés individuelles [27].

Par ailleurs, la Loi n°92-71 du 27 juillet 1992, relative aux maladies transmissibles, a insisté sur le principe de la discrimination, tout en assurant et réclamant quelques mesures particulières de prévention, d'ordre réglementaire, telles que la déclaration obligatoire de quelques maladies contagieuses (Choléra, Méningite fulminante, Hépatite virale, sauf l'Hépatite A, Rage, Fièvre Typhoïde, SIDA), le devoir d'information de l'intéressé, ou en cas de force majeure la personne

la plus proche de lui, avec une obligation de soins, voire une hospitalisation d'office, en cas de contagion délibérée de l'infection et désobéissance totale aux soins, de la personne en question.

Cette loi a, également, prévu des sanctions en cas d'infractions à ses dispositions [23].

#### 4-5-L'ENFANCE EN DANGER

La Tunisie est dotée depuis 1995 d'un Code de la Protection de l'enfant [8], qui a pour objectifs l'assurance des intérêts supérieurs de l'enfant, que ce soit pour l'enfant victime de maltraitance ou de sévices de formes diverses : morales, physiques ou sexuelles, que ce soit pour les enfants délinquants, victimes d'abandon, d'orphelinage, ou même ayant commis des actes antisociaux divers, étant donné un terrain psychopathologique particulier, sous-jacent...

Selon ce dit Code, est considéré enfant, lorsque la personne a âge inférieur à 15 ans, au moment des faits reprochés.

Aux termes de l'article 20, du Code Tunisien de la Protection de l'Enfant, sont considérés, en particulier, comme des situations difficiles menaçant la santé de l'enfant ou son intégrité physique ou morale, les suivantes :

- a/ La perte des parents de l'enfant qui demeure sans soutien familial ;
- b/ L'exposition de l'enfant à la négligence et au vagabondage ;
- c/ Le manquement notoire et continu à l'éducation et à la protection ;
- d/ Le mauvais traitement habituel de l'enfant ;
- e/ L'exploitation sexuelle de l'enfant qu'il s'agisse de garçon ou de fille ;
- f/ L'exploitation de l'enfant dans les crimes organisés au sens de l'article 19 du présent code. En effet, l'article 19 stipule : « Il est interdit d'exploiter l'enfant dans les différentes formes de criminalité organisée, y compris le fait de lui inculquer, le fanatisme et la haine et de l'inciter à commettre des actes de violence et de terreur » ;
- g/ L'exposition de l'enfant à la mendicité et son exploitation économique ;
- h/ L'incapacité des parents ou de ceux qui ont la charge de l'enfant d'assurer sa protection et son éducation.

Et c'est l'article 31 de ce code qu'il réclame et insiste sur le devoir de signalement au délégué de la protection de l'enfant, chaque fois qu'un citoyen ou même un médecin de famille, pédiatre, pédopsychiatre, neuropédiatre, ou même médecin légiste, à l'occasion de l'exercice de ses fonctions

[28], en aperçoit l'une des formes cliniques aiguës, chroniques ou même déguisées de maltraitance à enfant : (Syndrome de Munchausen par procuration, syndrome de Silverman, maltraitance de l'enfant noyé dans la problématique de divorce [29]).

Enfin, comme le souligne bien dans son article, Jean ZERMATTEN [30], à travers la convention des Nations Unies relative aux Droits de l'Enfant en 1989 et les différentes ratifications nationales de ce sujet, pour dire que les Droits de l'enfant constituent tant une réalité d'aujourd'hui, qu'un défi de demain, et que ces droits font belle et bien partie du patrimoine universel de l'humanité et des Droits de l'Homme dans son sens large [30].

## 5-CONCLUSION

Les pouvoirs et les autorités politiques et sociales tunisiennes doivent répondre aux normes législatives, et notamment constitutionnelles, harmoniser les textes nationaux avec les ratifications internationales et toujours essayer de trouver, en tout état de cause, une adéquation entre l'Assurance de la Santé, tant de l'individu que la société, la Garantie des Libertés individuelles et collectives, ainsi que la Prévoyance de la Sécurité de soi et d'autrui [25].

Pour les médecins, quelles que soient leurs spécialités, ils doivent s'armer par le minimum de bagage juridique, au moins par une introduction générale au droit [31], dans l'objectif de bonnes pratiques médico-légales, au cours de l'exercice de leurs fonctions.

Enfin, le but de cet article, comme l'a bien formulé le feu Professeur de Médecine Légale Louis ROCHE, est « essentiellement aider ceux qui sont chargés d'enseigner la place des Droits de l'Homme, entendu dans son sens large (Droit, Ethique, Déontologie) aux médecins ; et ce sont tout particulièrement les enseignants de médecine légale qui doivent jouer ce rôle. » [32].

## REFERENCES

- [1] Déclaration Universelle des Droits de l'Homme du 10 décembre 1948.  
 [2] Convention Européenne des Droits de l'Homme et des Libertés fondamentales du 4 novembre 1950.  
 [3] Pacte International Relatif aux Droits Économiques, Sociaux et Culturels, adopté et ouvert à la signature, à la ratification et à l'adhésion par l'Assemblée générale dans sa résolution 2200 A (XXI) du décembre 1966.

[4] LA NOUVELLE Constitution de la République Tunisienne,

دستور الجمهورية التونسية, Publications de l'Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, édition 2014, version arabe.

[5] Constitution of the Republic of Tunisia, Constitution de la République Tunisienne,

دستور الجمهورية التونسية, Publications de l'Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, édition 2010, version trilingue.

[6] Code de déontologie médicale, Publications de l'Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, édition 2010, version Française : 3-35.

[7] Code de procédure pénale, Publications de l'Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, édition 2006, version Française : 45-6.

[8] Loi n°95-92 du 9 novembre 1995, relative à la publication du code de la protection de l'enfant, Journal Officiel de la République Tunisienne, N°90, 1995 : 2095-103.

[9] Code Pénal Tunisien, article 206, Publications de l'Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, édition 2006, version Française : p72.

[10] Loi n° 66-48 du 3 juin 1966, relative à l'abstention délictueuse, Journal Officiel de la République Tunisienne, article 2, 1966 : 879-80.

[11] Loi n° 2004-40 du 3 mai 2004, modifiant et complétant la loi n° 92-83 du 3 août 1992, relative à la santé mentale et aux conditions d'hospitalisation en raison des troubles mentaux, Journal Officiel de la République Tunisienne, 2004 : 1219-20.

[12] Code de Procédure Pénale de la France : Article 63 et Article 154.

[13] Code des Obligations et des Contrats, articles 274 et 277, Publications de l'Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, édition 1996, version Française : p64.

[14] Jean PENNEAU, LA RESPONSABILITÉ MÉDICALE, 3<sup>e</sup> édition, DALLOZ, 2004 : 7-10.

[15] Zouhir KHEMAKHEM, Aspects médico-légaux du gardé à vue : Quelles Garanties Médicales. Conférence Présentée à l'Hôtel Thyna -Sfax-, dans le cadre d'une Table Ronde, Organisée par la ligue de la Défense des Droits de l'Homme (Secteur de Sfax) et le Barreau des Avocats de Sfax, portant sur le thème « Le Gardé à Vue : Quelles Garanties ». Sfax, le 04 Janvier 2014.

-الجوانب الطبية الشرعية للمحتفظ به - الأستاذ المبرز الدكتور زهير خماس -  
 محاضرة أقيمت ، يوم السبت 04 جانفي 2014، في فعاليات المائدة المستديرة تحت عنوان "المحتفظ به، أية ضمانات"، بنزل طينة بصفاقس.

[16] Zouhir KHEMAKHEM, La Grève de la Faim : Aspects médico-légaux, déontologiques et éthiques. REVUE DE LA JURISPRUDENCE ET DE LA LEGISLATION (RJL), Publications, Tunis, Novembre 2012, N°9, Année 54 : 31-6.

[17] Déclaration de Malte de l'AMM sur les Grévistes de la Faim, adoptée par la 43<sup>e</sup> Assemblée Médicale Mondiale Malte, Novembre 1991, révisée en Afrique du Sud, Octobre 2006.

[18] Rachida JELASSI, LE CORPS HUMAIN EN DROIT CIVIL, Centre de Publication Universitaire, Tunis 2013.

[19] L'examen médical physique des victimes de torture présumées  
 Guide pratique du Protocole d'Istanbul – à l'intention des médecins

© International Rehabilitation Council for Torture Victims (IRCT) 2009.

[20] Zouhir KHEMAKHEM, Aspects médico-légaux, juridiques, éthiques, religieux, sociaux et philosophiques de la Torture en Tunisie. Conférence Présentée à l'Hôtel MARIOTTE, Mer Morte, -JORDANIE-, dans le cadre d'un



Congrès International sur la Prévention de la Torture dans le Monde, Mer Morte, Jordanie, le 26 Mars 2013.

الجوانب الطبية الشرعية والقانونية و - الأستاذ المبرز الدكتور زهير خمائم الأخلاقية و الدينية و الاجتماعية

و الفلسفية للتعذيب في تونس

محاضرة أقيمت في الأردن يوم 26 مارس 2013

Zouhir KHEMAKHEM, Medical Forensic, Juridical, Ethical, Social, Theological and Philosophical Aspects of Torture in Tunisia. Conference Presented in MARIOTTE HOTEL, Death Sea, -JORDANIE- Thematic: Never To Torture in the Word, Mars 2013.

[21] Denis BERTHIAU, Comprendre le principe d'autonomie en droit de la santé,

Médecine & Droit 2006 (2006) 53-60.

[22] Zouhir KHEMAKHEM, Zouhir HAMMAMI, Samir MAATOUG, Noureddine AYADI, Rôle du médecin dans la protection des incapables majeurs en Droit Tunisien. REVUE DE LA JURISPRUDENCE ET DE LA LÉGISLATION (RJL), Publications, Tunis, Juin 2010, N°8, Année 52 : 49-60.

[23] Zouhir KHEMAKHEM, Mounir BEN JEMAA, Zouhir HAMMAMI, Samir MAATOUG, Aspects médico-légaux des Maladies transmissibles en Tunisie. REVUE DE LA JURISPRUDENCE ET DE LA LÉGISLATION (RJL), Publications, Tunis, Octobre 2011, N°8, Année 53 : 47-58.

[24] Valériane DUJARDIN, Les soins psychiatriques sans consentement : une délicate alchimie entre droits et libertés, REVUE de DROIT & SANTÉ, Hors série, édition 2014 :501-12.

[25] Sophie GUIGUE, Réflexion sur le consentement aux soins psychiatriques, REVUE de DROIT & SANTÉ, Hors série, édition 2014 :513-20.

[26] La loi du 27 septembre 2013, modifiant la loi du 5 juillet 2011, portant sur l'hospitalisation psychiatrique, Le Bulletin Juridique du Praticien Hospitalier (BJPH), Publication des études hospitalières, Edition SAS , Bordeaux, Janvier 2014, N°165: 7-8.

[27] La Cour de cassation refuse la « protocolisation » des règles de sortie en cas d'hospitalisation libre, Le Bulletin Juridique du Praticien Hospitalier (BJPH), Publication des études hospitalières, Edition SAS , Bordeaux, Janvier 2014, N°164: p 7.

[28] Nabil BEN SALAH, Mongi ZHIOUA, Tasnim MASMOUDI, Mahmoud YACOUB, Une nouvelle dérogation au secret médical : Le signalement des sévices à enfants. REVUE DE LA JURISPRUDENCE ET DE LA LÉGISLATION (RJL), Spécial : Enfance, Publications, Tunis, Mars 1997, N°3, Année 39 : 27-32.

[29] Zouhir KHEMAKHEM, Yousr MOALLA, Farhat GHRIBI, Samir MAATOUG, La maltraitance de l'enfant noyé dans la problématique du divorce, REVUE DE LA JURISPRUDENCE ET DE LA LÉGISLATION (RJL), Spécial : Enfance, Publications, Tunis, Mars 1997, N°3, Année 39 : 33-42.

[30] Jean ZERMATTEN, Droits de l'enfant : Réalité d'aujourd'hui - défi de demain. REVUE DE LA JURISPRUDENCE ET DE LA LÉGISLATION (RJL), Spécial : Enfance, Publications, Tunis, Mars 1997, N°3, Année 39 : 7-26.

[31] Yadh BEN ACHOUR, INTRODUCTION GÉNÉRALE AU DROIT, Centre de Publication Universitaire, Tunis, 2005.

[32] Louis ROCHE, Daniel MALICIER, Pascale MAISONNEUVE, Droit de l'homme et médecine, Son enseignement, Droit et éthique médicale, Volume II, Edition MASSON, Bordeaux, Janvier 1984, N°165: 7-8.

# EFFET DE L'ASSOCIATION DU VERRE BIOACTIF AVEC LA BIOMOLECULE DU CHITOSANE SUR LA CONSOLIDATION OSSEUSE CHEZ LA RATTE OSTÉOPOROTIQUE

JEBAHI S<sup>A,B</sup>, FARHAT L<sup>E</sup>, NACER A<sup>D</sup>, TRIGUI M<sup>YD</sup>, BAYA W<sup>D</sup>, OUDADESSE H<sup>A</sup>, SAHNOUN T<sup>E</sup>,  
DAOUED J, REBAI T<sup>D</sup>, EL FEKI H<sup>C</sup>, EL FEKI A<sup>B</sup> KESKES H<sup>D</sup>

*a* University of Rennes 1, UMR CNRS 6226, Campus de Beaulieu, 263 av. du Général Leclerc, 35042 Rennes, France.

*b* Animal Ecophysiology Laboratory, Sfax Faculty of Science, Department of Life Sciences, Sfax, Tunisia.

*c* Science Materials and Environment laboratory, Sfax Faculty of Science, Sfax, Tunisia.

*d* Histology, Orthopaedic and Traumatology laboratory Sfax Faculty of Medicine Sfax, Tunisia.

*e* Service of Medical Oncology, CHU Habib Bourguiba, 3029 Sfax, Tunisia, Sfax, Tunisia.

¥Corresponding author:

dr\_moez\_trigui@yahoo.fr

## Résumé

Dans l'ingénierie tissulaire, certaines molécules bioactives participent activement au métabolisme osseux. Parmi celles-ci on trouve le chitosane. C'est un biopolymère naturel extrait des carapaces de crustacés. Cette étude vise à évaluer l'effet de l'association du chitosane avec le verre bioactif sur la cinétique de la consolidation osseuse chez la ratte ostéoporotique. Des rattes femelles *wistar* ont été divisées en 4 groupes: I, II III et IV utilisées respectivement comme contrôle, ovariectomisées (OVX), implantées avec du verre bioactif VB (VB) et du verre bioactif associé au chitosane (VB-CH). Les analyses par spectrométrie d'émission optique (ICP-OES) et les observations histologiques ont montré l'intégration des biomatériaux avec le tissu osseux hôte. La cinétique de la consolidation osseuse est plus avancée dans le cas de l'association du verre bioactif avec le chitosane. Après 60 jours d'implantation, le calcium (Ca) se stabilise dans le régénérat osseux du VB et du VB-CH à des taux normaux respectivement vers 240 et 238 mg/g. Le taux des phosphores (P) notés dans le régénérat osseux du VB et du VB-CH sont respectivement, de l'ordre de 141 et 138 mg/g. Le rapport Ca/P est égal à 1.7 et 1.72 respectivement, dans le régénérat osseux du VB et du VB-CH. En raison de la biocompatibilité des biomatériaux avec les tissus osseux, les deux biomatériaux VB et du VB-CH devraient constituer une alternative thérapeutique dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.

**Mots clés :** Verre bioactif, chitosane, consolidation osseuse, defect osseux, minéralisation osseuse.

## Summary

In tissue engineering, several molecules are widely involved in metabolic bone disease. Among them chitosan possess interesting properties in regenerative medicine. *Wistar* rats were divided into four groups: I, II, III and IV, respectively, used as control, ovariectomised (OVX), implanted with bioactive glass (VB) and implanted with bioactive glass associated with chitosan (VB-CH). Analysis by optical emission spectrometry (ICP-OES) and histological observations have shown the biomaterials integration and a more enhanced increase in the bone mineralization kinetic in the case of VB-CH. After 60 days of implantation, Calcium (Ca) was stabilized at normal levels (240 and 238 mg/g) respectively, in the regenerative bone of VB and VB-CH biomaterials. Phosphorus (P) reached ordinary levels (141 and 138 mg/g) respectively, in the regenerative bone of VB and VB-CH biomaterials. The Ca/P ratio of the regenerative bone of VB and VB-CH represented respectively, 1.7 et 1.72. Due to the biomaterial biocompatibility, the VB and VB-CH biomaterials might be used as an alternative against bone diseases in tissue engineering.

**Key words:** Bioactive glass, chitosan, bone healing, bone defect, bone mineralization

## INTRODUCTION

Le chitosane a montré un fort potentiel pour la médecine régénérative notamment du tissu osseux et du cartilage en raison de leur homologie de structure avec les glycoaminoglycanes de la matrice extracellulaire (MEC) [1,2]. Les biomatériaux à base de chitosane ont également suscité l'intérêt de plusieurs équipes de recherche pour des applications dans le domaine biomédical. Plusieurs architectures composites associant chitosane et hydroxyapatite, utilisées pour la régénération osseuse, améliorent l'adhérence, la prolifération et la différenciation d'ostéoblastes [3]. Par ailleurs, d'autres travaux portant sur la combinaison du chitosane avec des facteurs de croissance ou encore la culture in-vitro de cellules souches mésenchymateuses ont rapporté la capacité à stimuler la formation osseuse [4,5]. Cette molécule a fait l'objet de plusieurs études et a retenu l'attention en tant que candidat pour plusieurs applications médicales parmi les quelles nous citons : membranes de dialyse, fibres de sutures, agent stabilisant de liposomes, antimicrobiennes, antiviral, antitumoral, réducteur de cholestérol au niveau sanguin, agent hémostatique stimulant du système immunitaire et en tant que système de relargage de médicaments [6,7,8,9]. Cependant le manque de données sur les propriétés du verre bioactif associé au chitosane du point de vue biologique nous a conduits à la réalisation de ce travail. Nous cherchons à explorer son activité potentielle dans le domaine biomédical général et dans les cas orthopédiques et thérapeutiques en particulier. Ce travail est concentré sur l'effet de l'association de chitosane au verre bioactif sur la réparation osseuse. La composition chimique du matériau conditionne sa vitesse de dégradation. Celle-ci doit être contrôlée pour obtenir une dégradation directement corrélée dans le temps avec la formation de l'os. Ces biomatériaux associés à des agents thérapeutiques sont de bons candidats pour des applications dans le domaine orthopédique comme matériaux d'implantation favorisant la régénération du tissu osseux. Pour suivre l'implantation de ces deux biomatériaux, une étude chez la ratte *Wistar* durant une période de traitement de 60 jours a été effectuée afin de déterminer la biocompatibilité et la cinétique de la minéralisation osseuse.

## MATERIELS ET METHODES

### Etude de la cinétique de consolidation osseuse par spectrométrie d'émission optique

La spectrométrie d'émission optique est une méthode physique d'analyse chimique permettant de doser la quasi-totalité des éléments simultanément. C'est une méthode quantitative dont la sensibilité est inférieure à  $\mu\text{g/g}$  ou ppm [10]. Les échantillons solides à analyser doivent se présenter sous forme de solution. Les solutions sont nébulisées, puis ionisées par pulvérisation dans un plasma d'argon. Les échantillons ont été mis en solution dans de l'acide nitrique à 2 %. Une fois acidifiées, les solutions ont été envoyées au nébulisateur, grâce à une pompe isostatique, puis pulvérisées en fines gouttelettes (spray) dans la chambre de nébulisation. Le spray a été ensuite transporté vers le plasma grâce à un courant d'argon. Une solution d'acide nitrique à 2 % permet de faire le « zéro ». Pour chaque série d'analyses, six solutions étalons multiélémentaires de concentrations connues ont été préparées de façon à encadrer les valeurs théoriques à analyser.

### Etude histologique

Après prélèvement, les pièces osseuses ont été marquées de façon à distinguer la partie distale et la partie proximale. Elles ont infiltrées par l'MMA (méthyle-méthacrylate) par agitation constante à l'aide de rotatif en vitesse lente. La durée des bains était de 1 heure avec un volume de 5 ml environ. Tous les bains ont été réalisés à température ambiante à l'exception du dernier bain d'infiltration qui a été pratiqué à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit. Sur les pièces osseuses incluses, des coupes sériées ont été réalisées à l'aide d'un microtome Polycut S Reichert Jung équipé d'un rasoir au carbure de tungstène. Les coupes ont été récupérées dans l'eau à l'aide d'une bande de papier humide. Des coupes de  $7\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées avec la coloration de Goldner.

### Protocole opératoire Matériel anesthésique

Les rattes ont été anesthésiées avec un mélange xylozine/kétamine et la patte arrière droite a été rasée. Après l'injection, l'animal a été isolé et placé au calme les yeux fermés. Une anesthésie locale à l'aide de la xylocaïne (unicaine, 2%, UNIMED) a été toujours associée.

## Ovariectomie de ratte

Pour éliminer la principale source d'estrogène, les femelles sont ovariectomisées. L'ovariectomie a été pratiquée à l'aide d'ustensiles stériles. Une incision a été réalisée dans la peau et les muscles de l'abdomen sous la dernière cote. Une ligature des oviductes a été pratiquée avant la séparation des ovaires. Un point de suture a été réalisé au niveau des muscles et un second dans la peau.

## Déroulement de l'opération

Chaque animal a été installé sur la table chirurgicale en décubitus dorsal, ses quatre membres ont été maintenus en extension à l'aide de lacettes fixées à la table. Pour la ratte un forage a été réalisé au niveau de condyle fémoral. Un préforage a été d'abord réalisé à l'aide d'un foret de taille inférieure (2 mm) à la taille définitive. Puis un forage définitif a été effectué à l'aide d'un foret de taille adaptée aux dimensions du substitut osseux préformé, la vitesse de rotation utilisée est faible pour éviter un écrasement et un échauffement des travées osseuses. Les substituts osseux (VB et VB-CH) ont été insérés dans le trou de forage. La suture cutanée a été réalisée au fil non résorbable. Le pansement postopératoire a été fait avec une compresse stérile passée sur les différentes plaies opératoires après application locale de Bétadine gel. Le pansement a été changé après trois jours de l'opération. Un contrôle quotidien des plaies a permis de vérifier l'état des cicatrices, de nettoyer les plaies.

## L'observation clinique

Il s'agit d'un examen de base qui a permis d'évaluer globalement l'état général de l'animal après l'acte opératoire de suivre son comportement envers les aliments et les boissons, d'évaluer leurs réactions envers le manipulateur, d'observer l'animal en mouvement afin d'évaluer sa prise d'appui sur le membre opéré, de déterminer une pesée régulière de chaque animal ainsi qu'un examen attentif des sites opératoires.

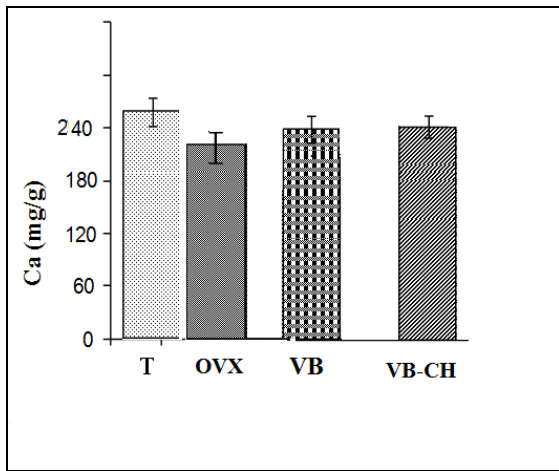
## RESULTATS ET DISCUSSION

Les biomatériaux sont couramment utilisés pour remplacer des tissus ou des membres afin de fournir une restauration partielle des fonctions endommagées [11]. Différents domaines de la chirurgie reconstructrice se sont développés et ont

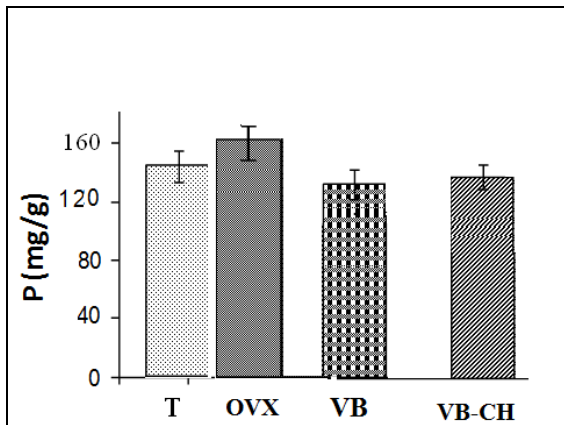
émergé pour améliorer la qualité de vie [12,13]. Dans le domaine d'orthopédie, nous avons cherché à développer de nouvelles structures biomimétiques à base de polymères composites en vue de produire, à plus long terme, des implants biomédicaux attrayants. Le but de cette étude est d'évaluer l'effet de l'association de verre bioactif avec la biomolécule du chitosane sur la consolidation osseuse chez la ratte ostéoporotique. Les concentrations des éléments Ca, P et le rapport phosphocalcique Ca/P ont été déterminées par la méthode ICP-OES. Les échantillons analysés sont ; les os provenant des rattes témoins, des rattes ovariectomisées, implantées par le VB et implantés par le VB-CH (Figures 1et 2). Les concentrations en Ca dans les deux implants VB et du VB-CH ont progressivement augmenté respectivement jusqu'à 240 et 238 mg/g durant 60 jours d'implantation. Le taux des phosphores (P) notés dans le régénérat osseux de VB et du VB-CH sont respectivement, de l'ordre de 141 et 138.5 mg/g à partir du soixantième jour. Le rapport Ca/P est égal à 1.7 et 1.72 respectivement, dans le régénérat osseux de VB et du VB-CH (Figure 3).

L'examen histologique mené sur des pièces osseuses incluses dans du méthyle méthacrylate sans décalcification préalable, coupées et colorées au trichrome de Goldner permet de suivre les différents aspects de tissu osseux après implantation avec le VB et le composite VB-CH (Figure 2 et 3). Les implants ont tous été retenus dans les gaps osseux et sont encore présentes durant la première période. Les lésions de contrôles étaient remplies d'un tissu fibro-cartilagineux tandis que les lésions traitées contenaient des particules de composite VB-CH. Après 4 semaines, les implants ont favorisé un remodelage osseux et une intégration latérale plus complète. Les pertes de substances osseuses traitées avec les implants VB-CH démontrent une guérison plus avancée à 4 semaines que les lésions traitées avec des implants de VB seul. Le composite VB-CH ne paraît pas avoir un effet délétère sur le remodelage osseux dans lequel il a été résident pendant 4 semaines de traitement malgré sa dégradation. En effet, les implants VB-CH ont fait leurs preuves quant à leur capacité de générer du tissu osseux mature, mieux intégré et mieux vascularisé que les VB seuls. Les analyses histologiques n'ont pas montré d'altération structurale au niveau de l'organisation générale des pièces de condyles fémoraux chez les rattes traitées. Le chitosane permet une bonne stabilisation des particules du verre bioactif au site chirurgical et une bonne reconstitution osseuse

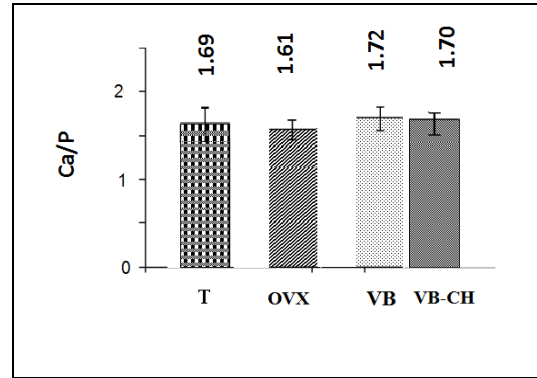
avec une intégration accrue du tissu de réparation aux tissus résidents et une vascularisation transitoire accrue de l'os. Cette réparation par le composite VB-CH consiste essentiellement d'apercevoir des trabécules osseuses normales avec un espace trabéculaire bien réduit qui a été caractérisé après ovariectomie par des trabécules osseuses minces avec des grands espaces trabéculaires. Le processus de guérison est très avancé en présence du composite VB-CH. La résorption progressive de VB-CH a été mise en évidence par la fragmentation des particules.



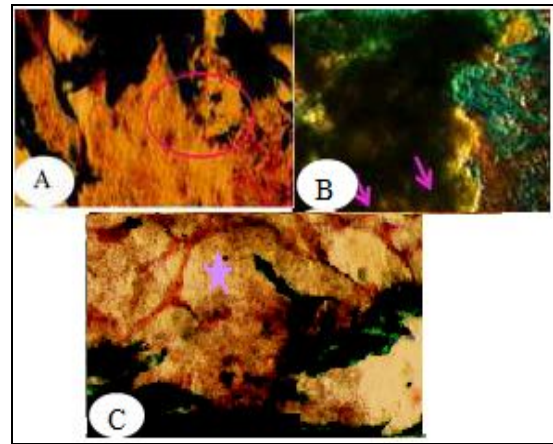
**Figure.1.** Distribution de Ca chez les ratte implantées avec VB et VB-CH après 60 jours d'implantation.



**Figure.2.** Distribution de P chez les ratte implantés avec VB et VB-CH après 60 jours d'implantation.



**Figure.3.** Le rapport Ca/ P chez les ratte implantées avec VB et VB-CH après 60 jours d'implantation.



**Figure.4.** déconnexion trabéculaire pour la ratte ovariectomisée (A) tissu osseux implanté par VB-CH (B) et par VB (C). Coloration Trichrome de Goldner. Cercle déconnexion trabéculaire, →VB-CH, ☆ VB

## CONCLUSION

Les résultats *in vivo* chez la rate *Wistar* montrent une bonne biocompatibilité du verre bioactif et du verre bioactif associé au chitosane. La dégradation de deux biomatériaux a été quantifiée par mesure de la concentration en ions phosphate et calcium dans le milieu osseux environnant. Après 60 jours d'implantation, le rapport Ca/P des précipités augmente avec le temps de maturation osseuse. La cinétique de la consolidation osseuse est plus avancée dans le cas de l'association du verre bioactif avec le chitosane. La présence de chitosane dans les matériaux semble être particulièrement importante dans les phénomènes d'initiation de la différenciation ostéoblastique. Les deux implants permettent la stimulation de l'ossification osseuse.

## REFERENCES

- [1] Mirahmadi F, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Bonakdar S Enhanced mechanical properties of thermosensitive chitosan hydrogel by silk fibers for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013; 33:4786-94.
- [2] Farrugia BL, Whitelock JM, Jung M, McGrath B, O'Grady RL, McCarthy SJ, Lord MS. The localisation of inflammatory cells and expression of associated proteoglycans in response to implanted chitosan. *Biomaterials* 2014;35:1462-77.
- [3] Uskoković V, Desai TA. In Vitro Analysis of Nanoparticulate Hydroxyapatite/Chitosan Composites as Potential Drug Delivery Platforms for the Sustained Release of Antibiotics in the Treatment of Osteomyelitis. *J Pharm Sci* 2013 . doi: 10.1002/jps.23824. [Epub ahead of print]
- [4] Martijn Van Griensven, Camille Thévenin-Lemoine. Stratégies de réparation en orthopédie à l'aide des cellules souches épithéliales et mésenchymateuses Repair strategies in orthopaedics by means of epithelial and mesenchymal stem cells. *Méd Rep Gyn End* 2009 ; 11: 63-70
- [5] Qu ZW, Meng QG, Xiao X, Li BL, Zhang FM. Research of Arginylglycylaspartic to promote osteogenesis of bone marrow mesenchymal cells on chitosan/hydroxyapatite scaffolds. *Biomed Mater Eng.* 2014;24: 683-93.
- [6] Jiang H, Zuo Y, Zou Q, Wang H, Du J, Li Y, Yang X. Biomimetic spiral-cylindrical scaffold based on hybrid chitosan/cellulose/nano-hydroxyapatite membrane for bone regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013 ; 27:12036-44
- [7] Zhao K, Zhang Y, Zhang X, Li W, Shi C, Guo C, Dai C, Chen Q, Jin Z, Zhao Y, Cui H, Wang Y. Preparation and efficacy of Newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 389-402
- [8] Kjærup RM, Dalgaard TS, Norup LR, Bergman IM, Sørensen P, Juul-Madsen HR. Adjuvant effects of mannose-binding lectin ligands on the immune response to infectious bronchitis vaccine in chickens with high or low serum mannose-binding lectin concentrations. *Immunobiology* 2013: S0171-2985(13)00196-4.
- [9] Wang M, Yue Y, Dong C, Li X, Xu W, Xiong S. Mucosal immunization with high-mobility group box 1 in chitosan enhances DNA vaccine-induced protection against coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20:1743-51.
- [10] Montaser, D.W. Golightly, eds. Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry VCH Publishers, Inc., New York, 1992.
- [11] Yanovska AA, Stanislavov AS, Sukhodub LB, Kuznetsov VN, Illiashenko VY, Danilchenko SN, Sukhodub LF. Silver-doped hydroxyapatite coatings formed on Ti-6Al-4V substrates and their characterization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014 ;36:215-20
- [12] Ding H, Zhao CJ, Cui X, Gu YF, Jia WT, Rahaman MN, Wang Y, Huang WH, Zhang CQ A novel injectable borate bioactive glass cement as an antibiotic delivery vehicle for treating osteomyelitis. *PLoS One* 2014 ;9:e85472.
- [13] Jebahi S, Oudadesse H, El Feki H, Rebai T, Keskes H, PascalP, et al. Antioxidative/oxidative effects of strontium-doped bioactive glass as bone graft, in vivo assays in castrated rats. *J Appl Biomed* 2012;10:195—209

# APPLICATION DU VERRE BIOACTIF POREUX DANS LA BIO-ORTHOPEDIE; ETUDE EXPERIMENTALE CHEZ LA RATTE *WISTAR* OSTÉOPOROTIQUE

SAMIRA JEBABI <sup>A,B</sup>, MOEZ TRIGUI<sup>✉ D</sup>, WALID BAYA<sup>D</sup>, HASSAN OUDADESSE <sup>A</sup>, ABDESSALEM NACER<sup>D</sup>, LEILA FARHAT <sup>E</sup>, JAMEL DAOUED<sup>E</sup>, TAREK REBAI<sup>D</sup>, HAFEDH EL FEKI<sup>C</sup>, ABDEL FATTEH EL FEKI<sup>B</sup> et HASSIB KESKES<sup>D</sup>

A : University of Rennes 1, UMR CNRS 6226, Campus de Beaulieu, 263 av. du Général Leclerc, 35042 Rennes, France.

B : Animal Ecophysiology Laboratory, Sfax Faculty of Science, Department of Life Sciences, Sfax, Tunisia.

C : Science Materials and Environment laboratory, Sfax Faculty of Science, Sfax, Tunisia.

D: Histology, Orthopaedic and Traumatology laboratory Sfax Faculty of Medicine Sfax, Tunisia.

E: Service of Medical Oncology, CHU Habib Bourguiba, 3029 Sfax, Tunisie, Sfax, Tunisia.

✉Corresponding author:

dr\_moez\_trigui@yahoo.fr

## Résumé

Les avancées récentes de la biologie permettent d'entrevoir de nouvelles stratégies de comblement osseux, parmi lesquelles les biomatériaux poreux figurent en bonne place. Les verres bioactifs poreux (VBP) ont montré des effets biologiques positifs au niveau de l'ingénierie tissulaire. Cette étude vise à évaluer la tolérance du VBP par le tissu osseux hôte dans le cas d'ostéoporose. Des rattes *Wistar* ont été divisées en cinq groupes: le groupe (I) utilisé comme contrôle négatif (T), après une ovariectomie, les groupes II, III, IV et V respectivement utilisés comme contrôle positif; ovariectomisées (OVX), implantées avec du verre bioactif non poreux VBNP (OVX-VBNP), verre bioactif poreux VBP (OVX-VBP) et présentant des défauts vides (OVX-NI). Les observations histomorphométriques, en microscopie électronique à balayage (MEB) et par spectrométrie d'émission optique (ICP-OES) ont montré l'intégration des matériaux, sans rejet ni infection et un rééquilibrage de la formation du tissu osseux avec une amélioration de l'architecture osseuse. Dans le cas du VBP, les pores favorisent la pénétration du tissu osseux néoformé. Suite à l'implantation de VBP, l'os s'organise en vue de synthétiser la matrice nécessaire au comblement. La pénétration du tissu osseux néoformé dans l'implant confirme le fait que l'architecture poreuse de VBP respecte les critères essentiels de réparation osseuse. Après 60 jours d'implantation, le calcium (Ca) se stabilise à des taux normaux (252 mg/g). Le phosphore (P) retrouve un niveau normal à partir du soixantième jour (145 mg/g). Les apports en Zinc (Zn) au niveau du régénérat osseux induisent une modification majeure du statut en Zn. En effet, une diminution significative du taux de Zn a été notée après 60 jours d'implantation. En raison des propriétés régénératives du tissu osseux, les verres poreux devraient constituer une nouvelle alternative thérapeutique efficace pour les patients affectés par l'ostéoporose.

**Mots clés :** verre bioactif, porosité, ostéoporose, consolidation osseuse, défaut osseux

## Abstract

Recent advances in biology provide new strategies for bone grafting, including porous biomaterials. Porous bioactive glasses (VBP) showed positive biological effects in tissue engineering. [This study is aimed to evaluate](#) the effect of VBP by the host bone in the osteoporosis case. *Wistar* rats were divided into five groups: (I) used as negative control (T), after ovariectomy, groups II, III, IV and V, respectively, used as positive control ovariectomised (OVX), tissue implanted with non porous bioactive glass VBNP (OVX - VBNP), VBP (VBP-OVX) and presented empty defects (OVX - NI). The histomorphometric observations, scanning electron microscopy (SEM) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP- OES) showed integration of the materials, without rejection or infection and a rebalancing of bone formation with an improvement in bone architecture. For VBP, pores favor the penetration of newly formed bone tissue. Following implantation, VBP biomaterial is organized to synthesizing the matrix required for the bone defect filling. The penetration of the newly formed bone in the implant confirmed that the VBP porous architecture enhance bone repair. After 60 days of implantation, calcium (Ca) is stabilized at normal rate (252 mg/g). Phosphorus (P) back to normal value after the sixtieth day (145 mg/g). The element zinc (Zn) presented a major change in the newly bone. Indeed a significant decrease in the Zn concentration was noted after 60 days of VBP implantation. Due to the bone regenerative properties, porous glasses should provide a new effective therapeutic alternative for patients affected by osteoporosis.

**Key words :** bioactive glass, porosity, osteoporosis, bone regeneration, bone defect.

## INTRODUCTION

La bio-orthopédie c'est la discipline où les chercheurs, les médecins et les spécialistes des matériaux visent à reconstruire des tissus squelettiques fonctionnels, dotés de bonnes propriétés biologiques et mécaniques. Ces biomatériaux associés à des agents thérapeutiques sont de bons candidats pour des applications dans le domaine orthopédique comme matériaux d'implants favorisant la régénération du tissu osseux. Parmi ces biomatériaux, on trouve le verre bioactif caractérisé par sa capacité à se lier au tissu osseux quand il est implanté [1]. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et orthopédique, les matériaux poreux sont très attractifs. La porosité peut être considérée comme un paramètre primordial pour un biomatériau. La porosité doit être adaptée à celle de l'os au niveau du site de greffe, qui varie en fonction de la localisation et de la fonction. La taille minimale des pores permettant une ostéoformation au sein du biomatériau est de 100 µm, mais la taille optimale semble être entre 300 et 400µm [2,3]. Dans ce travail nous avons utilisé un verre bioactif poreux dopé en zinc. Le zinc joue un rôle important dans la multiplication cellulaire de l'os ainsi que la fabrication du collagène de la trame osseuse [4]. Le zinc pourrait contribuer également à l'amélioration de la densité minérale des os en cas d'ostéoporose [5]. La porosité permet une bonne invasion tissulaire [6]. Il existe différentes méthodes d'évaluation de la consolidation osseuse, citons comme exemple la méthode radiologique [7]. Le but de cette étude était d'évaluer sur le plan histomorphométrique et physico-chimique l'effet de l'implantation du verre poreux et dopé en Zinc sur le remodelage tissulaire dans un cas d'ostéoporose suite à une ovariectomie (l'ablation bilatérales des ovaires) chez la ratte *wistar*.

## MATERIEL ET METHODES

### Dispositif chirurgical pour l'implantation des biomatériaux

#### Matériel anesthésique

Les rattes ont été anesthésiées avec un mélange xylozine/kétamine et la patte arrière droite a été rasée. Après l'injection, l'animal a été isolé et placé au calme les yeux fermés. Une anesthésie locale à l'aide de la xylocaïne (unicaine, 2%, UNIMED) a été toujours associée.

### Ovariectomie de ratte

Pour éliminer la principale source d'estrogène, les femelles sont ovariectomisées. L'ovariectomie a été pratiquée à l'aide d'instruments stériles. Une incision a été réalisée dans la peau et les muscles de l'abdomen sous la dernière cote. Une ligature des oviductes a été pratiquée avant la séparation des ovaires. Un point de suture a été réalisé au niveau des muscles et un second dans la peau.

### Matériel chirurgical pour l'opération

Une table de chirurgie, une table pour poser les instruments stériles, une table pour poser le matériel non stérile, une source de lumière chirurgicale (scialytiques), des blouses stériles, des charlottes, des masques, des gants stériles adaptés à la taille du chirurgien, des champs en tissu et en plastique stériles, des compresses stériles, des fils de suture monobrin résorbable de type Monobrin® 3/0 déc. Des instruments chirurgicaux stériles adaptés à l'intervention chirurgicale : des pinces à champs, un manche de scalpel muni d'une lame, une pince à bouts mousses, une pince à dents de souris, une sonde cannelée, des pinces hémostatiques, des ciseaux de Mayo, des ciseaux de Metzenbaum, un porte-aiguille, un bol stérile rempli de solution saline stérile, une seringue de 5 ml stérile un moteur de perceuse (à vitesse rotatoire variable et contrôlé), et un foret adapté de 3 mm de diamètre.

### Déroulement de l'opération

Chaque animal a été installé sur la table chirurgicale en décubitus dorsal, ses quatre membres ont été maintenus en extension à l'aide de lacettes fixées à la table. Pour la ratte un forage a été réalisé au niveau de condyle fémoral. Un préforage a été d'abord réalisé à l'aide d'un foret de taille inférieure (2 mm) à la taille définitive. Puis un forage définitif a été effectué à l'aide d'un foret de taille adaptée aux dimensions du substitut osseux préformé, la vitesse de rotation utilisée est faible pour éviter un écrasement et un échauffement des travées osseuses. Les substituts osseux ont été insérés dans le trou de forage. La suture cutanée a été réalisée au fil non résorbable. Le pansement postopératoire a été fait avec une compresse stérile passée sur les différentes plaies opératoires après application locale de Bétadine gel. Le pansement a été changé après trois jours de l'opération. Un contrôle quotidien des plaies a



permis de vérifier l'état des cicatrices, de nettoyer les plaies.

### **L'observation clinique**

Il s'agit d'un examen de base qui a permis d'évaluer globalement l'état général de l'animal après l'acte opératoire de suivre son comportement envers les aliments et les boissons, d'évaluer leurs réactions envers le manipulateur, d'observer l'animal en mouvement afin d'évaluer sa prise d'appui sur le membre opéré, de déterminer une pesée régulière de chaque animal ainsi qu'un examen attentif des sites opératoires .

### **RESULTATS**

#### **Etude *in vivo* sur des rattes ovariectomisées : Etude hématologique et de la phosphatase alcaline**

Après 60 jours d'ablation bilatérale des ovaires, une diminution significative ( $p > 0,05$ ) du taux sérique en phosphatase alcaline (PAL) par rapport aux témoins a été signalée. Après 60 jours d'implantation, les différents paramètres hématologiques GB, GR, Hb, Ht, VGM plaquettes n'ont montré aucune différence significative chez les animaux traités (OVX-VBNPS et OVX- VBP) par rapport aux rattes OVX et les contrôles. Après la même période de traitement, aucun changement significatif des Ca, P Si et de Zn au niveau du sérum n'a été observé chez tous les animaux traités par rapport aux témoins (T) (Tableau 1).

#### **Etudes histologique par MEB et histomorphométriques : étude qualitative et quantitative**

Les études histologiques et histomorphométriques nous ont permis de suivre et d'apprécier les changements tissulaires et cellulaires à l'intérieur et à l'extérieur des implants puisque il s'agit d'un matériau poreux (Figure.1.A). *In vivo*, la bioactivité de VBP implique la formation des îlots apatitiques observés dans cette étude dans le pore de ce matériau . Les avantages liés à cette formation de couche apatitique (Figure.1.B) sont nombreux et tous tendent à favoriser un ancrage et une bonne consolidation entre l'os et le VBP. Les pores sont vite envahies par la matière organique. Dans le cas présent des biomatériaux, les pores favorisent la pénétration du tissu osseux néoformé et des cellules spécialisées dans la genèse de l'os (Figure.1.C),

les micropores, quant à eux, demeurent libres parce qu'ils sont trop petits pour être empruntés par les cellules et faciliteraient ainsi la capillarité de fluides et donc la diffusion des nutriments et des métabolites à travers l'implant. L'intégration os-implant est déjà presque parfaite à partir de 60 jours. Suite à l'implantation de VBP l'os, s'organise en vue de synthétiser la matrice nécessaire au comblement de la lacune de résorption d'un très grand nombre d'ostéoblastes. La pénétration du tissu osseux néoformé dans l'implant, confirme le fait que l'architecture poreuse de notre matériau respecte les critères essentielles de réparation osseuse .

Sur le plan histomorphométrique, nous pouvons noter que la quantité d'os à l'intérieur du VBP tel qu'observée à 30 jour est insuffisante. A ce stade il est déjà possible de dire que la durée de l'implantation n'a pas permis au VBP d'améliorer ses qualités osséointégratives. En effet, l'os immature nouvellement synthétisé est encore mal organisé. À 60 jours l'intégration osseuse de VBP s'améliore et la surface du VBP est en contact intime avec le tissu osseux. Les analyses statistiques des résultats ont permis de confirmer cette observation. La performance de VBP semblait être influencée par la biofonctionnalité qui est liée à la structure du verre poreux. La biocompatibilité de deux implants semblait toutefois comparable. En effet, Après 60 jours d'implantations, les analyses quantitatives ont démontré que le paramètres BV/TV était significativement plus élevés dans les groupes de OVX-VBP que celles des rattes traitées avec le VBNP (Figure 2). D'autre part, le paramètre MS / BS est moins important dans les verres VBP comparé à celui des rattes traitées avec VBNP, mais significativement plus élevé par rapport aux contrôles (T). Ces résultats suggèrent fortement que VBP stimule la formation osseuse et augmente le volume d'os trabéculaire sans altérer le profil minéral ou le processus de minéralisation. (Figure 3)

#### **Etude par spectrométrie d'émission optique (ICP-OES) de la cinétique de la bio-consolidation de l'implant VBNP et de l'implant verre bioactif poreux (VBP)**

Après 60 jours d'implantation, l'élément Ca se stabilise à des taux normaux (252 mg/g) (Figure 4). Ceci est plutôt le résultat d'une redistribution du Ca qui est formé suite à la formation de couche apatitique en contact avec les biomatériaux et qui est en équilibre avec le milieu biologique qui

l'entoure. Le P retrouve un niveau normal à partir du sixantième jour (145mg /g) (Figure 5). Les apports en Zn au niveau du régénérat osseux induisent une modification majeure du statut en Zn. En effet des teneurs importantes de l'ordre de 0.28 mg/g ont été mesurées dans l'implant vers le jour 60 postopératoire (Figure 6).

**Tableau.1. Les paramètres hématologiques et les concentrations plasmatiques en Ca, P, Si, Zn et l'activité en phosphatase alcaline chez les groupes contrôles (T), ovariectomisés (OVX), ovariectomisés et implantés avec VBNP (OVX -VBNP), ovariectomisés et implantés avec VBP (OVX -VBP) après la période de 60 jours. \* différence significative comparée avec les rattes témoins.**

	T	OVX	OVX-NI	OVX- VBNP	OVX - VBP
<b>Globules blancs</b> (10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	8,11 ± 0,41	7,99 ± 0,79	8,03 ± 0,18	8,31± 0,21	8,30 ± 0,42
<b>Globules rouges</b> (10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	7,39 ±0,45	6,99 ±0,75	7,01 ±0,66	8,01 ±0,02	7,51 ±0,53
<b>Hémoglobine</b> (g/dL)	13 ,44 ± 0,56	13,22± 0,44	13,05± 0,22	13 ,29± 0,59	13 ,24 ± 0,56
<b>Hématocrite (%)</b>	44,65 ± 0 ,33	44,05 ± 0 ,73	44,00 ± 0 ,34	45,15 ± 0,10	44,44± 0 ,41
<b>plaquettes</b> (10 <sup>9</sup> /l)	914 ±49	901 ±59	904 ±13	911 ±40	909 ± 27
<b>Volume globulaire moyen (VGM) (fl)</b>	57,70 ± 3,12	54,99 ± 4,05	54,87 ± 3,14	60,00± 1,12	60,70 ± 1,19
<b>Ca (mg/dl)</b>	8,70 ± 0,61	9,01 ± 0,41	9,11 ± 0,21	9,02 ± 0,45	9,3 ± 0,22
<b>Pi (mg/dl)</b>	4,96 ± 0,60	5,04 ± 0,28	5,14 ± 0,20	4,30 ± 0,97	4,21 ± 0,9
<b>Zn (µg/dl)</b>	25,00±0,20	22 ,00±0,10	22,09±0,20	24,00±0,30	27,00±0,30
<b>Si (µg/g )</b>	0,90±0,26	0,87± 0,21	0,86± 0,11	0,85±0,21	0,84±0,21
<b>Phosphatase alcaline (U/l)</b>	38 3,50±28,06	254,90 ± 40,65	254,00 ± 30,00*	250,50 ±44,12*	266,00 ± 37,45*

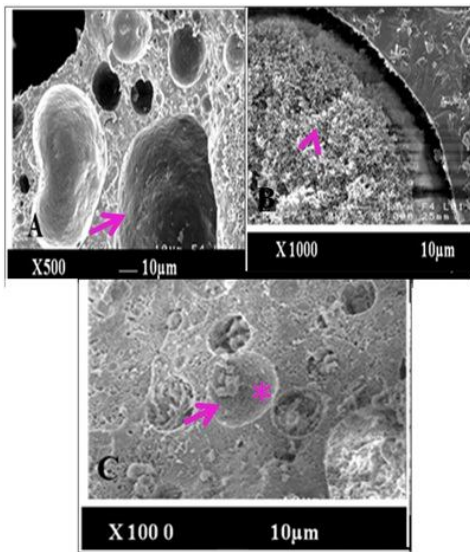


Figure 1: Porosité de l'implant VBP ~ 40µm (A). Dépôt apatitique dans les pores vers le jour 60 post opératoire (B). Invasion cellulaire dans les pores (C). \* cellules, → pores, ▲ apatite.

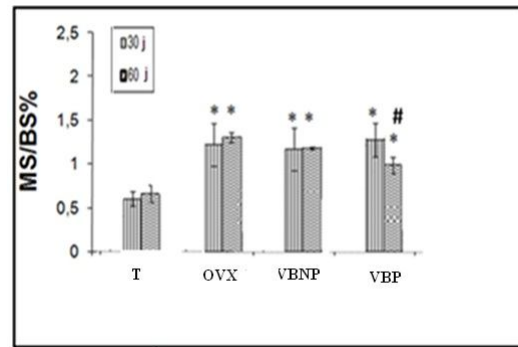


Figure 3 : Paramètre histomorphométrique (MS/BS) mesurés au niveau du fémur spongieuse inclus dans du méthyle méthacrylate sans préalable décalcification. Cette études est menée sur des rattes contrôles, ovariéctomisé, implanté avec VBP et VBNP. \*indique que le paramètre est significativement modifié par rapport au groupe témoin et ovariectomisé. # indique que le paramètre est significativement modifié par rapport au groupe de VBNP.

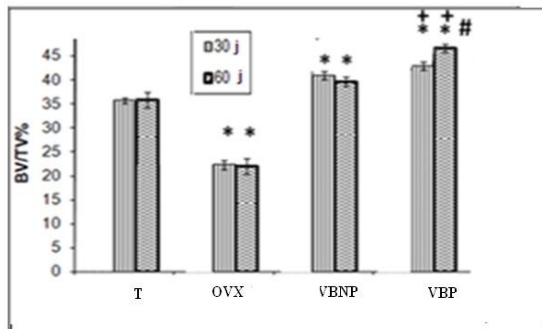


Figure 2 : Paramètre histomorphométrique (BV/TV) mesurés au niveau du fémur spongieuse inclus dans du méthyle méthacrylate sans préalable décalcification. Cette études est menée sur des rattes contrôles, ovariéctomisé, implanté avec VBP et VBNP. \*indique que le paramètre est significativement modifié par rapport au groupe témoin et ovariectomisé. # indique que le paramètre est significativement modifié par rapport au groupe de VBNP.

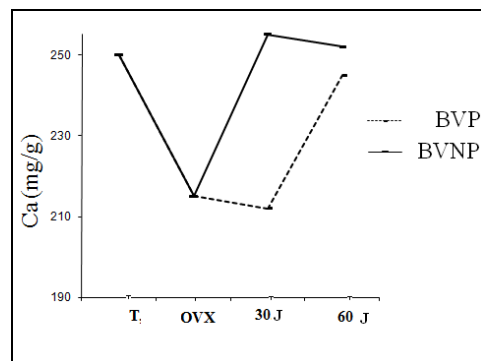
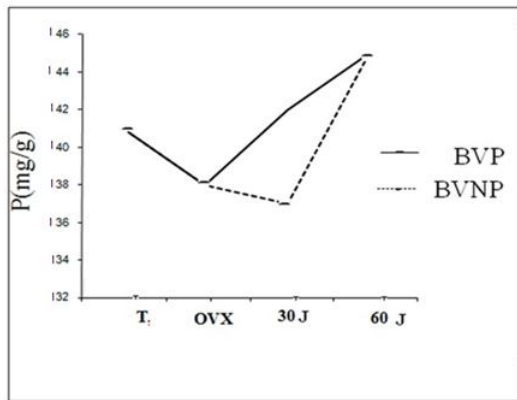
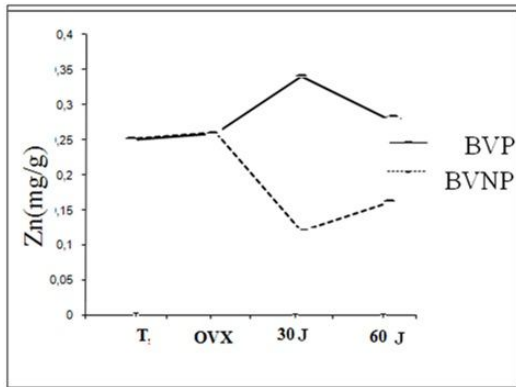


Figure.4. Distribution de Ca chez les rattes implantées avec VBP et VBNP pour 30 et 60 jours.



**Figure.5. Distribution de P chez les rattes implantées avec VBP et VBNP pour 30 et 60 jours.**



**Figure.6. Distribution de Zn chez les rattes implantées avec VBP et VBNP pour 30 et 60 jours.**

## DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer si les VBP présentait une biocompatibilité suffisante *in vivo*. Cette évaluation a été réalisée par comparaison des réponses cellulaires obtenues sur les matériaux VBNP. Dans la littérature, la biocompatibilité d'un matériau est souvent évaluée par l'étude de l'adhésion, la prolifération et la morphologie des cellules au contact de l'échantillon. Pour rétablir ses fonctions physiologiques normales, l'os doit réussir à stabiliser l'implant. L'absence des interactions étroites entre les cellules osseuses responsables du remodelage de l'os (ostéoblastes et ostéoclastes) due au traumatisme causé par la présence de l'implant, entraîne la formation d'un os

généralement mal organisé dont la minéralisation pourrait aboutir au cal ou à l'ostéosclérose qui stabilise l'implant [ 8]. La quantité d'os synthétisée à la suite d'une résorption et destinée à combler le fossé laissé par cette résorption est directement proportionnelle au volume du fossé [9 ]. La réaction de défense de l'organisme vis à vis d'un implant artificiel (corps étranger) étant inéluctable, un implant idéal devrait minimiser cette réaction et permettre la croissance des tissus environnants dans les meilleurs délais postopératoires. Dans ce travail, nous avons comme but d'évaluer la qualité de regenerat osseux, en passant par la structure des tissus à l'intérieur et autour des implants. Dans les conditions normales, l'os est engagé dans un processus continu de remodelage pour faire face aux contraintes environnementales auxquelles il est soumis en permanence. Lorsqu'il est traumatisé, l'os guérit ses défauts par remplissage aboutissant au cal [10]. Dans la présente etude, après 60 jours d'implantations , au niveau de surfaces traumatiques autour de VBP il se produit une synthèse de la matrice osseuse destinée à combler la lacune de résorption et l'ampleur dépend du degré de tolérance à l'implant. Cette synthèse de la matrice étant possible puisque notre materiau VBP est considéré comme biocompatible . En effet, le matériau présente une macroporosité et une microporosité. La distribution des pores le long de l'implant, montre l'interconnexion des pores et l'existence d'une microporosité. Dans le cas présent des biomatériaux, si les pores favorisent la pénétration du tissu osseux néoformé et des cellules spécialisées dans la genèse de l'os, les micropores quant à eux demeurent libres parce qu'ils sont trop petits pour être empruntés par les cellules et faciliteraient ainsi la capillarité de fluides et donc la diffusion des nutriments et des métabolites à travers l'implant. La porosité ouverte et interconnectée et l'existence d'une microporosité permet la diffusion à travers l'implant des fluides contenant des nutriments et des métabolites. Ces caractéristiques ont favorisé son intégration et son habitation rapide par du tissu osseux. Les conséquences liées à l'instabilité sont ainsi écartées ce qui devrait procurer de l'espoir au chirurgien orthopédiste dans la lutte contre le rejet de greffe osseuse et l'instabilité des matériaux. Dans cette etude, la présence de l'implant VBP provoque inévitablement un changement dans l'homéostasie osseuse. Le dopage de matériau en Zn influence la vitesse de dégradation.

L'introduction de zinc dans la matrice ralentit légèrement la dissolution de la matrice vitreuse ainsi que la cinétique de formation de la couche d'hydroxyapatite. Dans cette période, l'os s'adhère aux verres bioactifs grâce à la création d'un lien chimique. La surface de VBP sert de support à la repousse osseuse. Après implantation du verre bioactif contenant du Ca et du P les principales réactions ont lieu. C'est la dissolution (décomposition du réseau de silicium) ou lessivage (relargage des éléments constitutifs du matériau).

## CONCLUSION

Après 60 jours d'implantation, les analyses montrent une biocompatibilité de VBP avec le tissu osseux. La porosité et le dopage en Zinc semble avoir été le point culminant de la performance de VBP. Ces caractéristiques ont favorisé son intégration et son habitation rapide par du tissu osseux. Le VBP est stabilisé dans son site d'implantation et sa fusion rapide avec l'os a laissé moins de place à une accumulation des tissus mous.

## REFERENCES

- [1] Jebahi S., Oudadesse H., El Feki H., Rebai T., Keskes H., Pascal P., et al. Antioxidative/oxidative effects of strontium-doped bioactive glass as bone graft, in vivo assays in castrated rats. *J Appl Biomed* 2012;10:195-209.
- [2] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 2005; 26: 5474-91
- [3] Liu X, Rahaman MN, Fu Q, Tomsia AP. Porous and strong bioactive glass (13-93) scaffolds prepared by unidirectional freezing of camphene-based suspensions, *Acta Biomater*. 2012 8:415-23.
- [4] Dickey BT, Kehoe S, Boyd D. Novel adaptations to zinc-silicate glass polyalkenoate cements: The unexpected influences of germanium based glasses on handling characteristics and mechanical properties. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2013; 8: 23C:8-21.
- [5] Tokudome Y, Otsuka M Possibility of alveolar bone promoting enhancement by using lipophilic and/or hydrophilic zinc related compounds in zinc-deficient osteoporosis rats. *Biol Pharm Bull*, 2012;35:1496-501
- [6] Diaye M, Degeratu C, Bouler JM, Chappard D. Biomaterial porosity determined by fractal dimensions, succolarity and lacunarity on microcomputed tomographic images. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013;33: 2025-30.
- [7] Ellouze Z., Ben Elhadj Bahri A., Trigui M., Aoui M., Zribi W.1, Elfeki H., Ayadi K., Keskes H. osseux chez le lapin Radiographic evaluation of regenerate mineralization after osseous lengthening in rabbit. *Tunisie Orthopédique* 2010 ; 3: 138 -143
- [8] Manzi G, Romanò D, Moneghini L, Romanò CL. Successful staged hip replacement in septic hip osteoarthritis in osteopetrosis: a case report. *BMC Musculoskelet Disord*, 2012; 2:13: 50.
- [9] Abrahamsson I, Linder E, Larsson L, Berglundh T. Deposition of nanometer scaled calcium-phosphate crystals to implants with a dual acidetched surface does not improve early tissue integration. *Clin. Oral Implants Res*, 2012, doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02424
- [10] Hinsenkamp M, Collard JF. Bone Morphogenic Protein--mRNA upregulation after exposure to low frequency electric field. *Int Orthop*, 2011; 35:1577-81 2005, 839-848.

# ETUDE COMPARATIVE DE LA CINÉTIQUE DE CONSOLIDATION OSSEUSE ENTRE DEUX CÉRAMIQUES DIFFÉRENTES, HYDROXYAPATITE CARBONATÉE ET VERRE BIOACTIF, CHEZ LE LAPIN BLANC DE RACE NEO-ZÉLANDAISE

SAMIRA JEBABI <sup>✧ A,B</sup>, LEILA FARHAT<sup>E</sup>, ABDESSALEM NACER<sup>D</sup>, MOEZ TRIGUI <sup>✧D</sup>, HASSAN OUDADESSE<sup>A</sup>, ZOUBIER ELLOUZ<sup>D</sup> JAMEL DAOUED<sup>E</sup>, WALID BAYA<sup>D</sup>, TARAK REBAI<sup>D</sup>, HAFEDH EL FEKI <sup>C</sup>, ABDELFAHATTAH EL FEKI<sup>B</sup> HASSIB KESKES<sup>D</sup>

*a University of Rennes 1, UMR CNRS 6226, Campus de Beaulieu, 263 av. du Général Leclerc, 35042 Rennes, France.*

*b Animal Ecophysiology Laboratory, Sfax Faculty of Science, Department of Life Sciences, Sfax, Tunisia.*

*c Science Materials and Environment laboratory, Sfax Faculty of Science, Sfax, Tunisia.*

*d Histology, Orthopaedic and Traumatology laboratory Sfax Faculty of Medicine Sfax, Tunisia.*

*e Service of Medical Oncology, CHU Habib Bourguiba, 3029 Sfax, Tunisie, Sfax, Tunisia.*

*✧Corresponding author:*

*dr\_moez\_trigui@yahoo.fr*

## Résumé

**Prérequis:** Les biomatériaux sont des substances d'origine naturelle ou artificielle qui permettent le comblement d'un défaut osseux afin de stimuler la consolidation. **But:** Cette étude vise à évaluer la cinétique de minéralisation et la tolérance de l'hydroxyapatite et du verre bioactif par le tissu osseux hôte. **Méthodes:** Des lapins blancs de race Néo-Zélandaise ont été divisés en 3 groupes: I, II et III, respectivement utilisés comme contrôle, implantés avec du verre bioactif VB (VB) et de l'hydroxyapatite carbonatée (HAPC). **Résultats:** Les analyses par spectrométrie d'émission optique (ICP-OES) ont montré une augmentation de la cinétique de la minéralisation osseuse jusqu'à un rééquilibrage de la formation osseuse. Les deux biomatériaux favorisent l'ostéoconduction du tissu osseux. Après 60 jours d'implantation, le calcium (Ca) se stabilise dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB à des taux normaux respectivement vers 225 et 220 mg/g. Les taux de phosphore (P) notés dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB sont, respectivement, de l'ordre de 125 et 124.5 mg/g à partir du sixième jour. Le rapport Ca/P dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB était respectivement égal à 1.80 et 1.76. **Conclusion:** En raison de la biocompatibilité des biomatériaux avec les tissus osseux, les verres bioactif et l'hydroxyapatite devraient constituer une alternative thérapeutique dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.

**Mots clés :** verre bioactif, Hydroxyapatite, consolidation osseuse, défaut osseux, minéralisation osseuse .

## Summary

**Background:** The biomaterials are substances of natural or artificial origin that permit the wound bone healing stimulation. **Aim:** This study aims to evaluate the bone mineralization kinetic and the biocompatibility of the hydroxyapatite and bioactive glass. **Methods:** New Zealand white rabbits were divided into three groups: I, II and III, respectively, used as control, implanted with bioactive glass VB (VB) with carbonated hydroxyapatite (HAPC). **Results:** Analysis by optical emission spectrometry (ICP-OES) have shown the integration of the biomaterial with increase in the bone mineralization kinetic. In this study, both of the biomaterials promoted bone tissue osteoconduction. After 60 days of implantation, calcium (Ca) stabilized in the regenerative bone of HAPC and VB respectively, at normal levels (225 and 220 mg/g). Phosphorus (P) stabilized respectively, in the regenerative bone of HAPC and VB at normal levels (125 and 124.5 mg/g). The Ca/P ratio of the regenerative bone of HAPC and VB represented respectively, 1.80 and 1.76. **Conclusion:** Due to the biomaterial biocompatibility, the HAPC and VB might be used as an alternative against bone diseases in tissue engineering.

**Key words:** Bioactive glass, hydroxyapatite, bone healing, bone defect, bone mineralization

## INTRODUCTION

Les biomatériaux utilisés dans le comblement des pertes de substance osseuse suscitent un intérêt croissant de par leur utilisation fréquente en chirurgie réparatrice ou en chirurgie orthopédique. Ils représentent une alternative aux autogreffes (prélèvements de tissu sur le même individu), aux allogreffes (prélèvement de tissu sur un individu de la même espèce vivant ou mort) et aux xéno-greffes (prélèvements de tissu sur une espèce différente) [1]. Dans les pertes de substance osseuse, l'utilisation des matériaux de substitution du tissu osseux est destinée à faciliter la réossification [2]. Les biomatériaux implantés posent le problème de leur devenir dans l'organisme : biotolérance, biofonctionnalité et la biorésorption [3]. Cette dernière propriété est très importante : elle détermine le phénomène par lequel le matériau sera dégradé *in vivo* par des dissolutions spontanées et par l'action des ostéoclastes [4]. Le nouveau tissu osseux régénéré permet de déterminer la cinétique de la consolidation osseuse. La composition chimique du matériau conditionne sa vitesse de dégradation. Celle-ci doit être contrôlée pour obtenir une dégradation corrélée directement dans le temps avec la formation de l'os. Pour mieux contrôler l'intégration et obtenir des biomatériaux de qualité, la complémentarité de la recherche fondamentale et appliquée est indispensable. Parmi ces biomatériaux, on trouve le verre bioactif et l'hydroxyapatite [5, 6]. Ces biomatériaux associés à des agents thérapeutiques trouvent leur intérêt dans le domaine de la chirurgie orthopédique comme stimulateur de la régénération du tissu osseux dans la perte de substance osseuse [7].

Pour suivre l'implantation de ces deux biomatériaux et afin de déterminer la biocompatibilité et la cinétique de la minéralisation osseuse nous avons procédé à une étude chez les lapins mâles blancs de souche NZW durant une période de traitement de 30 et 60 jours.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Les animaux

Nous avons utilisé des lapins blancs « Nouvelle Zélande mâles », d'environ 1.09 kg de poids corporel. Ils ont été placés dans une animalerie munie d'un système de ventilation et d'un système réglant les périodes d'obscurité (10 h) et de lumière (14 h), avec une hygrométrie stable,

et dans laquelle la température était réglée à 22°C. Tous les lapins s'acclimatent pendant 1 semaine avant le début de l'expérimentation. La manipulation des animaux a été approuvée par le comité Tunisienne d'éthique et d'utilisation des animaux de laboratoire.

### Anesthésie de lapin

Une anesthésie par injection intramusculaire de la kétamine (kétamine 250mg/g PANPHARMA, France) à la dose de 1 ml associé à l'Hypnovel à la dose de 0,1 a été effectuée. Après l'injection, l'animal a été isolé et placé au calme durant 15 à 20 minutes environ, les yeux fermés. Une anesthésie locale à l'aide de la xylocaïne (unicaine, 2%, UNIMED) à la dose de 5 ml a été toujours associée [9]. L'association de l'anesthésie générale et locale a permis d'obtenir un bon endormissement ainsi qu'une bonne analgésie.

### La préparation du membre

Le jour de l'intervention, l'animal opéré reçoit une injection pré anesthésique. Cette période, au cours de laquelle l'animal était en respiration spontanée, a été mise à profit pour réaliser la dépilation du membre opéré grâce à la crème dépilatoire. La dépilation a été complète et minutieuse, sur toute la surface du membre (en excluant l'extrémité distale)

Installation, anesthésie locale

Le lapin a été placé sur un champ qui couvre la table opératoire. Un champ stérile fixé à la racine du membre a permis d'isoler le champ opératoire du reste du corps de l'animal permettant de réaliser la manipulation dans des conditions d'asepsie rigoureuse.

### L'acte chirurgical

**Mise en place de l'implant :** On réalise une incision cutanée et sous cutanée sur la face interne du tibia puis une ouverture de l'aponévrose musculaire, on passe sous le corps musculaire du tibia pour tomber directement sur la face craniomédiale du tibia. C'est par des ciseaux à disséquer et une rugine fine que les corps musculaire sont décollés de toute la circonférence du tibia. Avec une scie oscillante, un trou de 0.5 cm de la partie médio diaphysaire du tibia a été enlevé. Les deux biomatériaux ; hydroxyapatite et verre bioactif ont comblé la perte de substance osseuse. La fermeture des plans profonds s'est faite par du fil résorbable après un lavage abondant au sérum physiologique. La suture cutanée a été réalisée au

fil non résorbable. Nous avons appliqué, avant le pansement, de la Bétadine gel sur les différentes plaies opératoires afin de les désinfecter

### **Etude de la cinétique de consolidation osseuse par spectrométrie d'émission optique**

La spectrométrie d'émission optique est une méthode physique d'analyse chimique permettant de doser la quasi-totalité des éléments simultanément. C'est une méthode quantitative dont la sensibilité est de 0.1 ppb-20 ppb [8]. Les échantillons solides doivent se présenter sous forme de solution. Les solutions sont nébulisées, puis ionisées par pulvérisation dans un plasma d'argon. Les échantillons ont été mis en solution dans de l'acide nitrique à 2 %. Une fois acidifiées, les solutions ont été envoyées au nébulisateur, grâce à une pompe isostatique, puis pulvérisées en fines gouttelettes (spray) dans la chambre de nébulisation. Le spray a été ensuite transporté vers le plasma grâce à un courant d'argon. Une solution d'acide nitrique à 2 % permet de faire le « zéro ». Pour chaque série d'analyses, six solutions étalons multiélémentaires de concentrations connues ont été préparées de façon à encadrer les valeurs théoriques à analyser.

### **RESULTATS ET DISCUSSION**

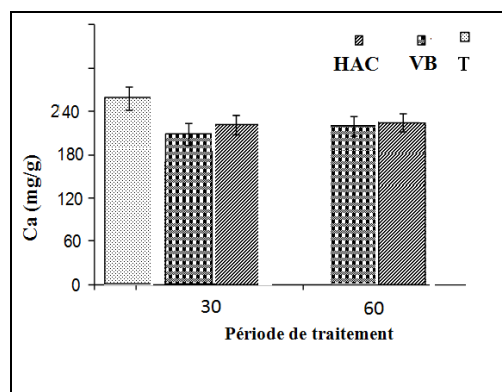
Les concentrations des éléments Ca, P et le rapport phosphocalcique Ca/P ont été déterminées par la méthode ICP-OES durant la période des 20, 30, 45 et 60 jours. Les échantillons analysés sont ; les os provenant des lapins témoins et des lapins traités (Figures 1 et 2). Les concentrations en Ca dans les deux implants HAPC et du VB présentés dans l'os nouvellement formé ont été respectivement de l'ordre de 129 et 128.5 mg/g après 20 jours d'implantation. Le taux des phosphores (P) notés dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB a été respectivement, de l'ordre de 125 et 124.5 mg/g durant la même période d'implantation. Le rapport Ca/P a été respectivement de 1.80 et 1.76, dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB (Figure 3). A ce stade nous pouvons déjà conclure que la durée de l'implantation n'a pas permis d'améliorer la qualité osseointégrative de deux biomatériaux VB et l'HAPC. En effet, l'os immature nouvellement synthétisé est encore mal organisé. A cette phase, le rapport phosphocalcique de l'HAPC a été significativement plus important que celui de VB. Après implantation, nous avons noté la présence d'une grande quantité d'os mal organisé, preuve

d'une calcification récente de la matrice osseuse qui a donné du cal osseux. Le comblement par un nouveau tissu (fibrocartilagineux) de l'espace laisse entrevoir un agrandissement de la taille du tissu mou autour des BV. Vers le 30<sup>ém</sup> jour, l'intégration osseuse de VB s'est améliorée et le rapport phosphocalcique de BV a été augmenté sans différence significative par rapport au HAC. Nous pouvons alors confirmer que la durée de l'implantation a une influence positive sur l'intégration osseuse de VB. Il paraît évident que le VB, à cette période, commence à être intégré par le tissu osseux en provenance de l'os adjacent et que la greffe se trouve maintenant renforcée physiologiquement. Nous pouvons conclure que l'intégration osseuse du BV a commencé tard par rapport au l'HAPC mais dans le délai physiologique de la guérison osseuse (Stübinger et al., 2010). Après la période de 60 jours, les concentrations en Ca dans les deux implants l'HAPC et du VB ont progressivement augmenté respectivement jusqu'à 225 et 220 mg/g durant 60 jours d'implantation. Le taux des phosphores (P) noté dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB a été respectivement, de l'ordre de 125 et 124.5 mg/g à partir du soixantième jour. Le rapport Ca/P a été respectivement de 180 et 176, dans le régénérat osseux de l'HAPC et du VB (Figure 3). Nous pouvons confirmer aussi que la formation osseuse en présence de VB est bien effective après 60 jours d'implantation et se caractérise par une forte activité ostéoblastique aboutissant à la synthèse de l'ostéoïde puis le tissu minérale. Dans ce travail, nous avons comparé les effets de la régénération osseuse du point de vue minéralisation osseuse suite à la détermination des éléments majeurs présent dans l'os (Ca et P) et le rapport phosphocalcique. Dans les conditions normales, l'os est engagé dans un processus continu de remodelage pour faire face aux contraintes environnementales auxquelles il est soumis en permanence (Hinsenkamp *et al.*, 2011). En présence du BV et du l'HAP qui sont considéré comme corps étranger, des mécanismes de défense aboutissant souvent à un déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse. L'implant mal toléré est naturellement soumis à une attaque du système immunitaire. Ce qui peut conduire à long terme à son rejet de l'implant (Waldron-Lynch *et al.*, 2012). Or, dans notre cas, la calcification aboutit à la formation d'un os bien organisé. Après 60 jours d'implantation, on suppose qu'au niveau de surfaces traumatiques autour du VB il se produit une synthèse d'une matrice osseuse

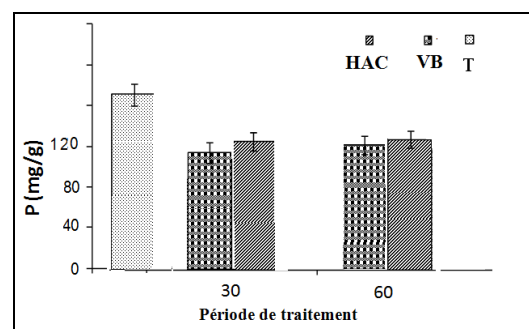


destinée à combler la lacune de résorption et que l'ampleur de cette synthèse dépend du degré de tolérance de l'implant. Cette synthèse de la matrice étant possible puisque notre matériau VB est considéré comme biocompatible. Dans notre étude, nous avons remarqué qu'à 60 jours, la situation s'est améliorée par rapport au 30<sup>ème</sup> jour ce qui témoigne le retour au bon fonctionnement des mécanismes réparateurs de l'os confirmant ainsi notre hypothèse que la biocompatibilité n'est pas à l'origine de ce retard de consolidation. La calcification de cette matrice aboutit au cal qui stabilise l'implant. Une coloration au Trichrome de Goldner modifié, a été réalisée pour l'acquisition de données concernant l'effet des biomatériaux *in vivo*. Cette étude permet de montrer les différents comportements des matériaux. Ces deux biomatériaux combleront l'intégralité de la lacune. Après 30 jours d'implantation, peu de néoformation osseuse a été observée au niveau des coupes histologiques. Cette coupe permet de mettre en évidence de tissu ostéoïde, témoin de la néosynthèse osseuse. Cependant, l'un des solvants utilisés dans cette coloration dénature le matériau ce qui laisse apparaître des plages jaunâtres au sein de la matrice osseuse à la place du matériau. Egalement, des plages fibrinoïdes ont pu être mises en évidence au centre de certaines zones de comblement de biomatériaux. A ce délai, le matériau ne remplit pas l'intégralité de la lacune et différentes zones de repousse osseuse ont pu être détectées. A partir de 60<sup>ème</sup> jour, l'étude qualitative a montré une importante capacité de cicatrisation des lésions. Pour autant, la perte osseuse n'apparaît pas encore totalement comblée. L'ossification s'est mise en place de proche en proche de façon centripète de la périphérie vers le centre. L'étude histologique a montré aussi que les limites de contact entre le tissu et le biomatériau de substitution sont dépourvues de réactions inflammatoires à corps étranger. En générale, les deux matériaux semblent être bien acceptés par les tissus osseux environnants. A partir du 60<sup>ème</sup> jours, une importante dissémination des biomatériaux au sein des espaces osseux s'est produite. Dans notre cas les deux biomatériaux de substitution osseuse, sont étroitement liés à la néo vascularisation de l'implant. En effet, une des difficultés majeures en ingénierie tissulaire osseuse est que les implants doivent être vascularisés rapidement pour assurer en particulier la survie des cellules susceptibles de reconstruire le tissu (apport de nutriments, d'oxygène...) [10,11].

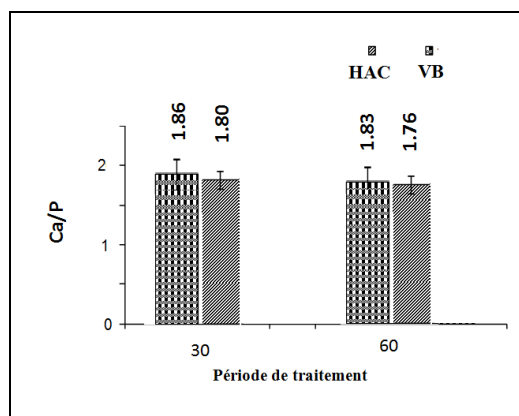
Or notre hydroxyapatite carbonatée a permis une colonisation de l'implant par les cellules osseuses du receveur. Il est indispensable aussi que le verre bioactif soit en contact intime avec des cellules osseuses, ce contact favorise la biointégration ainsi que la biocompatibilité [12]. La dissolution permet la précipitation de cristaux apatitiques [13,14]. L'ostéoconduction progressive est assurée ensuite par la pénétration cellulaire et la micro vascularisation osseuse. A moyen terme, il existe une résorption du matériau avec ostéoformation qui aboutit à un équilibre résorption-apposition [15]. Ainsi, le réhabilitation est centripète et progressive. L'ostéoconduction débute par une phase de résorption entraînant un relargage des ions contenus dans le substitut.



**Figure.1. Distribution de Ca chez les lapins implantés avec HAPC et VB pour 30 et 60 jours.**



**Figure.2. Distribution de P chez les lapins implantés avec HAPC et VB pour 30 et 60 jours.**



**Figure.3. Le rapport Ca/ P chez les lapins implantés avec HAPC et VB pour 30 et 60 jours.**

## CONCLUSION

Les résultats *in vivo* chez le lapin (NZW) montrent que 20 jours postopératoire, le rapport Ca/P exhibe une maturation osseuse limitée pour les deux biomatériaux mais très signalé au niveau du BV. Après 60 jours d'implantation, le rapport Ca/P de deux régénérats osseux regagne le taux normaux sans variation significative entre les deux implants. Les deux implants facilitent la mise en place de phase organique pour stimuler l'ossification osseuse. En effet, une bonne biocompatibilité et une bonne ostéointégration de BV et de l'HAPC a été signalé.

## REFERENCES

- [1] Jebahi S, Oudadesse H, El Feki H, Rebai T, Keskes H, PascalP, et al. Antioxidative/oxidative effects of strontium-doped bioactive glass as bone graft, *in vivo* assays in castrated rats. *J Appl Biomed* 2012;10:195—209.
- [2] Jebahi S, Oudadesse H, Abdessalem N, Leila Farhat, Moez Trigui, Jamel Daoued, Rebai T, El Feki H, El Feki A, Hassib keskes. Application of porous bioactive glass in bio-orthopedics; Experimental study in osteoporotic Wistar rat. *Tunisie Orthopédique. In press.*
- [3] Konofaos P, Kashyap A, Ver Halen J. Biomedical approaches to improve bone healing in distraction osteogenesis: a current update and review. *Biomed Tech (Berl)*. 2014.8:1-7. doi: 10.1515/bmt-2013-0096. [Epub ahead of print]
- [4] Leventis MD, Fairbairn P, Dontas I, Faratzis G, Valavanis KD, Khaldi L, Kostakis G, Eleftheriadis E. Biological Response to  $\beta$ -Tricalcium Phosphate/Calcium Sulfate Synthetic Graft Material: An Experimental Study. *Implant Dent*. 2013. [Epub ahead of print]
- [5] S. Jebahi, M. Saoudi, R. Badraoui, H. Oudadesse, Z. Ellouz, H. Keskes, A. El Feki, H. El Feki, "Biologic Response to Carbonated Hydroxyapatite Associated with Orthopedic Device: Experimental Study in a Rabbit Model," *Kor J Path*, 2012; 4 6, 48-54.
- [6] Plewinski M, Schickle K, Lindner M, Kirsten A, Weber M, Fischer H. The effect of crystallization of bioactive bioglass 45S5 on apatite formation and degradation. *Dent Mater*. 2013;29:1256-64
- [7] Koudehi MF, Fooladi AA, Mansoori K, Jamalpoor Z, Amiri A, Nourani MR Preparation and evaluation of novel nano-bioglass/gelatin conduit for peripheral nerve regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2013 [Epub ahead of print]
- [8] Montaser, D.W. Golightly, eds. *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry* VCH Publishers, Inc., New York, 1992.
- [9] Ellouze Z., Ben Elhadj Bahri A., Trigui M., Aoui M., Zribi W.1, Elfeki H., Ayadi K., Keskes H. osseux chez le lapin Radiographic evaluation of regenerate mineralization after osseous lengthening in rabbit. *Tunisie Orthopédique* 2010 ; 3: 138 -143
- [10] Cavalcanti S.C.S.X.B., D.D.S., Pereira C.L., Mazzone R.; " Histological and histomorphometric analyses of calcium phosphate cement in rabbit calvaria" *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2008;36, 354e359
- [11] Mellibovsky L., Marinõso M.L., Cervantes b F., "Relationship among densitometry, bone histomorphometry, and histologic stage in idiopathic myelofibrosis " *Bone* 2004; 34 330– 335
- [12] Landi E., Celotti G., Logroscino G. & Tampieri A. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute; *Journal of the European Ceramic Society*; 2003; 23 2931–2937
- [13] Frayssinet P., Trouillet J., Rouquet N., Azimus E. & Autfage A.; "Osteointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition"; *Biomaterials*; 1993; 14, 6, 423-429.
- [14] Landia E., Celottia G., Logroscinob G. & Tampieria A. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute *Institute of Science and Technology for Ceramics* 2003; 2931–2937
- [15] Pamela H., Uwe G., Charles J., Doillon, David C. & Clemens A.; van Blitterswijkb, Jake E, Barralet, Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants *Biomaterials* 2008: 29 944–953.

# IMPACT DE DEUX PLANTES HALOPHYTES SUR L'HEPATOTOXICITE INDUITE PAR LE PLOMB CHEZ LE RAT MALE ADULTE

MANEL GARGOURI<sup>A,B,C</sup>, IBTISSEM BEN AMARA<sup>D</sup>, RIADH KSOURI<sup>B</sup>, KHALED MOUNIR ZEGHAL<sup>D</sup>, ABDELFATTAH EL FEKI<sup>A</sup>, CHRISTIAN MAGNE<sup>C</sup> ET AHMED HAKIM<sup>D</sup>

<sup>A</sup> Laboratoire d'Ecophysiologie Animale, Faculté des Sciences de Sfax, Route de Soukra, 3038 Sfax, Tunisie.

<sup>B</sup> Laboratoire des Plantes Extrêmophiles, Centre de Biotechnologie de Borj-Cedria, BP901, 2050 Hammam Lif, Tunisie.

<sup>C</sup> EA 2219 Géoarchitecture, UFR Sciences et Techniques, Université de Bretagne Occidentale, 6 Avenue V. Le Gorgeu, CS 93837, 29238 Brest Cedex 3, France

<sup>D</sup> Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Sfax, 3029 Sfax, Tunisie.

## Résumé

Cette étude visait à évaluer les effets toxiques d'une exposition de rats adultes au plomb sur les tissus hépatiques, et le rôle protecteur potentiel de la sarcocorne ou du cakilier, ajoutés au régime alimentaire de l'animal. Des rats mâles ont été traités pendant 15 jours avec une eau de boisson contaminée par le plomb, et recevaient en parallèle une alimentation normale ou un régime enrichi en sarcocorne ou en cakilier. La toxicité du plomb a été évaluée en mesurant les niveaux de plomb dans le sang, le poids du foie, les lésions tissulaires, ainsi que la teneur en protéines, la peroxydation lipidique et les activités des enzymes antioxydantes dans les tissus hépatiques. L'empoisonnement au plomb provoque des dommages tissulaires hépatiques. De plus, une diminution significative du poids et de la teneur en protéines de ces tissus a été trouvée. Par ailleurs, le plomb provoque un stress oxydatif important et des changements dans l'activité des enzymes antioxydantes dans le foie. A l'inverse, aucun de ces dommages ou modifications biochimiques n'a été retrouvé chez les rats dont le régime était enrichi en plantes. Ces résultats suggèrent fortement que les effets bénéfiques de l'alimentation riche en *Sarcocornia* ou *Cakile* sont dûs à une activité antioxydante protégeant les tissus hépatiques contre tout dommage induit par le plomb.

**Mots clés :** *Cakilemaritima*, foie, plomb, rat, *Sarcocornia perennis*, stress oxydant.

**Abréviations :** SOD, superoxyde dismutase ; TBARS, substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique ; MDA, malondialdéhyde ; CAT, catalase ; GPx, glutathion peroxydase

## Abstract

This study is aimed at assessing toxic effects of lead exposure on liver tissue in adult rats, and the potential protective role of two halophytes, *Sarcocornia* and *Cakile*, when added to the diet of intoxicated animal. Male rats were treated for 15 days with drinking water contaminated with lead, and received in parallel a normal diet or a diet rich supplemented with *Sarcocornia* or *Cakile*. Lead toxicity was assessed by measuring Pb levels in the blood, liver weight and tissue damages, as well as protein content, lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the liver tissues. Lead poisoning caused a number of hepatic damages, and a significant decrease in liver weight and protein content was found. Furthermore, lead exposure induced an important oxidative stress and changes in the activity of antioxidant enzymes in the liver. Conversely, none of these biochemical changes or damages was found in rats whose diet is rich in plants. These results strongly suggest that the beneficial effects of *Sarcocornia* or *Cakile* added to the diet are due to their antioxidant compounds which protect liver tissue against lead-induced damages.

**Keywords:** *Cakilemaritima*, liver, lead, rat, *Sarcocornia perennis*, oxidative stress.

**Abbreviations :** SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substance; MDA, malondialdehyde ; CAT, catalase ; GPx, glutathione peroxidase

## 1. INTRODUCTION

Le plomb est un toxique multi-cible, capable de provoquer des altérations différentes selon le stade de développement lors de l'exposition (**Goyer et al., 1995 ; Bielarczyk et al., 1996 ; Mattison, 2010 ; Guimaraes et al., 2012**). Sa persistance dans l'organisme présente ainsi un grand risque pour la santé humaine et animale et reste un souci important, d'autant plus que le plomb est largement présent dans notre environnement.

Le foie est considéré comme le premier organe cible du plomb (**Sharma et Street, 1980**). C'est un organe central dans la régulation du métabolisme. C'est aussi un organe important dans les processus de défense. Chez les animaux, des lésions hépatiques ont été observées chez le rat exposé chroniquement à de faibles doses de plomb, ce qui confirme l'hépatotoxicité de ce métal (**Da silva et al., 2005**). De tels dommages anatomiques s'accompagnent d'une perturbation importante du fonctionnement hépatique, témoignant de la perte d'intégrité des membranes cellulaires au niveau du foie (**Zimmerman et Seeff, 1970**).

Ces dernières années, l'importance clinique des médicaments à base de substances naturelles d'origine végétale a reçu une attention considérable. En effet, beaucoup d'antioxydants ou conservateurs synthétiques exercent plusieurs effets secondaires néfastes (**Nocentini et al., 2001**). Ainsi, diverses plantes peuvent produire des composés de substitution aux molécules synthétiques pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. En Tunisie, il existe une diversité importante d'espèces végétales, particulièrement les halophytes spontanées, qui présentent de multiples intérêts potentiels : écologique, économique et thérapeutique (**Ksouri et al., 2012**). Parmi les différentes espèces halophytiques reconnues comme médicinales, nous nous sommes intéressés dans le présent travail à deux d'entre elles, abondamment représentées sur le littoral méditerranéen: *Cakile maritima* (Cm) et *Sarcocornia perennis* (Sp). L'objectif de notre travail est d'évaluer l'efficacité de la sarcocorne et du cakilier chez des rats adultes traités par le plomb afin de sélectionner une plante active exerçant un rôle protecteur contre l'hépatotoxicité causée par ce métal.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Produits chimiques

Le plomb, sous forme acétate, a été obtenu auprès de la société Merck (Ref :107375). Tous les autres produits chimiques utilisés dans cette étude ont été achetés par l'intermédiaire des fournisseurs commerciaux standard.

### 2.2. Matériel végétal et préparation

Des plantes de cakilier (*Cakile maritima*, Brassicaceae) et de sarcocorne (*Sarcocornia perennis*, Chenopodiaceae) ont été collectées en Mai et septembre 2009 respectivement, dans différentes localités côtières tunisiennes du Cap Bon, entre Soliman (bioclimat semi-aride supérieur) et Korba (bioclimat humide) (**Figures 1 et 2**). Les espèces ont été authentifiées selon la flore de la Tunisie par le Professeur Abderazek Smaoui, du Technopôle de Borj Cedria. Des échantillons de ces plantes ont été déposés à l'herbarium du Technopôle de Borj Cedria, Tunisie.



Figure 1: *Cakile maritima*



Figure 2: *Sarcocornia perennis*

Les échantillons des deux espèces prélevés sont rapportés immédiatement au laboratoire. Après séchage dans un lyophilisateur, les échantillons sont finement broyés à l'aide d'un broyeur à billes (type Dangoumeau) jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. Celle-ci est alors conservée à l'obscurité et à 4°C dans des piluliers hermétiquement fermés jusqu'aux analyses.

### 2.3. Détermination de la toxicité aiguë de la matière sèche des plantes

L'étude de la toxicité aiguë (DL<sub>50</sub>) de cakilier et de sarcocorne par voie orale a été réalisée dans notre laboratoire. Un régime standard fourni aux rats est composée de granules contenant un mélange de blé, la luzerne, le soja, vitamines et minéraux. Alternativement, une alimentation enrichie en plantes a été préparées en mélangeant de la poudre de plante avec des boulettes de nourriture dans de l'eau distillée de manière à obtenir une pâte homogène. Ce mélange a été coupé en pastilles et on le laisse sécher avant de commencer l'expérience. Une étude préliminaire implique l'administration de cinq doses différentes (par exemple 0 à 0,5%, donc de 0 à 50 g de poudre végétale dans 1 kg de concentré), n' a pas révélé d'effets toxiques chez les rats adultes traités avec la *cakile* ou la *sarcocornia* à des doses allant jusqu'à 0,3% et 0,5%, respectivement. Des doses plus élevées ont entraîné à l'apparition de la toxicité, de la diarrhée et de la croissance réduite. La mortalité dans chaque groupe a été enregistré en dans les 24 h.

### 2.4. Animaux et traitement expérimental

Le protocole expérimental a été approuvé par le comité local de soins des animaux à l'Université de Sfax.

Toutes les procédures expérimentale sont été réalisées selon les lignes directrices internationales pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire (**Council of European Communities, 1986**). Des rats mâles adultes de souche Wistar pesant environ 180 à 200 g, provenant d'un élevage de la Pharmacie Centrale de Tunis (SIPHAT), sont placés dans une animalerie maintenue à une température de 21±1°C avec une alternance quotidienne de 14 h d'obscurité et de 10 h d'éclaircissement. L'humidité relative est voisine de 40%. Les rats reçoivent un régime normal d'aliment solide provenant de la Société Industrielle de Concentrés (SICO, Sfax), et une

boisson à base d'eau courante à volonté. Après une semaine d'acclimatation, les rats sont soumis à différents traitements pendant une durée de 15 jours.

Les animaux sont répartis en six groupes de huit rats chacun : Le 1<sup>er</sup> groupe (**T**) est constitué par des rats témoins soumis à un régime normal d'aliment solide. Les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> groupes (**Cm** et **Sp**) sont constitués par des rats recevant une alimentation enrichie avec *Cakile maritima* ou *Sarcocornia perennis* à raison de 30 et 50g de poudre / kg de concentré, respectivement. Cette dose a été choisie suite à des travaux préliminaires sur l'effet de doses croissantes de plante. Le 4<sup>ème</sup> groupe (**Pb**) est composé de rats qui reçoivent de l'eau contaminée à l'acétate de plomb (0,6%). Le 5<sup>ème</sup> groupe (**Cm Pb**) est constitué par des rats qui reçoivent de l'eau renfermant de l'acétate de plomb (0,6%) et une alimentation enrichie avec *Cakile maritima* à raison de 30 g / kg d'aliment. Enfin, le 6<sup>ème</sup> groupe (**Sp Pb**) est constitué par des rats qui reçoivent de l'eau renfermant de l'acétate de plomb (0,6%) et une alimentation enrichie avec *Sarcocornia perennis* à raison de 50 g / kg d'aliment.

### 2.5. Sacrifice et prélèvement des organes

Après 15 jours de traitement, les rats adultes sont anesthésiés par injection intra-abdominale d'hydrate de chloral. Les poids corporels des rats sont alors enregistrés et des échantillons de sang sont recueillis dans des tubes d'héparine par l'artère brachiale. Le foie est prélevé, nettoyé et pesé. Certains échantillons sont homogénéisés (1:2 p/v) dans du tampon Tris 50 mM (pH 7,4) contenant 150 mM de NaCl en utilisant un appareil Ultra-Turrax. L'homogénat est centrifugé à 5000 x g pendant 25 min à 4°C et des aliquotes de surnageant sont conservées à -30° C jusqu'aux analyses biochimiques.

## **2.6. Paramètres biochimiques**

### **2.6.1. Etude de la fonction hépatique**

#### **2.6.1.1. Dosage de l'ASAT sérique**

L'activité aspartateaminotransférase est mesurée par la méthode cinétique colorimétrique IFCC sans phosphate de pyridoxal, à l'aide d'un kit provenant de Biomaghreb, Tunisie (Réf. 20289).

#### **2.6.1.2. Dosage de l'ALAT sérique**

L'activité alanine aminotransférase est déterminée par la méthode cinétique colorimétrique IFCC sans phosphate de pyridoxal, à l'aide d'un kit provenant de Biomaghreb, Tunisie (Réf. 20164).

#### **2.6.2. Détermination des activités des enzymes anti oxydantes et du niveau de peroxydation lipidique**

Le niveau de peroxydation lipidique dans le foie est estimé en mesurant la formation de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) selon la méthode de **Yagi (1976)**. L'activité superoxydedismutase (SOD) est déterminée dans le foie selon la méthode de **Beyer et Fridovich (1987)**. L'activité catalase (CAT) est mesurée en utilisant la méthode d'**Aebi (1974)**, et celle de la glutathion peroxydase (GP<sub>x</sub>) selon la méthode de **Flohé et Günzler (1984)**.

### **2.6.3. Quantification des protéines**

Les taux de protéines des extraits de foie sont déterminés par la méthode de **Lowry et al. (1951)**.

#### **2.6.4. Présentation des résultats et analyses statistiques**

Toutes les données sont exprimées en tant que moyennes suivies d'erreur moyenne standard (EMS). L'étude statistique est réalisée avec le programme Stat view 5 de Windows (SAS institute, Berkeley, CA). L'analyse statistique consiste en une comparaison des différents traitements par le test ANOVA suivi du test t de Student. Les différences sont jugées significatives pour une probabilité  $p \leq 0,05$  (\*), très significatives à  $p \leq 0,01$  (\*\*) et hautement significatives à  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

### 3. RESULTATS

#### 3.1 Détermination de la toxicité aiguë de la matière sèche de la *Cakile maritima* et de la *Sarcocornia perennis*

Nous avons testés les deux doses avec soit *Sarcocornia* ou *Cakile*. Il s'est avéré qu'avec 0,5%, les rats traités avec *Cakile* ont présenté une diarrhée suivi d'une mort subite ce qui explique que cette dose est toxique pour les rats. Quant à la dose de 0,3% de *Sarcocornia*, elle n'a pas donnée de résultats satisfaisant concernant cette plante.

#### 3.2 Effets des traitements sur le poids et le contenu en protéines du foie

Après ingestion d'eau renfermant 0,6% d'acétate de plomb pendant 15 jours, on observe une diminution hautement significative du poids absolu (-22%) et relatif (-48%) du foie chez les rats (**Tableau 1**). Cette diminution est accompagnée par une réduction de 51% du niveau de protéines hépatiques. L'addition de 0,5% de *Sarcocornia* dans l'alimentation des rats traités par le plomb permet de réduire ces dommages induits par le métal sur le foie, puisque les valeurs des poids et des contenus en protéines hépatiques retrouvent celles des témoins. Sur ce plan, l'effet restaurateur du cakilier sur le poids et le contenu protéique du foie n'est que partiel, alors qu'il est total en cas d'alimentation enrichie en sarcocorne.

**Tableau 1:** Effets des traitements sur le poids absolu (en g) et relatif (en mg/g poids corporel) ainsi que le contenu en protéines (mg/g d'organe) du foie. Les rats témoins (T), nourris avec 0,3% de *Cakile* ou 0,5% de *Sarcocornia*, ou traités par l'acétate de plomb (Pb) et ayant reçu une alimentation riche en *Cakile* (Cm Pb) ou en *Sarcocornia* (Sp Pb) pendant 15 jours sont analysés.

Traitements	Poids absolu	Poids relatif	Protéines
Témoins (T)	8,32±0,26	56,41±4,65	25,77±1,84
<i>Cakile</i> (Cm)	8,20±0,54	52,17±5,57	22,08±2,84
<i>Sarcocornia</i> (Sp)	8,33±0,28	54,22±1,36	23,33±0,84
Plomb (Pb)	6,86±0,38**	38,18±0,93**	12,69±0,19***
<i>Cakile</i> + plomb (Cm Pb)	7,66±0,57 <sup>+</sup>	44,08±2,40* <sup>+</sup>	18,16±0,76 <sup>+</sup>
<i>Sarcocornia</i> + plomb (Sp Pb)	8,20±0,36 <sup>++</sup>	51,08±1,83 <sup>+++</sup>	23,91±0,28 <sup>+++</sup>

Nombre de déterminations (n = 4). Les différences significatives entre les groupes ont été mentionnées comme suit :

Rats traités au plomb par rapport aux témoins : \*p <0,05 ; \*\* p <0,01 ; \*\*\* p <0,001.

Rats supplémentés avec Cm (Cm Pb) ou Sp (Sp Pb) vs. rats traités au plomb (Pb):<sup>+</sup> p<0,05 ; <sup>++</sup> p<0,01 ; <sup>+++</sup> p<0,001

### 3.3 Impact des traitements sur le fonctionnement hépatique (taux de transaminases)

Dans nos conditions expérimentales, les animaux traités par le plomb pendant 15 jours présentent une élévation significative des taux sériques en ASAT et ALAT, respectivement de l'ordre de 23% et 47% par rapport aux témoins. L'addition de 0,5% de sarcocorne ou de 0,3% de cakilier dans

l'alimentation des rats traités par le plomb permet de diminuer ces taux de transaminases jusqu'à des valeurs proches de celles obtenues chez les rats témoins.

Le **tableau 2** montre que l'effet protecteur de *Sarcocornia* contre l'inflammation hépatique causée par le plomb est plus puissant que celui de *Cakile*. La diminution de ces deux paramètres par rapport à ceux des rats traités à l'acétate de plomb sans toutefois rejoindre la valeur des témoins.

**Tableau 2:** Niveaux de transaminases sériques (ASAT et ALAT) chez les rats témoins (T), nourris avec 0,3% de *Cakile* (Cm) ou 0,5% de *Sarcocornia*(Sp) ou traités par l'acétate de plomb (Pb) (0,6%) et recevant une alimentation additionnée en *Cakile* (Cm Pb) ou en *Sarcocornia* (Sp Pb) pendant 15 jours.

Traitements	ASAT (UI/L)	ALAT (UI/L)
Témoins (T)	123,40±2,75	25,74±0,36
Plomb (Pb)	150,46±1,66 <sup>***</sup>	48,46±0,94 <sup>***</sup>
Cakile + plomb (Cm Pb)	134,12±5,35 <sup>++</sup>	40,31±0,36 <sup>+++</sup>
Sarcocornia + plomb (Sp Pb)	133,68±3,14 <sup>+++</sup>	35,15±1,49 <sup>+++</sup>

Nombre de déterminations (n = 4).

Les différences significatives entre les groupes ont été mentionnées comme suit :

Rats traités au plomb par rapport aux témoins : \*p <0,05 ; \*\* p <0,01 ; \*\*\* p <0,001.

Rats supplémentés avec Cm (Cm Pb) ou Sp (Sp Pb) vs. rats traités au plomb (Pb):<sup>+</sup> p<0,05 ; <sup>++</sup> p<0,01 ; <sup>+++</sup> p<0,001



### 3.4 Impact des traitements sur la peroxydation lipidique et le système enzymatique antioxydant au niveau hépatique

Le traitement des rats par l'acétate de plomb pendant 15 jours entraîne une augmentation des taux de TBARS au niveau hépatique de l'ordre de 73% par rapport aux rats témoins (**Tableau 3**). A l'inverse, l'ajout de *Sarcoconia* ou de *Cakile* dans l'alimentation des rats traités par le plomb fait diminuer de façon significative la peroxydation lipidique au niveau du foie.

De même sur le système enzymatique antioxydant, l'administration de l'acétate de plomb à raison de 0,6% pendant 15 jours provoque une diminution significative des activités de la SOD, CAT et GPx hépatique chez les rats mâles, de l'ordre de -50% ; -20% et -51%, respectivement (**Tableau 3**). La supplémentation par *Sarcoconia* ou *Cakile* augmente de façon importante l'activité des systèmes antioxydants au niveau hépatique. La restauration des niveaux normaux du statu oxydatif et des systèmes antioxydants est totale avec *Sarcoconia*, seulement partielle avec *Cakile*.

**Tableau 3:** Peroxydation lipidique (nmol TBARS/mg de protéines) et activités antioxydantes (SOD en U/mg de protéines, CAT en  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /mg de protéines/mn et GPx en nmol GSH réduit/mg de protéines/mn) au niveau hépatique chez les rats témoins (T), nourris avec 0,3% de *Cakile*(Cm) ou 0,5% de *Sarcoconia* (Sp), traités par l'acétate de plomb (0,6%) seul (Pb) ou ayant reçu une alimentation additionnée de *Cakile* (Cm Pb) ou de *Sarcoconia* (Sp Pb) pendant 15 jours.

Paramètres	Peroxydation lipidique		Activités enzymatiques antioxydantes		
	TBARS	SOD	CAT	GPx	
Témoins (T)	1,10±0,25	35,80±2,81	78,61±2,90	5,43±0,52	
Cakile (Cm)	1,04±0,16	30,29±0,64	75,38±2,15	4,67±0,05	
Sarcoconia (Sp)	1,03±0,10	31,20±4,60	77,81±3,30	5,42±0,22	
Plomb (Pb)	4,13±0,38 <sup>***</sup>	17,75±2,03 <sup>***</sup>	62,71±2,34 <sup>***</sup>	2,65±0,070 <sup>***</sup>	
Cakile + plomb (CmPb)	2,61±0,34 <sup>***</sup>	20,51±4,12 <sup>**</sup>	75,78±4,97 <sup>++</sup>	3,01±0,12 <sup>***</sup>	
Sarcoconia + plomb (SpPb)	1,04±0,35 <sup>+++</sup>	33,87±1,33 <sup>+++</sup>	78,59±3,977 <sup>+++</sup>	4,68±0,07 <sup>+++</sup>	

Nombre de déterminations (n = 4).

Les différences significatives entre les groupes sont mentionnées comme suit :

Rats traités au plomb par rapport aux témoins : \*p <0,05 ;\*\*\* p <0,001.

Rats supplémentés avec Cm (Cm Pb) ou Sp (Sp Pb) vs. rats traités au plomb (Pb):+ p <0,05 ; ++ p <0,01 ; +++ p <0,001.

#### 4. DISCUSSION

Dans la présente étude, l'exposition au plomb des rats adultes a causé une augmentation significative du taux de ce métal dans les tissus hépatiques. L'augmentation des niveaux de plomb dans le foie est accompagnée d'une augmentation significative des taux d'ALAT et d'ASAT sériques. Selon **Williamson et al. (1996)**, des niveaux élevés d'aspartate et d'alanine aminotransférases sont des paramètres fiables pour détecter des dommages hépatiques. En règle générale, ces résultats peuvent indiquer des changements dégénératifs et nécrotiques dans le foie (**El-Nekeety et al., 2009**).

Bien que le mécanisme exact de la toxicité du plomb soit encore mal connu, les données accumulées dans la littérature montrent que l'exposition à ce métal induit une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène et un épuisement de la capacité antioxydante cellulaire. Un déséquilibre des systèmes pro-oxydant/antioxydant aux niveaux tissulaire et cellulaire est connu pour être la cause de dommages aux membranes, à l'ADN ou aux protéines, pour enfin détruire les tissus (**Hsu et Guo, 2002 ; Ahamed et Siddiqui, 2007 ; Ahamed et al., 2009 ; Franco et al., 2009 ; Liu et al., 2010**). La peroxydation lipidique est la dégradation oxydative des lipides membranaires en présence de radicaux libres oxydants, et les TBARS, produits de cette peroxydation lipidique, sont utilisés comme marqueurs pour en évaluer l'intensité (**Kamalakkannan et Prince, 2004**). Dans notre étude, l'intoxication des rats par le plomb induit une élévation des taux de TBARS au niveau hépatique, confirmant des dommages oxydatifs tels que la peroxydation des lipides membranaires, en raison de la production de radicaux peroxydes induite par l'intoxication (**Marnett, 1999 ; Sharma et al., 2010**).

Nous avons essayé d'identifier un moyen de lutte contre les effets toxiques du plomb aux niveaux hépatique en utilisant des plantes halophytes (*Sarcocornia perennis* et *Cakilemaritima*), administrées par voie orale chez les rats. La consommation de *S. perennis* et, dans une moindre mesure, de *C. maritima* réduit nettement la toxicité induite par le plomb chez les rats, en restaurant la croissance corporelle, la plombémie et le poids des organes. De plus, les 2 halophytes testés diminuent nettement les taux sériques d'ASAT et ALAT chez les rats traités par le plomb. Ces résultats suggèrent que la sarcocorne et le cakilier exercent un effet protecteur contre l'inflammation hépatique.

De tels effets anti-inflammatoires ou cytoprotecteurs ont déjà été démontrés chez quelques espèces d'halophytes (**Ksouriet al., 2012**).

D'après la littérature, les halophytes commencent à être reconnus spécialement pour leur capacité à éliminer les substances nocives telles que les ROS, car elles sont équipées d'un système antioxydant puissant constitué par des composés enzymatiques et non enzymatiques (**Ben Amor et al., 2006 ; Ksouri et al., 2008, 2010 ; Jaleel et al., 2009**). Cette défense efficace peut retarder l'oxydation des lipides ou d'autres macromolécules, en neutralisant les radicaux libres, réduisant ainsi les espèces réactives de l'oxygène ou chélatant les ions métalliques (**Cook et Samman, 1996**). De tels effets traduisent la capacité antioxydante des plantes, qui est généralement attribuée à leur richesse en composés phénoliques. Ainsi, comme il a été rapporté chez *Cakile maritima* (**Ksouriet al., 2007**), les dérivés de la catéchine sont les composés antioxydants les plus abondants, et ils pourraient être responsables de l'atténuation du stress oxydatif induit par le plomb dans notre étude. Chez *Sarcocornia*, seuls quelques composés potentiellement antioxydants ont été étudiés (polyphénols, acide ascorbique,  $\beta$ -carotène et uréides) (**Parida et Das, 2005 ; Brychkova et al., 2008**) et un travail d'identification exhaustif est en cours au laboratoire. De plus, bon nombre de composés naturels contenus chez les halophytes présentent souvent plusieurs activités biologiques, notamment antimicrobiennes, antiprolifératives et anti-inflammatoires (**Hofmann et Sonenshein, 2003 ; Suhaj, 2006 ; Ksouri et al., 2012**). Par conséquent, les halophytes et les composés actifs qu'elles renferment, suscitent beaucoup d'intérêt pour des applications dans différents domaines tels que les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

#### 5. CONCLUSION

En résumé, le traitement des rats adultes par l'acétate de plomb pendant 15 jours induit une atrophie hépatique et une augmentation des biomarqueurs d'inflammation (ASAT et ALAT). Le plomb administré entraîne une élévation du taux des TBARS aux niveaux hépatiques et une diminution des activités enzymatiques SOD, CAT et GPx, confirmant l'existence d'un stress oxydant. La consommation de *Sarcocornia*, et dans une moindre mesure, de *Cakile* par les rats intoxiqués

au plomb restaure tous les paramètres mesurés précédemment à des niveaux quasi-normaux. La sarcocorne et le cakilier jouent donc un rôle protecteur très important chez l'animal en inhibant la toxicité induite par le plomb, sans doute grâce à leur richesse en composés bioactifs, et pourraient donc avoir un intérêt dans la prévention et/ou le traitement du saturnisme.

## 6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aebi, H., 1974. Catalase. In: H.U. Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analysis, vol. 2, Ed. Academic Press, New York, pp. 673–684.
- Ahamed, M., Mehrotra, P.K., Kumar, P., Siddiqui, M.K.J., 2009. Placental lead-induced oxidative stress and preterm delivery. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 27, 70–74.
- Ahamed, M., Siddiqui, M.K.J., 2007. Low levels lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin. Chim. Acta.* 383, 57–64.
- Ben Amor, N., Jiménez, A., Megdiche, W., Lundqvist, M., Sevilla, F., Abdelly, C., 2006. Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakilemaritima*. *Physiol. Plant.* 126, 446–457.
- Beyer, W.F., Fridovich, I., 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161, 559–566.
- Bielarczyk, H., Tian, X., Suszkiw, J., 1996. Cholinergic denervation-like changes in rat hippocampus following developmental lead exposure. *Brain Res.* 708, 108–115.
- Brychkova, G., Alikulov, Z., Fluhr, R., Sagi, M., 2008. A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1* Arabidopsis mutant. *Plant J.* 54, 496–509.
- Cook, N.C., Samman, S., 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7, 66–76.
- Council of European Communities, Council Instructions about the Protection of Living Animals Used in scientific Investigations. Official Journal of the European Communities (JO 86/609/CEE);1986, L358:1-18.
- Da Silva de Assis HC, Sánchez-Chardi A, Dos Reis RC, Nicaretta L, Mencinauski C, Jakobi SC, da Silva PH, Zampronio AR, Pelletier E, de Oliveira Ribeiro CA., 2005. *Mutat. Res.* 742, 12–30
- El-Nekeety, A.A., El-Kady, A.A., Soliman, M.S., Hassan, N.S., Abdel-Wahhab, M.A., 2009. Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) against lead acetate-induced oxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2209–2215.
- Flohé, L., Günzler, R., 1984. Assays of glutathion peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114–121.
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M., Panayiotidis, M.I., 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. *Mutat. Res.* 674, 3–22.
- Goyer, R.A., Klaassen, C.D., Waalkes, M.P., 1995. Metal toxicology. Academic Press, San Diego/London, California, 525 p.
- Guimarães, D., Carvalho, M.L., Geraldes, V., Rocha, I., Alves, L.C., Santos, J.P., 2012. Lead in liver and kidney of exposed rats: aging accumulation study. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 26(4), 285–290.
- Hofmann, C.S., Sonenshein, G.E., 2003. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate induces apoptosis of proliferating vascular smooth muscle cells via activation of p53. *FASEB J.* 17, 702–704.
- Hsu, P.C., Guo, Y.L., 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 180, 33–44.
- Jaleel, C.A., Ksouri, R., Gopi, P., Manivannan, J., Ines, H., Al-Juburi, Z., ChangXing, S., Hong, B., Panneerselvam, R., 2009. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiol. Plant.* 31, 427–436.
- Kamalakkanan, N., Prince, P.S.M., 2004. Antidiabetic and anti-oxidant activity of *Aeglemarmelos* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm. Biol.* 42, 125–130.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C., 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakilemaritima*. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 244–249.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Jallali, I., Debez, A., Magné, C., Hiroko, I., Abdelly, C., 2012. Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32, 289–326.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C., 2008. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol.* 331, 865–873.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Koyro, H.W., Abdelly, C., 2010. Responses of halophytes to environmental stresses with special emphasis to salinity. *Adv. Bot. Res.* 53, 117–145.
- Liu, C.M., Ma, J.Q., Sun, Y.Z., 2010b. Quercetin protects the rat kidney against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30, 264–271.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mut. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.* 424, 83–95.
- Mattison, D.R., 2010. Environmental exposures and development. *Cur. Opin. Pediatrics* 22, 208–218.
- Nocentini, S., Guggiari, M., Rouillard, D., Surgis, S., 2001. Exacerbating effect of vitamin E supplementation on DNA damage induced in cultured human normal fibroblasts by UVA radiation. *Photochem. Photobiol.* 73, 370–377.
- Parida, A.K., Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 60, 324–349.
- Sharma, R.P., Street, J.C., 1980. Public health aspects of toxic heavy metals in animal feeds. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 177, 149–153.
- Sharma, V., Sharma, A., Kansal, L., 2010. The effect of oral administration of *Allium sativum* extracts on lead nitrate induced toxicity in male mice. *Food Chem. Toxicol.* 48, 928–936.
- Suhaj, M., 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J. Food Comp. Anal.* 19, 531–537.
- Yagi, K., 1976. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15, 212–216.
- Zimmerman, H.J., Seeff, L.B., 1970. Enzymes in hepatic disease. In: Goodly E.E. (Ed.), *Diagnostic in enzymology*, Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 24–26.

# RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le Journal de l'information Médicale de Sfax publie en français, en arabe et en anglais des articles originaux, cas cliniques, lettres à la rédaction, mises au point et revues générales, échos des congrès, revues de presse médicale, qui n'ont pas fait l'objet d'une publication antérieure. Les éditoriaux sont demandés à un auteur par la rédaction.

## ENVOI DES TEXTES

Les textes/manuscrits sont adressés à la rédaction sous forme d'un fichier informatique à l'adresse mail: [jimsfaxfms@gmail.com](mailto:jimsfaxfms@gmail.com)

## PRESENTATION DU MANUSCRIT

Les textes doivent être dactylographiés sur feuilles 21 x 29,7 cm, double interligne avec une marge de 3,5 cm. Les pages doivent être numérotées. Le texte/manuscrit comporte dans l'ordre et sur des feuilles séparées :

### 1/ La page de titre :

- Titre concis, sans abréviations -Prénoms (sans abréviation) en minuscules sauf pour la 1ère lettre et noms des auteurs en majuscules dans l'ordre dans lequel ils doivent apparaître.
- Adresses et références des institutions de chacun des auteurs. -Le nom, l'adresse et les coordonnées (téléphone, fax, e-mail) de l'auteur à qui doit être adressée la correspondance.

### 2/ Le résumé avec les mots clés en ordre alphabétique (en arabe, en français et en anglais) :

Il comprend une introduction précisant l'objectif du travail, une description sommaire de la méthodologie, les principaux résultats et leurs significations, un commentaire répondant clairement aux questions posées et une phrase de conclusion.

### 3/ Le texte proprement dit :

Est rédigé dans un style clair, sans abréviations si possible, sauf s'il s'agit d'une unité de mesure internationale.

Ailleurs, le terme en entier doit précéder l'abréviation entre parenthèse lors de sa première apparition dans le texte. Les articles originaux comportent dans l'ordre : introduction, matériel et méthode, résultats, commentaires / discussion et conclusion.

### 4/ Les références :

Elles sont numérotées par ordre d'apparition dans le texte et doivent toutes y être représentées par leurs numéros. Toutes les références citées dans le texte doivent figurer dans la liste des références et vice versa. Leur rédaction est celle de l'index medicus : -Lister tous les auteurs. Si leur nombre est supérieur à six, citer les six premiers suivis de al. -Pour les périodiques : Nom(s) et initiales (s) du (des) prénom (s) de l' (des) auteur (s), titre complet de l'article en langue originale, abréviation du titre de la revue conforme à celle de l'index medicus ; année de parution, volume (en gras), première et dernière page. - Pour les livres : Nom (s) et initiale (s) du (des) prénom (s) de l' (des) auteur (s), titre du livre, numéro de l'édition, année de parution, pages à consulter.

## TABLEAUX

Chaque tableau est présenté sur une feuille séparée et comporte en haut un numéro d'appel (chiffres romains) selon l'ordre d'apparition dans le texte et le titre. Les abréviations sont expliquées en bas des tableaux.

## ILLUSTRATIONS

Les figures doivent être d'excellente qualité, car elles sont éditées sans retouches. Les auteurs fournissent l'original numérique ou des images scannées. Les légendes des figures sont regroupées sur une feuille à part et sont données en français et en anglais. Les patients photographiés ne doivent pas être identifiables.