

ARCHIVES DE L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

Fondées en 1906 par Charles Nicolle

Publication Semestrielle

**LES ARCHIVES DE L'INSTITUT
PASTEUR DE TUNIS**

Revue de publication semestrielle
fondée en 1906 par Charles Nicolle

ISSN 0020-2509

COMITE DE REDACTION

Professeur Koussay DELLAGI: Président

Dr. Mohamed ELAYEB: Editeur en chef

Dr. Abdeljelil GHRAM: Responsable de la publication

Dr. Ridha BARBOUCHE: Membre

Dr. Ikram GUIZANI: Membre

Dr. Afif BEN SALAH: Membre

Dr. Helmi MARDASSI: Membre

Dr. Sonia ABDELHAK: Membre

Melle Héla KAROUI: Rédactrice

Prix de l'abonnement par an :

Étranger: 25 U.S.\$

Tunisie: 20 Dinars

Pour les échanges et services, s'adresser au

Secrétariat de Rédaction des Archives,

Institut Pasteur de Tunis,

13, Places Pasteur, BP 74,

1002 Tunis-Belvédère

Tél: 71 783 022 - Fax: 71 791 833

PICTURA

Imm. « Les Chalets » - 4^e étage- Lot. HBC 1-

Lotissement ENNACIM 1

1002- MONTPLAISIR TUNIS

Tél: 71 788 077 - 71 844 069 - Fax: 71 786 027

Email: pictura@pictura.com.tn

SOMMAIRE

J-P. Bouvet et M. Zouali

Les anticorps silencieux 3

N. Kharrat, M. Rebaï et A. Rebaï

*Le déséquilibre de liaison dans le génome humain
et son exploitation*..... 9

**H. Mardassi, A. Namouchi, A. Karboul, N. khabouchi,
R. Haltiti, M. Zarrouk, B. mhenni et S. Kaabi**

*Intérêt de la méthode de génotypage « Ligation-Media-
ted PCR » dans la surveillance des souches épidémiques
de Mycobacterium tuberculosis*..... 23

T. Ben-Hamouda et K. Ben-Mahrez

*Prédominance et évolution des genes blasbv chez
Klebsiella pneumoniae dans un milieu hospitalier de
Tunis* 31

**N. Soudani, J. Gharbi-Chihi, N. Srairi-Abid, H. Kaabi,
A.Margotat, J. Torresani et M. El Ayeb**

*Identification d'une seconde protéine activant
la lipolyse à partir de scorpion Butbus occitanus
tunetanus* 39

**L. Hadjkacem Loukil, T. Sellami Boudawara, I. Ayadi,
A. Bahloul, R. Jliidi, H. Ayadi et L. Ammar-Keskes**

*Immunoexpression élevée du récepteur aux androgènes
dans le testicule humain ayant "Sertoli cell only" 47*

**F. Cherif, N. Mnajja, S. Feriani, Z. Marrakchi Ben Saïd,
M.H. Jaafoura, A. Ben Osman Dhahri et S. Boubaker**

*Les épidermolyses bulleuses héréditaires en Tunisie:
étude épidémiologique et ultra-structurale* 53

**E. Fehri, A. Ayadi, S. Boubaker, S. Karray, H. Jaafoura
A. El Hili, P.Galle et L.Tekaya**

*Lantbanides et microanalyse et effets de l'administra-
tion orale de deux lantbanides : étude ultrastructurale
et microanalytique* 59

Mv El May, S Zekri, S Boubaker, A Ladgham et A El May
*Surcharge iodée chronique et apoptose dans les nodules
froids de goîtres endémiques multinodulaires* 69

**M. El Ati - Hellal, A. Hedhili, F. Hellal, K. Boujlel,
M. Dachraoui, M.Bousnina, H.Ghorbel et M. Ndhif**

*Concentrations du plomb et du cadmium dans l'eau
de mer et les algues de la côte tunisienne* 75

Recommandations aux auteurs 83

Bulletin d'abonnement 85

CONTENTS

J-P. Bouvet and M. Zouali

Silent antibodies 3

N. Kharrat, M. Rebaï and A. Rebaï

Linkage disequilibrium into human genom and its study profit 9

H. Mardassi, A. Namouchi, A. Karboul, N. khabouchi, R. Haltiti, M. Zarrouk, B. mhenni and S. Kaabi

Usefulness of ligation-mediated PCR genotyping in tracking outbreak-associated Mycobacterium tuberculosis strains 23

T. Ben-Hamouda and K. Ben-Mahrez

Predominance and evolution of BLASHV genes in Tunisian clinical isolates of Klebsiella pneumoniae 31

N. Soudani, J. Gharbi, N. Srairi-Abid, H. Kaabi, A. Margotat, J. Torresani and M. El Ayeb

Identification of second lipolysis activating protein from scorpion Buthus occitanus tunetanus39

L. Hadjkacem Loukil, T. Sellami Boudawara, I. Ayadi, A. Bahloul, R. Jlidi, H. Ayadi and L. Ammar-Keskes

High androgen receptor immunoexpression in human "Sertoli cell only" testis47

F. Cherif, N. Mnajja, S. Feriani, Z. Marrakchi Ben Saïd, M. H. Jaafoura, A. Ben Osman Dhahri and S. Boubaker

Hereditary epidermolysis bullosa in Tunisia : an epidemio-clinical and ultrastructural study53

E. Fehri, A. Ayadi, S. Boubaker, S. Karray, H. Jaafoura, A. El Hili, P.Galle and L. Tekaya

Lanthanides and microanalysis : Effects of oral administration of two lanthanides : ultra structural and micro analytical study59

Mv. El May, S. Zekri, S. Boubaker, A. Ladghan and A. El May

Chronic iodine overload and apoptosis in cold nodules from endemic multinodular goiters69

M. El Ati - Hellal, A. Hedhili, F. Hellal, K. Boujlel,

M. Dachraoui, M.Bousnina, H.Ghorbel and M. Ndhif
Lead and cadmium concentrations in seawater and algae of the tunisian coast75

Recommendations for authors 83

Subscription form 85

SILENT ANTIBODIES

J-P. BOUVET¹ AND M. ZOUALI*

¹ *Institut National de Santé et de Recherche Médicale (INSERM U 430),
Immunopathologie Humaine, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France.*

* *Auteur correspondant
E.mail : moncef.zouali@wanadoo.fr*

RESUME

Au cours des dernières années, des progrès importants ont été accomplis dans la compréhension du lymphocyte B et des fonctions de reconnaissance des anticorps, notamment dans le contexte des maladies auto-immunes. A côté des «anticorps naturels» polyréactifs, des travaux récents suggèrent l'existence d'immunoglobulines sans spécificité apparente, mais qui peuvent acquérir une polyréactivité après dénaturation dans des sites inflammatoires. Elles sont appelées «anticorps silencieux». En conjonction avec d'autres acquisitions sur le développement, la sélection et la signalisation du lymphocyte B, ces données sont importantes pour la compréhension de l'auto-immunité.

Mots clefs : *Autoréactivité, autoanticorps, anticorps naturels, autoimmunité, cellulesB.*

INTRODUCTION

The study of antibody generation to antigenic stimulation has been a long-standing subject of investigation in immunology. The functional properties of antibodies even served to distinguish adaptive, antigen-specific immune defense mechanisms from innate, non-specific mechanisms of protection against pathogens. Antibodies produced to a specific exogenous antigen subsequently trigger various functional effects, such as agglutination, precipitation, and activation of the complement cascade and cell activation via specific receptors. Over the past years, progress has been made in understanding B cells and antibody recognition functions, particularly in the context of autoimmune diseases.

SUMMARY

Over the past years, progress has been made in understanding B cells and antibody recognition functions, particularly in the context of autoimmune diseases. In addition to the existence of "natural antibodies", recent studies suggest the existence of immunoglobulins with no apparent specificity that may acquire polyreactivity following a mild denaturation in inflammatory sites. They are called "silent antibodies". Together with related observations on B cell development, selection and signaling, the recent insights are providing clues into our understanding of autoimmunity.

Key words: *Autoreactivity, autoantibodies, natural antibodies, autoimmunity, B cells.*

POLY-REACTIVITY AND SELF-REACTIVITY

Antibodies belong to the immunoglobulin superfamily that comprises phylogenetically ancient molecules. They share a common structure based on the presence of globular domains maintained by disulfide bonds¹. Having largely preceded the appearance of immunoglobulins, members of this family include a large variety of receptors and molecules of the immune system, including the T cell receptor and the B cell receptor (BcR) and its soluble form, the immunoglobulin molecule². This latter molecule is composed of two chains, heavy- (H) and light- (L), each of which contains a constant (C) and a variable (V) region. The constant domains of the H-chain are responsible for

the effector functions, whereas the V_H and or V_L domains impart specific recognition.

The initial concept that the normal B cell repertoire has the potential for self-reactivity³ has received ample experimental support⁴. In the early eighties, several laboratories reported that normal human sera and some monoclonal immunoglobulins, called "natural antibodies" can bind to several unrelated antigens^{5,7}. Interestingly, this polyreactivity was mainly directed against self-component (autoantibodies) and occurred spontaneously, in the absence of deliberate immune stimulation. It has been proposed that these antibodies correspond to the modern form of primitive antibodies derived from a degenerate self-receptor belonging to the superfamily of immunoglobulins⁸. The acquired polyreactivity and the duplication of immunoglobulin variable region genes may have led to a simple primordial immune system devoted to clearance of degraded self-components.

STRUCTURAL BASIS OF POLYREACTIVITY

Natural antibodies are polyreactive and recognize self-components. In contrast to antigen-driven antibodies produced during secondary immune responses, the affinity of natural antibodies does not vary, a feature probably reminiscent of the history of the humoral immune system. It seems to represent a property useful for the clearance of degraded self-antigens. Recently, the structural basis of polyreactivity was investigated. It was found that several, and sometimes overlapping, areas of the H- and L-chain can be involved in polyreactive binding. A crystallographic study of such an immune complex showed that the antigen can combine with the sole V_L domain, far from the V_H domain and the V_H-V_L junction^{9,10}. Moreover, conformational changes can occur in a single antibody¹¹, a property that contrasts with that of monoreactive antibodies that often contain a rigid and small combining site.

CLONAL ANALYSIS OF THE POLY-REACTIVE REPERTOIRE

These findings were extended to a quantitative clonal analysis of the B cell repertoire¹²⁻¹⁴. In the murine system, autoantibody-secreting cells are detectable by using the hemolytic plaque-forming cells assay or the

Spot-ELISA technique, and the frequency of self-reactive B cell precursors is at the level of 2×10^3 to 2×10^4 . This "normal" autoreactivity is also detectable by the hybridoma technology: a surprisingly high level of reactivity toward self-determinants was reported for monoclonal antibodies derived from normal, germ-free, or neonatal mice¹⁵. In humans, initial studies of myeloma proteins with autoantibody activity provided the first evidence for this high degree of self-reactivity¹⁶⁻¹⁸. These molecules are monoclonal immunoglobulins produced by transformed antibody-forming cells growing in an uncontrolled fashion and present in large amounts in the serum of patients with multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia.

In humans, the frequencies of antibody forming cell precursors were determined in the peripheral immune repertoire. In one study, the B cell clones expressing IgM and IgG receptors reactive with a variety of self and exogenous antigens were quantified. Using two panels of self- and exogenous antigens, it was demonstrated that a proportion of B cell precursors of the normal immune repertoire is committed to production of IgM binding to self- and exogenous antigens. A marked paucity of IgG antibody B cell precursors that impart reactivity with self- and exogenous antigens was also noted¹⁴. The demonstration of a high percentage of B cells with polyreactive membrane Immunoglobulins may reflect possible functions of the corresponding clonotypes in immune regulation.

FUNCTIONS OF POLY-REACTIVE ANTIBODIES

The precise function of these pre-immune receptors remains speculative. One possibility is that, by providing the immune system with receptors able to react with several unrelated antigenic motifs, they may represent a first line of protection against external invaders. Thus, it is well known that exposure to infectious agents is associated with polyclonal activation and autoantibody hyperproduction¹⁹. The titer of autoantibodies steadily rises during the course of viral, bacterial and parasitic infection. That the presence of such antibodies may bear functional significance comes from studies of antibodies to *Streptococcus*. In sera from randomly selected healthy human individuals, a high proportion of antibodies to

Group A streptococcal carbohydrate are found²⁰. There also is a high proportion of B cell precursor to the same streptococcal determinant²⁰ and to other épitopes¹⁴.

The origin of these *Streptococcus*-binding, multireactive paratopes may lie in the persistence of streptococci in human tonsils without any symptoms of tonsillitis. It is conceivable that the immune system prevents overgrowth of these bacteria by maintaining a potent state of first line IgM natural immunity. Their cross-reactivity with foreign antigens also may provide the immune system with a first-line defense mechanism against pathogens. This system probably was the template upon which a more sophisticated immune system developed, providing, by virtue of its high specificity and affinity, an "à-la-carte" responses to pathogens. Evidence of this hypothesis comes from the demonstration that natural antibodies are encoded by germ-line V genes^{9, 10, 21}, a configuration that contrasts with that of immunization-induced antibodies^{21, 22} and pathogenic autoantibodies²³⁻²⁵. The co-existence of natural polyreactive and antigen-induced monoreactive antibodies suggests that they may act in a complementary fashion, particularly at the mucosal barrier²⁶. The first provides an early, continuous, but weak protection. The second imparts an efficient, but delayed response.

"SILENT" ANTIBODIES

In parallel with these studies, two groups described a new phenomenon of transformation of "silent" immunoglobulins into polyreactive autoantibodies²⁷⁻³⁰. This dramatic change occurs *in vitro* after treatment with dissociative agents, such as urea, thiocyanate, acidity, but also with oxygen radicals. Apparently, the transformation is irreversible and can even occur *in vivo* within inflammatory sites. These results seem to enlighten the physiological role of the various types of immunoglobulins, i.e. monoreactive (antigen-induced), polyreactive (natural), and silent (transformable). This latter subset may be closely related to natural antibodies, but they lack polyreactivity. They remain in the circulation harmlessly with a half-life similar to that of the antigen-induced antibodies. This contrasts with the short half-life of natural antibodies that may be due to their reactivity with serum and cell components³¹. We propose that "silent" antibodies

form a reservoir of unreactive immunoglobulins. *In situ*, they that may be transformed into polyreactive immunoglobulins and contribute locally to the clearance of degraded molecules. Another, recently reported, activity of polyreactive immunoglobulins emerged from studies of cell surface immunoglobulins on B lymphocytes. Polyreactive B cells may interfere with presentation of autoantigens in the thymus and, hence, with the surveillance of T cell-mediated autoimmunity³².

AUTOREACTIVITY AND DISEASE

A key question in autoimmune research concerns the relatedness of aggressive autoantibodies to antibodies of the preimmune polyreactive repertoire, also with an autoantibody activity. One possibility holds that autoimmune diseases are the result of the presence of large amounts of polyreactive antibodies, also referred to as natural antibodies^{33, 34}. However, pathogenic autoantibodies are qualitatively distinct from those of the preimmune repertoire. First, autoimmunity seems to develop in a structured fashion that cannot be attributed to a random escape from immunological control in a manner reminiscent of "polyclonal" stimulation. At the cellular level, for instance, the results of clonal quantification-based analysis of the B cell repertoire of lupus paratopes that impart reactivity with self and not-self, are not compatible with the polyclonal activation model^{14, 23, 24, 35}.

Second, disease-related autoantibodies are qualitatively distinct from those of the preimmune repertoire. Anti-DNA antibodies produced by NZB mice, which rarely develop nephritis, are predominantly of the IgA, and rarely IgG isotype, but all are essentially anionic in charge. In contrast, the majority of anti-DNA antibodies derived from female (NZB X SWR) F1 mice, which die of accelerated lupus nephritis, are of the IgG isotype and their charge is cationic. More importantly, the appearance of these positively charged anti-DNA antibodies is concomitant with the onset of glomerulonephritis and the anti-DNA antibodies found in the renal lesions of lupus mice are essentially of the IgG_{2a}κ isotype³⁶. When injected into normal mice, cationic anti-DNA antibodies and cationic immune complexes deposit in glomeruli³⁷.

Studies of the idiotopes expressed by autoantibodies gave also important clues. Initially, several groups

reported that human autoantibodies express a restricted set of idiotopes. More elaborate analysis revealed that, schematically, the various anti-DNA idiotopes described in the literature can be assigned to two broadly representative families³⁸. One set expressing the IgM isotype can be found in a number of normal and pathological conditions, and is encoded for by germline Ig-variable gene elements. Another set is more restricted to lupus disease. It seems that the first set is a marker of multi-reactive antibodies of the preimmune repertoire, and that the second set is linked with pathogenic antibodies. It is likely that the idiotypic recurrence observed in both cases is related to distinct mechanisms²¹. Recurrent idiotypes of the preimmune repertoire can be explained by the presence of the corresponding clonotype precursors at a genetically programmed high frequency. Dominant idiotypes of the second type would result from preferential antigen- or idio-type-driven clonal expansion of a selected number of clonotypes.

CONCLUSIONS

The observations summarized above, together with related findings^{39, 40}, illustrate some of the ways studies of antibodies and B cells are providing insight into our understanding of autoimmunity. In addition to genetic susceptibility, it has become clear that environmental factors play a role in triggering an autoimmune response. For example, metal ions can bind proteins and render them immunogenic. Some antigens may provoke an antigen-specific B cell response in the absence of T cell help and may abrogate immune tolerance through T cell-independent activation and B cell receptor-specific engagement. This tolerance breakdown, in which a self-mimicking microbe can reverse B cell tolerance, operates in the periphery on B cells that have been presumably tolerized. Thus, a defect in B cell recognition may play a role in humoral autoimmunity, a finding reminiscent of the role of pathogen-related antigens in autoimmune diseases. Other data imply a role of T cells. For example, mercury salts can shift an autoimmune response of some inbred animals and alter the Th1- and Th2-like cytokine profiles⁴¹. Also important is how deregulations in signaling pathways may interfere with tolerance to self. Normally, several complex

checkpoints operate at the molecular and cellular levels to regulate B cell tolerance to self and a large number of loci must function together to induce immunity. It is estimated that over 100 candidate genes may influence autoimmunity^{42, 43} and it has become clear that signaling molecules are important. Not only lymphocyte receptors are able to sense the nature of encountered molecules, but they also generate signals that are appropriately delivered to the intracellular machinery, allowing specific functional responses⁴⁴. The amount of signals generated is fine-tuned for optimal transmission, and kinases and phosphatases control most activities. Recent experiments with mice rendered deficient in signaling molecules have revealed that a tight regulation of signaling pathways is required to prevent overt autoimmunity, implying that faulty cell signaling may cause or exacerbate disorders of the immune system⁴⁵. This prediction is supported by observations showing that the phosphorylation patterns of some T and B lymphocytes proteins are aberrant and that the activities of some protein kinases and phosphatases are altered in systemic autoimmunity^{46, 47}. This could account for the impairment of the immune response to various stimuli, such as occurs in human lupus⁴⁸. Understanding the biochemical thresholds and regulation of cell activation in normal and diseased subjects may lead to designing novel immunointervention strategies.

REFERENCES

- 1- **T. Takahashi, T. Iwase, N. Takenouchi, M. Saito, K. Kobayashi, Z. Moldoveanu, J. Mestecky and I. Moro** (1996). The joining (J) chain is present in invertebrates that do not express immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**, 1886-1891.
- 2- **D. M. Halaby and J. P. Mornon** (1998). The immunoglobulin superfamily: an insight on its tissular, species, and functional diversity. *J. Mol. Evol.*, **46**, 389-400.
- 3- **S. Boyden** (1966). Natural antibodies and the immune system. *Adv. Immunol.*, **5**, 1-28.
- 4- **M. Zouali** (2002). Natural Antibodies. In *Encyclopedia of Life Sciences*, <http://www.els.net>, London: *Nature Publishing Group*. Vol. 12. Macmillan Reference Ltd, London, pp. 638-643

- 5- **B. Guilbert, G. Dighiero and S. Avrameas** (1981). Naturally occurring antibodies against 28 nine common antigens in normal humans. I: Detection, isolation and characterization. *J. Immunol.*, **128**, 2779-2787.
- 6- **E. Lafer, J. Rauch, C. Andrzejewski, D. Mudd, B. Furie, R.Schwartz and B. Stollar** (1981). Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. *J. Exp. Med.*, **153**, 897-909.
- 7- **G. Dighiero, B. Guilbert, J. Fermant, P. Lymberi, F. Danon and S. Avrameas** (1983). Thirty-six human monoclonal immunoglobulins with antibody activity against cytoskeleton proteins, thyroglobulin and native DNA: immunologic studies and clinical correlations. *Blood*, **62**, 264-270.
- 8- **J. P.Bouvet and G. Dighiero** (1998). From natural polyreactive autoantibodies to a la carte monoreactive antibodies to infectious agents: is it a small world after all ? *Infect. Immun.*, **66**, 1-4.
- 9- **L. Diaw, C. Magnac, O. Pritsch, M. Buckle, P. M. Alzari and G. Dighiero** (1997) . Structural and affinity studies of IgM polyreactive natural autoantibodies. *J. Immunol.*, **158**, 968-976.
- 10- **R. Baccala, T. V. Quang, M. Gilbert, T. Ternynck and S. Avrameas** (1989). Two murine natural polyreactive autoantibodies are encoded by nonmutated germ-line genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 4624-4628.
- 11- **L. C.James, P. Roversi and D. S. Tawfik** (2003). Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science*, **299**, 1362-1367.
- 12- **M. Nakamura, S. E.Burastero, Y. Ueki, J. W. Larrick, A. L. Notkins and P. Casali** (1988). Probing the normal and autoimmune B cell repertoire with Epstein-Barr virus. Frequency of B cells producing monoreactive high affinity autoantibodies in patients with Hashimoto's disease and systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, **141**, 4165-4172.
- 13- **N. Suzuki, T. Sakane and E. G. Engleman** (1990). Anti-DNA antibody production by CD5+ and CD5- B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.*, **85**, 238-247.
- 14- **M. Zouali, G. J. Fournie and J. Theze** (1991). Quantitative clonal analysis of the B cell repertoire in human lupus. *Cell Immunol.*, **133**, 161-177.
- 15- **M. G. McHeyzer-Williams, and G. J. Nossal** (1988). Clonal analysis of autoantibody-producing cell precursors in the preimmune B cell repertoire. *J. Immunol.* **141**, 4118-4123.
- 16- **M. Seligmann and J. C. Brouet** (1973). Antibody activity of human myeloma globulins. *Semin. Hematol.*, **10**, 163-177.
- 17- **M. Zouali, J. M. Fine and A. Eyquem** (1984). Anti-DNA autoantibody activity and idiotypic relationships of human monoclonal proteins. *Eur. J. Immunol.*, **14**, 1085-1089.
- 18- **J. C. Brouet, K. Dellagi and J. P. Clauvel** (1984). Role of monoclonal immunoglobulins in the genesis of peripheral neuropathies. *Presse Med.*, **13**, 1763-1765.
- 19- **M. Zouali, P. Druilhe, M. Gentilini and A. Eyquem** (1982). High titres of anti-T antibodies and other haemagglutinins in human malaria. *Clin. Exp. Immunol.*, **50**, 83-91.
- 20- **F. Emmrich , B.Schilling and K. Eichmann** (1985). Human immune response to group A streptococcal carbohydrate (A-CHO). I. Quantitative and qualitative analysis of the A-CHO-specific B cell population responding in vitro to polyclonal and specific activation. *J. Exp. Med.*, **161**, 547-562.
- 21- **M. Zouali** (1992). Development of human antibody variable genes in systemic autoimmunity. *Immunol. Rev.*, **128**, 73-99.
- 22- **M. Zouali** (1994). Human auto antibodies and their genes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **47**, 135-141.
- 23- **C. Demaison, P. Chastagner, J. Theze and M. Zouali** (1994). Somatic diversification in the heavy chain variable region genes expressed by human autoantibodies bearing a lupus-associated nephritogenic anti-DNA idiotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**, 514-518.
- 24- **M. ZRadic and M. Weigert** (1994). Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 487-520.
- 25- **M. Zouali** (1994) .Unravelling antibody genes. *Nature Genet*, **7**, 118-120.
- 26- **J. P. Bouvet and V. A. Fischetti** (1999) .Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infect. Immun.*, **67**, 2687-2691.
- 27- **S. A. Bobrovnik** (1990). Activation of "silent" antibodies and their interaction with antigens. *Ukr. Biokhim. Zh.*, **62**, 86-89.

- 28- **S. A. Bobrovnik** (1999). Mechanisms for increasing the activity of polyreactive immunoglobulins in vivo. *Ukr. Biokhim. Zb.*, **71**, 129-135.
- 29- **S. A. Bobrovnik** (2002). Mechanisms of interaction of polyreactive immunoglobulins and protein antigens. *Ukr. Biokhim. Zb.*, **74**, 37-44.
- 30- **J. P. Bouvet, D. Stahl, S. Rose, C. P. Quan, M. D. S. Kazatchkine and V. Kaveri** (2001). Induction of natural autoantibody activity following treatment of human immunoglobulin with dissociating agents. *J. Autoimmun.*, **16**, 163-172.
- 31- **G. Sigounas, N. Harindranath, G. Donadel and A. L. Notkins** (1994). Half-life of polyreactive antibodies. *J. Clin. Immunol.*, **14**, 134-140.
- 32- **Z. Wang, Z. J. Chen, J. Wheeler, S. Shen and A. L. Notkins** (2001). Characterization of murine polyreactive antigen-binding B cells: presentation of antigens to T cells. *Eur. J. Immunol.*, **31**, 1106-1114.
- 33- **T. Ternynck and S. Avrameas** (1986). Murine natural monoclonal autoantibodies: a study of their polyspecificities and their affinities. *Immunol. Rev.*, **94**, 99-112.
- 34- **P. Casali and A. L. Notkins** (1989). CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol. Today*, **10**, 364-368.
- 35- **M. Zouali** (2005). *Molecular Autoimmunity*. Springer Science + Business Media, Inc., New York, USA, in press
- 36- **S. K. Datta** (1989). A search for the underlying mechanisms of systemic autoimmune disease in the NZB x SWR model. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **51**, 141-156.
- 37- **D. M. D'Andrea, B. Coupaye-Gerard, T. R. Kleyman, M. H. Foster and M. P. Madaio** (1996). Lupus autoantibodies interact directly with distinct glomerular and vascular cell surface antigens. *Kidney Int.*, **49**, 1214-1221.
- 38- **M. Zouali and B. Diamond** (1990). Idiotype-mediated intervention in systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.*, **3**, 381-388.
- 39- **S. N. Liossis and M. Zouali** (2004). B lymphocyte selection and survival in systemic lupus. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **133**, 72-83.
- 40- **M. Viau and M. Zouali** (2005). B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity. *Clin. Immunol.*, **114**, 17-26.
- 41- **B. Haggqvist and P. Hultman** (2003). Effects of deviating the Th2-response in murine mercury-induced autoimmunity towards a Th1-response. *Clin. Exp. Immunol.*, **134**, 202-209.
- 42- **A. M. Fahrner, J. F. Bazan, P. Papathanasiou, K. A. C. Nelms and C. Goodnow** (2001). A genomic view of immunology. *Nature*, **409**, 836-838.
- 43- **R. Glynne, G. Ghandour, J. Rayner, D. H. Mack and C. C. Goodnow** (2000). B-lymphocyte quiescence, tolerance and activation as viewed by global gene expression profiling on microarrays. *Immunol. Rev.*, **176**, 216-246.
- 44- **G. C. Tsokos and S. N. Liossis** (1999). Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol. Today*, **20**, 119-124.
- 45- **P. Hasler and M. Zouali** (2001). B cell receptor signaling and autoimmunity. *FASEB. J.*, **15**, 2085-2098.
- 46- **S. Huck, R. Le Corre, P. Youinou and M. Zouali** (2001). Expression of B cell receptor-associated signaling molecules in human lupus. *Autoimmunity*, **33**, 213-224.
- 47- **M., Zouali and G. Sarmay** (2004). B lymphocyte signaling pathways in systemic autoimmunity: implications for pathogenesis and treatment. *Arthritis Rheum.*, **50**, 2730-2741.
- 48- **M. Zouali** (2005). Taming Lupus. *Scientific American*, 70-78.

LE DESEQUILIBRE DE LIAISON DANS LE GENOME HUMAIN ET SON EXPLOITATION

N. KHARRAT¹, M. REBAÏ¹ ET A. REBAÏ^{1*}

¹ Unité de Bio-informatique, Centre de Biotechnologie de Sfax ; B.P. K', 3038 Sfax, Tunisie

* Auteur correspondant

E-mail : rebaia@irisit.rnrt.tn

RESUME

Cette revue donne un aperçu sur la notion de déséquilibre de liaison (DL), ses mesures et ses différentes utilisations dans le domaine de la génétique humaine. Dans une première partie, on présente la définition du DL, ses différentes mesures ainsi que les principaux logiciels qui permettent de les calculer. On s'intéresse ensuite à décrire et à discuter les mécanismes biologiques et démographiques qui créent, façonnent, maintiennent ou détruisent le DL dans les populations humaines. On soulève alors la question de l'étendue, de la structure et de la distribution du DL dans le génome humain et par conséquent la notion de blocs de DL. Nous décrivons les techniques qui permettent de mettre en évidence les blocs de DL et montrons que l'absence d'un consensus au niveau des méthodes se répercute sur les utilisations pratiques des études du DL. Le choix, en particulier, des SNP-étiquette (TagSNP) dont l'identification constitue le principal objectif des études de DL, est souvent très différent selon la technique utilisée. On discute enfin le rôle déterminant que joue la connaissance du DL dans le succès des études d'associations visant à identifier des polymorphismes impliqués dans des maladies complexes.

Mots clés : Déséquilibre de liaison, SNP, haplotype, génome humain, blocs de DL, études d'association, ACE

SUMMARY

This present review gives an overview on Linkage disequilibrium (LD), its measures and its different utilizations in human genetics studies. In the first part, we provide a detailed and a simplified presentation focusing on the definition of LD, its measures and the major software for its evaluation. Thereafter, we describe and discuss the biological and evolutionary mechanisms which create, remodel, maintain or destroy LD in human population. Consensus has now emerged on the pattern of LD in the genome which has a block-like organization with block of high disequilibrium interrupted by recombination hotspots. However, no standard method exists for the determination of such blocks and, more importantly, for the identification of TagSNP. This would yield inconsistencies between different studies of the same genes, compromising the practical use of TagSNP in association studies. The ACE gene is used to illustrate this. Will it be possible to identify consensus TagSNP that could be used consistently in all populations for testing association of candidate genes in common diseases? What is the part of myth and reality in what is called "individualized medicine"? We conclude that further LD studies are needed to get clear insights into this matter.

Key words: Linkage disequilibrium (LD), SNP, haplotype, human genome, LD blocks, association study, ACE

INTRODUCTION

L'utilisation des analyses de liaison pour l'identification des gènes impliqués dans les maladies multifactorielles a montré ses limites et a amené de nombreux chercheurs à se tourner vers les analyses d'association qui se basent sur le déséquilibre de liaison. Le déséquilibre de liaison (DL) peut être défini comme l'association non aléatoire entre les allèles au niveau de deux loci liés¹.

Il se réfère à deux notions différentes : la liaison et le déséquilibre. La liaison signifie que deux gènes sont voisins physiquement sur le chromosome et leur co-transmission est mesurée par le taux de recombinaison entre eux. La notion de déséquilibre se réfère quant à elle à un écart entre la fréquence observée d'un 'haplotype' au niveau des deux gènes et la fréquence attendue de cet haplotype, en cas d'indépendance entre les loci.

Le déséquilibre a plutôt un sens statistique et ne fait aucune allusion à la position physique des gènes.

Le déséquilibre de liaison est de ce fait une notion hybride qui implique la présence d'un déséquilibre entraîné par une liaison étroite entre les gènes. Il peut apparaître et disparaître, être faible ou fort, selon les caractéristiques de la population et de la région du génome considérée, alors que la liaison est soit présente, soit absente.

Beaucoup d'espoirs sont aujourd'hui mis sur l'exploitation du DL en médecine. La communauté scientifique s'attend à ce que la détermination de la structure du DL dans le génome et, particulièrement, dans les régions codantes ou régulatrices des gènes apporte toute la lumière sur les causes des maladies communes à prédisposition génétique comme le diabète, l'hypertension ou le cancer.

Ensuite, disposer d'une carte de DL aidera à définir des variants pour lesquels l'haplotype d'un individu serait une véritable signature et renseignera sur sa susceptibilité aux maladies ou sa réponse aux différents traitements médicamenteux disponibles.

Après une présentation détaillée mais simplifiée du déséquilibre de liaison, de ses mesures et des mécanismes qui le façonnent, nous discutons dans cette revue les applications attendues de l'étude de la structure du DL dans le génome humain.

LE DESQUILIBRE DE LIASON

DEFINITION ET MESURES

QU'EST CE QUE LE DL ?

Pour introduire la notion de DL, considérons deux loci A et B ayant deux allèles chacun (1 et 2) dont les fréquences sont, respectivement, p_1 , $(1-p_1)$ et q_1 , $(1-q_1)$. Considérons une population dans laquelle les fréquences des 4 haplotypes 1-1, 1-2, 2-1 et 2-2 sont, respectivement, P_{11} , P_{12} , P_{21} et P_{22} . En cas d'équilibre (ségrégation indépendante entre les deux loci), on aura $P_{11} = p_1q_1$, $P_{12} = p_1(1-q_1)$, $P_{21} = (1-p_1)q_1$ et $P_{22} = (1-p_1)(1-q_1)$, comme présenté dans le tableau I.

Tableau I. Fréquences alléliques et haplotypiques de deux loci bialléliques dans le cas d'indépendance (en gras) et de déséquilibre de liaison (en italique)*

		Allèles du locus A	
		1	2
Allèles locus B	1	p_1	$1-p_1$
	q_1	$P_{11} = p_1q_1$	$P_{21} = (1-p_1)q_1$
	2	$P_{12} = p_1(1-q_1)$	$P_{22} = p_1(1-q_1) - D$
	$1-q_1$	$P_{22} = (1-p_1)(1-q_1)$	$P_{22} = (1-p_1)(1-q_1) + D$

Somme des 4 cases du tableau doit être égale à 1.

En respectant le fait que $P_{11} + P_{12} = p_1$ et $P_{11} + P_{21} = q_1$, le déséquilibre peut donc être exprimé en fonction d'un seul paramètre D qui traduit l'écart par rapport à l'état d'équilibre (Tableau I)².

Le paramètre D peut donc être défini par $D = P_{11} - p_1q_1$. Il peut aussi être calculé directement à partir des fréquences des 4 haplotypes par $D = P_{11}P_{22} - P_{12}P_{21}$. Il correspond dans ce cas à un coefficient de corrélation de contingence du tableau I. D a donc un sens intuitif puisqu'il est clair que $D=0$ correspond à un état d'équilibre et plus D s'éloigne, dans un sens ou dans l'autre, de la valeur 0 plus le DL est fort. Cependant, il a été montré que D varie entre deux valeurs limites qui dépendent des fréquences alléliques²:

D min. = la plus grande d'entre $-p_1q_1$ et $-(1-p_1)(1-q_1)$

D max. = la plus petite d'entre $p_1(1-q_1)$ et $(1-p_1)q_1$

Pour tester la présence d'un DL entre deux loci, c'est à dire tester l'hypothèse «D=0», on peut utiliser le fait que la quantité $N \cdot D^2 / [p_1(1-p_1)q_1(1-q_1)]$ suit une loi *Chi-2* à un degré de liberté comme test (N corres-

pond ici au nombre de chromosomes étudiés, soit deux fois le nombre d'individus si l'on travaille avec des loci autosomiques). Cette quantité est en fait le test *Chi-2* calculé sur le tableau I qui est un tableau de contingence 2x2. Avec le tableau I, on peut également utiliser le test *Exact de Fisher* dans le cas où la fréquence de certains haplotypes est faible.

Ce test permet de calculer aussi la taille de l'échantillon nécessaire pour atteindre une puissance souhaitée, étant donné la fréquence des allèles³.

COMMENT MESURER LE DL ?

Il existe plusieurs mesures du DL actuellement utilisées. L'une des premières mesures proposées consiste à standardiser la mesure D pour la rendre moins sensible aux fréquences alléliques. Ainsi, la mesure D' a été définie par² :

$D' = D/D \max.$ si $D > 0$ et $D' = D/D \min.$ si $D < 0$. Il a été montré que D' (en valeur absolue) varie entre 0 et une valeur proche de 1⁴.

Une autre mesure est aujourd'hui préférée par la plupart des chercheurs; il s'agit du coefficient de corrélation entre loci, calculé par $r = D/\sqrt{p_1(1-p_1)q_1(1-q_1)}$. Souvent, c'est le r^2 qui est utilisé comme mesure. Cette mesure a plusieurs avantages :

- la quantité Nr^2 donne directement le test du DL signalé plus haut (qui est le test de *Chi-2* d'indépendance dans le tableau 2x2 des allèles)
- sous un modèle d'évolution, neutralise la valeur du r^2 à l'équilibre qui est $1/(4Nc+1)$ où c est le taux de recombinaison par nucléotide (de l'ordre de 10^{-4} dans le génome humain).
- la taille de l'échantillon nécessaire pour détecter du DL est inversement proportionnelle à r^2 (d'après la relation précédente).
- elle permet d'avoir de manière simple un test d'homogénéité du DL entre plusieurs populations³.
- Typiquement, les valeurs de r^2 sont supérieures à celles de D' .

Des valeurs de D' supérieures à 0.33 et/ou de $r^2 > 0.1$ sont généralement considérées comme indicatives d'un DL utile⁵. Des seuils plus astringents ($D' > 0.7$) ont été proposés par d'autres auteurs⁶.

Une autre mesure courante, utilisée pour évaluer le DL entre un locus marqueur et un locus morbide, est $\delta = D/q_1P_{22}$ où q_1 est la fréquence de l'allèle muté et P_{22} est celle de l'haplotype normal pour le marqueur et le gène⁷.

D et r dépendent des fréquences beaucoup plus que de D' et δ . Cependant, δ peut aussi devenir fortement dépendant des fréquences si plusieurs mutations sont apparues dans le gène et sont chacune en association avec un haplotype différent⁸.

Mais, que se passe-t-il si on utilise des marqueurs ayant plusieurs allèles?

Prenons deux loci ayant, respectivement, n_1 et n_2 allèles. On peut alors calculer autant de paramètres de DL que de combinaisons d'allèles : $D_{ij} = P_{ij} - p_i q_j$, où P_{ij} désigne la fréquence de l'haplotype ij et, p_i et q_j les fréquences des allèles i et j au niveau des deux loci. On peut ainsi avoir un test par combinaison d'allèles de sorte à identifier les plus intéressants au niveau du DL ; mais, on peut aussi avoir une mesure globale du DL entre les deux loci. Cette mesure, définie par Hedrick⁹, est la somme pondérée des coefficients D_{ij} : $D' = \sum p_i q_j |D'_{ij}|$.

Le test global correspond au test *Chi-2* dans le tableau de contingence de n_1 lignes et n_2 colonnes. Avant d'utiliser ce test, il faut vérifier que les conditions de sa validité soient satisfaites et en particulier que les effectifs attendus dans les cases du tableau de contingence soient plus grands que 5. Si le nombre d'allèles est grand (> 4) et l'effectif est faible (< 100), il est recommandé de fusionner certains allèles (colonnes ou lignes) rares dans la même classe. Certains programmes permettent de le faire facilement. On peut aussi utiliser un test exact de permutation¹⁰.

Peut-on avoir une mesure du DL entre plus de deux loci ?

Weir (1996)³ donne les expressions des coefficients de DL entre trois et quatre loci définis par Bennet (1954)¹¹ ainsi que les tests correspondants. Gorelick et Lobichler (2004)¹² fournissent une expression générale des coefficients de DL pour plusieurs loci, en généralisant l'approche de Geiringer (1944)¹³.

Ces mesures sont peu utilisées car difficiles à interpréter ; mais, elles peuvent parfois être intéressantes. En effet, des études 14 ont montré que le DL entre trois loci peut être très fort dans certaines régions du génome. Dans ce cas, il reflète mieux la structure du DL et son calcul sera plus intéressant que le DL entre deux loci.

Comment obtenir la fréquence des haplotypes ?

Il est clair, d'après la définition du DL, que le calcul de celui-ci n'est possible qu'après détermination de la fréquence des haplotypes. Les haplotypes peuvent dans de très rares cas être obtenus de manière expérimentale¹⁵. Le plus souvent, leurs fréquences sont estimées dans la population à partir des données génotypiques par l'utilisation de méthodes statistiques. Ces méthodes se basent, pour la plupart d'entre elles, sur le principe du maximum de vraisemblance^{16,17}. Ces méthodes font l'hypothèse des croisements au hasard ou de l'équilibre Hardy-Weinberg. Ceci constitue leur principal défaut et peut dans certains cas compromettre le test du DL, notamment quand l'haplotype des individus double- hétérozygotes ne peut pas être déterminé avec précision¹⁸. Parfois, on peut utiliser la parenté (parents, frères-sœurs, enfants) des individus de l'échantillon étudié pour mieux estimer les haplotypes de ceux-ci en employant des méthodes de construction d'haplotypes à partir de données familiales qui sont beaucoup plus précises que les méthodes d'estimation sur les données de population^{19,20}.

Si on ne peut pas avoir la fréquence des haplotypes, peut-on mesurer le DL ?

Pour contourner le délicat problème de l'inférence des haplotypes, Weir et Cockerham (1989)³ ont défini ce qu'on appelle le coefficient de DL composite (noté Δ) qui peut être calculé directement à partir des fréquences génotypiques et alléliques:

$$\Delta = D_{11} + D_{1/1} - (P_{11} + P_{1/1}) - 2p_1q_1$$

Tableau II. Liste des principaux logiciels utilisés pour l'inférence des haplotypes et le calcul du DL entre marqueurs

Logiciel	Calcul effectué	Type de données	Caractéristiques	Réf.
GDA	DL composite calcul de Δ et r ²	Génotypes Population	Pas besoin de déterminer les haplotypes, plusieurs allèles	[3]
Arlequin	Haplotypes, calcul de D et D', Test exact du DL	Génotypes, haplotypes Population	Estimation des haplotypes selon la méthode du maximum de vraisemblance	[16] [22]
GOLD	Calcul de D, D'et r ² , Représentation graphique du DL	Haplotypes	Adéquat pour marqueurs très proches (SNP)	[23]
HapBlock'	Détermination des blocs de DL et TagSNP	Génotypes population, familles	SNP uniquement	[24]
HaploBlock	Haplotypes, blocs de DL	Génotypes population	SNP uniquement	[25]
Haplotyper'	Haplotypes	Génotypes population	Méthode Bayésienne, logiciel breveté	[26]
PHASE	Haplotypes, taux de recombinaison	Génotypes population	Méthode bayésienne, tout type de marqueurs[17],[27]	
PL-EM'	Haplotypes	Génotypes population	Méthodes du maximum de vraisemblance, SNP	[28]

' Ces programmes fonctionnent uniquement sur système Unix/Linux

où $D_{11} = P_{11} - p_1q_1$ est le coefficient de DL gamétique (noté D plus haut) et $D_{1/1} = P_{1/1} - p_1q_1$ le coefficient de déséquilibre génotypique. Il faut bien remarquer que ni P_{11} ni $P_{1/1}$ ne peuvent être calculés séparément alors que leur somme s'obtient directement à partir des fréquences génotypiques³. Comme pour le coefficient D , Δ peut être standardisé en un coefficient de corrélation³. Hamilton et Cole (2004)²¹ ont montré que Δ est compris entre deux valeurs et ont proposé une mesure standardisée Δ' définie de la même façon que D' avec:

$$\Delta_{min} = \text{la plus petite d'entre } (-2p_1q_1 \text{ et } -2(1-p_1)(1-q_1))$$

$$\Delta_{max} = \text{la plus petite d'entre } (2p_1q_1 \text{ et } 2(1-p_1)(1-q_1))$$

Schaid (2004)¹⁸ a montré que le coefficient composite Δ était plus précis que D quand les haplotypes ne peuvent pas être déterminés avec exactitude, notamment pour les doubles hétérozygotes. Dans ce cas, il a montré que le test de DL, basé sur le coefficient D, peut donner des résultats erronés. Il propose aussi une généralisation du coefficient Δ dans le cas de loci avec plusieurs allèles et fournit un test général du DL composite.

PRATIQUEMENT, COMMENT CALCULER LES MESURES DE DL ?

Le tableau II présente les principaux logiciels qui permettent le calcul des différents coefficients de DL avec ou sans estimation des haplotypes. Certains de ces programmes permettent le calcul des blocs de DL ou les tagSNP (voir plus loin). Les liens aux pages web de ces programmes d'où on peut les télécharger sont disponibles dans la page :

<http://linkage.rockefeller.edu/soft/>.

ORIGINE ET ETENDUE DU DESEQUILIBRE DE LIAISON QU'EST CE QUI CRÉE ET FAIT DISPARAÎTRE LE DL ?

Le DL est généralement créé dans une population suite à un événement mutationnel qui se transmet en bloc avec d'autres loci voisins. Il peut également être la conséquence d'un mélange (Admixture) de deux populations ayant des haplotypes de fréquences différentes²⁹. Cependant, ce type de DL peut même apparaître initialement entre des loci non liés et ne concerne que des populations particulières²⁹.

Une fois créé, le DL sera remodelé par plusieurs mécanismes qui vont contribuer à le faire disparaître ou le maintenir.

La recombinaison est le principal mécanisme qui va progressivement «éroder» le DL. En effet, si à la génération g la fréquence de l'haplotype 1-1 dans la population est P_{11}^g , alors sa fréquence à la génération $(g+1)$ sera $P_{11}^{g+1} = (1-\theta)P_{11}^g + \theta p_1 q_1$ où θ est le taux de recombinaison entre les deux loci. En supposant que les fréquences des allèles restent constantes au fil des générations, on aura donc $D^{g+1} = P_{11}^{g+1} - p_1 q_1 = (1-\theta)D^g$ et par conséquent $D^g = (1-\theta)^g D_0$ où D_0 est le DL initial dans la population. Ainsi, plus la distance entre les loci est faible plus longtemps le DL sera maintenu. Par exemple, pour une distance de 5 cM (centiMorgan) entre loci, le DL initial sera divisé par 2 au bout de 13 générations et par 10 après 45 générations. Il sera presque nul (divisé par 100) au bout de 90 générations. Alors que pour une distance de 20 cM, le DL est divisé par 10 au bout de 10 générations et par 100 au bout de 30 générations. A ce niveau, nous introduisons la notion de la demi-vie d'un DL initial comme le nombre de générations g au bout duquel il est divisé par 2 ($D^g/D_0=0.5$). La figure 1 représente la durée de demi-vie du DL pour différentes valeurs de θ . On remarque que pour des distances de plus de 5 cM, le DL ne sera pas maintenu à un niveau intéressant plus d'une dizaine de générations.

Parmi les autres mécanismes qui peuvent contribuer à faire disparaître le DL entre des loci très proches, la conversion génique semble jouer un rôle important^{30,31}. Il y a aussi des phénomènes démographiques naturels ou accidentels qui peuvent avoir des effets de grande envergure et sont difficile à évaluer,

comme les guerres (dont les génocides ethniques), les catastrophes naturelles ou les grandes épidémies.

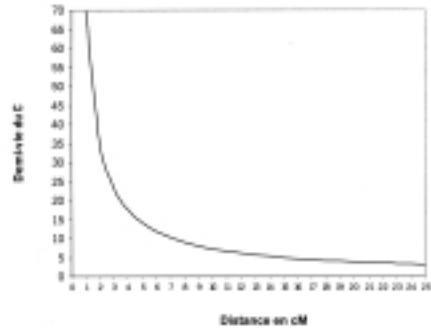


Figure 1. Demi-vie d'un déséquilibre de liaison initial D_0 entre deux loci en fonction de la distance génétique en cM (selon fonction de Haldane) qui les sépare et en supposant que la recombinaison est le seul phénomène en jeu.

La sélection naturelle va généralement participer au maintien du DL et contrecarrer l'effet de la recombinaison par le maintien dans la population de certains haplotypes favorables^{19,32}. C'est le cas de la région du CMH qui est soumise à une forte pression de sélection. Les autres mécanismes comme l'épistasie ou le 'balayage' sélectif (une mutation rare favorable est rapidement fixée) joueraient un rôle mineur dans la détermination de l'étendue du DL³¹.

Des phénomènes plus rares peuvent également contribuer à maintenir le DL. Parmi ceux-la on peut citer les inversions de fragments chromosomiques de 50 kb à 3 Mb qui peuvent réduire ou carrément supprimer la possibilité de recombinaison dans certaines régions du génome et de ce fait augmenter le DL dans ces régions^{33,34}.

ETENDUE DU DL DANS LE GÉNOME

En 1999, Kruglyak(1999)⁵ a prédit que le DL s'étendait au plus sur des longueurs de 3 kb dans la plupart des populations et qu'il faudrait plus de 500.000 SNP (1 SNP tous les 6 kb) pour couvrir le génome lors d'une étude de balayage du génome entier. Ultérieurement, plusieurs études examinant l'étendue du DL dans certaines régions du génome ont contredit cette affirmation un peu trop rapide. Dans une des premières études, Huttley et al. (1999)³² ont mis en évidence 8 régions de fort DL dans le génome et où le DL s'étendait sur des distances supérieures à 5 cM. Dans une analyse considérant plusieurs régions du génome, Reich et al. (2001)³⁵ ont montré que l'étendue du DL

était en moyenne de 60 kb dans la population européenne et de 6 kb chez le Yoruban (population du Nigeria). Gabriel *et al.* (2002)³⁶ ont étudié, quant à eux, 51 régions du génome couvrant 13 Mb. Ils ont retrouvé une structure en blocs dont la taille moyenne est près de deux fois plus grande dans la population européenne que chez les africains (18 kb contre 9 kb, respectivement) avec, toutefois, de grandes variations (de moins de 1 kb à plus de 100 kb). Les frontières de blocs ainsi que les haplotypes spécifiques de ces blocs sont bien corrélés entre populations. A l'intérieur de chaque bloc, 3 à 5 haplotypes représentent 90% de tous les haplotypes.

RELATION ENTRE DL ET DISTANCE PHYSIQUE

Même si globalement le DL décroît avec la distance physique, la relation entre ces deux quantités est loin d'être évidente car elle dépend des caractéristiques démographiques de la population^{19,50}. Parmi les facteurs en cause figurent la consanguinité, le mélange de populations et les goulots d'étranglement démographiques.

La consanguinité peut diminuer la diversité et augmenter le DL. Cependant, ce phénomène a probablement un effet mineur sur le DL vu que les taux de consanguinité dans les populations humaines restent souvent faibles comparativement à des populations (e.g. plantes) où un régime de reproduction autogame peut créer et maintenir un niveau de DL très élevé dans le génome.

Le mélange de populations (Admixture) peut à son début générer un très fort DL qui peut alors s'étendre sur plusieurs centiMorgan³⁷. Un faible flux de gènes d'une population divergente (ayant fixée différents allèles) vers une population homogène, introduit de nouveaux haplotypes et fait augmenter le DL.

L'étendue du DL peut aussi augmenter suite à une réduction temporaire de la taille (goulots d'étranglement) de la population ou une fondation d'une nouvelle population (comme celle de la Finlande ou de la Sardaigne) par un faible nombre d'immigrants. Ce phénomène est souvent évoqué³⁵ pour expliquer la différence entre les niveaux de DL retrouvés dans les populations africaines (populations anciennes en expansion) et les populations européennes (qui auraient connu un goulot d'étranglement pendant la dernière ère glaciaire, il y a 25.000 ans)³⁸. Cependant, aucun des

modèles démographiques proposés ne semble apporter une explication satisfaisante des niveaux de DL observés dans différentes populations. De plus, les études des niveaux de DL dans une population sont dépendantes du choix de marqueurs SNP (souvent des SNP ayant deux allèles de fréquences élevées) et ces choix ne permettent pas de retrouver des différences au niveau de l'histoire démographique puisque ces SNP sont plus anciens et sont moins sensibles aux événements démographiques récents⁵.

On a longtemps cru que le DL était beaucoup plus important dans les populations plus isolées que dans les autres. Cependant, de nombreuses études ont montré que ceci n'est vrai que pour les DL qui s'étendent sur de longues distances (>200 kb)³⁹. L'intérêt de ce type de populations dans l'identification des gènes de maladies ne s'estompe pas, et ce à cause de leur grande homogénéité.

STRUCTURE DU DL DANS LE GÉNOME : LES BLOCS DE DL

Des dizaines d'études du DL dans des régions ou gènes d'intérêt ont montré que la structure de celui-ci se présente toujours sous forme de blocs de DL dont la taille varie de 5 à 50 kb, interrompus par des zones chaudes (*hotspot*) de recombinaison de l'ordre de 1 à 2 kb de taille 40. Daly *et al.* (2001) 41 furent les premiers à proposer un tel modèle. En effet, en étudiant une région de 500 kb sur le chromosome 5q31, ils ont montré que celle-ci pouvait être divisée en 11 blocs de fort DL. Ces blocs n'ont montré aucune évidence de recombinaison et sont caractérisés par une diversité haplotypique très faible. Peu après Jeffreys *et al.* (2001)⁴² retrouvèrent la même structure du DL dans une région de 216 kb du système HLA classe II.

Aujourd'hui, la structure en blocs de DL n'est plus contestée. Certains parlent d'îlots de DL et d'autres de jungles ou de déserts de recombinaison. Les blocs de DL ont une taille qui dépend des facteurs mentionnés plus haut. Dans ces blocs, le DL peut soit être maintenu au même niveau, soit décroître avec la distance. Récemment, McVean *et al.* (2004)⁴³ ont montré que 50% des événements de recombinaison prennent place dans moins de 10% de la séquence, que la présence de *hotspot* de recombinaison est une caractéristique générale du génome humain et que ces *hotspot* sont situés tous les 200 kb en moyenne, préférentiellement en dehors des gènes.

COMMENT IDENTIFIER CONCRÈTEMENT UN BLOC DE DL ?

Trois classes de méthodes d'identification des blocs de DL ont été proposées :

Méthode basée sur les hotspots

de recombinaison : un bloc est défini comme une région du génome qui n'est pas interrompue par un hotspot de recombinaison, ces hotspots pouvant être déterminés expérimentalement⁴² ou à défaut prédits par des méthodes *in silico*⁴³. Cette approche a le grand avantage de correspondre à une définition biologique fonctionnelle des blocs de DL.

Méthode basée sur la mesure du DL : un bloc est défini comme un ensemble de marqueurs SNP entre lesquels le DL dépasse un certain seuil arbitraire en imposant éventuellement des contraintes sur le nombre et la distance entre marqueurs³⁵. Le principal défaut de ces méthodes est que les coefficients de DL entre marqueurs proches ne sont pas indépendants et leurs valeurs ne reflètent pas forcément l'histoire évolutive des haplotypes.

Méthode basée sur les haplotypes : un bloc est défini comme un ensemble de SNP où 3 à 5 haplotypes représentent de 75 à 90% de l'ensemble des haplotypes observés dans la population. Les haplotypes et leurs fréquences peuvent être déterminés expérimentalement⁴⁵ ou estimés par des méthodes statistiques à partir des données génotypiques (Tableau II). Les seuils de 75 à 90% sont subjectifs et la comparaison des blocs ainsi définis entre populations et même entre différents échantillons d'une même population, est particulièrement difficile. De plus, des différences dans l'histoire des populations entre le niveau moyen de DL ou les fréquences alléliques, rendent difficile l'association de cette définition opérationnelle des blocs à un processus biologique sous-jacent.

EXPLOITATION DU DL LES TAGSNP : POURQUOI FAIRE ET COMMENT LES CHOISIR?

On appelle tagging SNP (tSNP) un SNP qui est choisi sur la base de son DL pour représenter d'autres SNP voisins^{45,44}. Les tSNP sont particulièrement utiles pour les études d'associations des gènes candidats où ils doivent permettre de représenter toute la variation du gène et de tester tous les variants fonctionnels (muta-

tions, SNP non-synonymes) par DL avec ceux-ci. On utilise aussi le terme d'haplotype tagging SNP (htSNP) pour parler des SNP qui représentent les haplotypes majeurs d'un gène ou d'une région du génome ayant une diversité limitée. On cherche en priorité à inclure dans les htSNP des SNP fonctionnels.

Il faut signaler que la présence de blocs de DL n'est pas une condition nécessaire pour définir et utiliser des tSNP. En effet, Zhang et *al.* (2002)⁴⁵ ont montré que même dans le cas où la recombinaison est uniformément distribuée, typer le quart des SNP présents dans une région entraîne une perte négligeable de puissance pour les tests d'associations. Cependant, le gain en terme d'économie de typage dépend de la force avec laquelle la recombinaison est confinée à des hotspots ainsi que de l'histoire démographique de la population étudiée.

Plusieurs méthodes statistiques ont été proposées pour identifier, parmi un ensemble de SNP typés, les tSNP les plus représentatifs du gène. Certaines se basent directement sur les mesures de DL alors que d'autres utilisent directement les haplotypes⁴⁶. Le choix des tSNP est effectué par certains programmes simultanément avec la détermination des blocs de DL (Tableau D). Le problème majeur est que ces méthodes aboutissent souvent à des choix différents des tSNP avec les mêmes données (cf exemple du gène ACE plus loin).

Selon les régions génomiques et les populations, le nombre de tSNP varie en moyenne de 2 à 20 tous les 100 kb. Sur la base des résultats de l'analyse des régions étudiées par Gabriel et *al.* (2002)³⁶, Goldstein et *al.* (2003)⁴⁷ estiment qu'il faudrait 150.000 tSNP pour couvrir l'ensemble du génome pour la population européenne (300.000 pour les populations africaines).

LES ÉTUDES D'ASSOCIATIONS

Les études cas-témoin

L'idée de rechercher une association dans une population donnée entre le polymorphisme au niveau d'un gène (ou marqueur) et une maladie est très simple. Il suffit pour ce faire de prendre un échantillon de malades et un échantillon d'individus sains (qui sont les témoins) appariés sur quelques données épidémiologique (age, sexe, exposition, région, etc.). Les individus malades et témoins ne doivent pas avoir de lien de parenté. On type les SNP et on compare

ensuite les fréquences des allèles dans ces deux échantillons; plus l'écart entre les deux fréquences est grand plus l'association est forte. Ce type de données peut se représenter sous forme d'une table de contingence 2x2, comme suit :

Allèle considéré	Etat de L'individu	
	Malade	Sain
Présent	a	b
Absent	c	d

Le calcul du test Chi-2 par $T=N(ad-bc)^2/(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)$ (où $N=a+b+c+d$) et de la p-valeur correspondante, permet de mesurer l'évidence de l'association. Les épidémiologistes ont coutume de mesurer l'évidence de l'association non pas par la p-valeur mais par le risque relatif ou par le rapport des côtes (Odds Ratio noté OR) qui se calcule simplement par $OR=ad/bc$. Le OR est une mesure approximative du risque relatif car celui-ci ne peut pas être calculé avec de telles données ; c'est-à-dire, quand les individus malades ne sont pas choisis au hasard dans la population des malades mais pris parmi les patients qui consultent, ce qui est d'usage courant dans les études cas-témoins.

Le problème majeur de ce test simple provient du fait qu'une stratification (les individus appartiennent à des sous-populations où les fréquences des allèles sont différentes) même faible peut donner la fausse impression d'une association. Pour remédier à cela, deux principales approches ont été proposées. La première, appelée méthode des contrôles génomiques, consiste à utiliser d'autres marqueurs en dehors des régions d'intérêts pour la maladie pour estimer un paramètre de correction du test Chi-2 d'association⁴⁸. La seconde, appelée «Association Structurée», consiste à utiliser les marqueurs en dehors des régions candidates de la maladie pour estimer la stratification (définir les sous-populations) et utilise ensuite cette information pour tester l'association avec le gène d'intérêt⁴⁹. En raison de leur lourdeur, ces deux méthodes sont très peu utilisées en pratique.

La force du DL entre le SNP au niveau duquel se fait le test d'association et le variant ou la mutation en cause dans le développement de la maladie est un facteur critique. Il est facile de montrer que si ce DL est égal à r^2 , alors pour détecter une association au

niveau du SNP avec la même puissance qu'au niveau de la mutation, la taille de l'échantillon doit être augmentée de $1/r^2$ soit multipliée par 10 pour un $r^2=0.10$. Ainsi, plus le DL entre le SNP étudié et les autres variants du gène est élevé plus grande sera la chance de détecter une association du gène avec la maladie quand elle existe réellement⁵⁰.

Les études d'association familiales : TDT et apparentés

Vers la fin des années 80, des méthodes se basant sur des données familiales ont été proposées ; elles utilisent l'information sur la transmission des allèles des parents vers leurs enfants malades. Après une période de cogitation pendant laquelle plusieurs variantes de la méthode HRR (Haplotype Relative Risk) ont été proposées^{51,52}, une méthode de référence a émergée; il s'agit du test de déséquilibre de transmission ou TDT⁵³. Ce test représente les données de transmission dans des trios père-mère-enfant malade sous forme d'un tableau de contingence pour données appariées et correspond à un test de Mc Nemar qui se calcule par $TDT=(b-c)^2/(b+c)$.

		Allèle transmis par le père	
		A	Non-A
Allèle transmis par la mère	A	a	b
	Non-A	c	d

Il faut signaler que le TDT a été d'abord présenté comme un test de liaison ; mais, il se trouve qu'en présence de liaison, il teste également l'association. En fait, on peut montrer que l'espérance mathématique de la différence $(b-c)$ est proportionnelle à $\delta(1-2\theta)$ où θ est le taux de recombinaison entre le gène de maladie et le marqueur ; d étant le déséquilibre entre l'allèle considéré du marqueur⁵². Donc, l'hypothèse testée par le TDT est $\delta(1-2\theta)=0$; c'est à dire que « $\delta=0$ ou $\theta=1/2$ » ce qui signifie « pas de liaison ou pas d'association ou aucun des deux » contre l'alternative «liaison et association». Par contre, si l'on se place dans le cas où la liaison existe $((1-2\theta)\neq 0)$, le TDT teste alors « $\delta=0$ » contre « $\delta\neq 0$ », c'est à dire l'association. Il faut signaler que le TDT est un test d'association si, et seulement si, on l'applique à des trios indépendants (ne provenant pas de familles nucléaires multiplexes ou de pedigree plus grands) mais qu'il reste toujours un test valide de liaison.

La nature non-paramétrique des tests d'associations (ou même de liaison) en général et du TDT en particulier, ne doivent pas prêter à confusion même si ces tests ne nécessitent pas le choix d'un mode d'hérédité pour leur calcul ; leur puissance (capacité à donner une bonne décision en déclarant la présence d'une association ou liaison) dépend du mode de transmission de la maladie⁵⁴. L'un des avantages du TDT, notamment dans les populations endogames, est sa robustesse à la consanguinité⁵⁵. Dans le cas où les parents des trios sont apparentés (mariage consanguin), le TDT est simplement un test de liaison. Dans ce cas, on peut avoir un gain de puissance non négligeable par rapport à des trios avec des parents non apparentés, en particulier pour les maladies à hérédité proche du mode récessif⁵⁶.

Le TDT ne pouvant pas s'appliquer en tant que test d'association à des familles nucléaires ou de pedigree avec plusieurs générations, plusieurs autres tests ont été proposés et parmi lesquels on peut citer le S-TDT⁵⁷, le FBAT⁵⁸ ou encore le PDT⁵⁹. Le FBAT fournit un moyen simple et très général pour tester l'association dans les familles nucléaires comprenant individus sains et malades et figure avec le TDT parmi les méthodes les plus utilisées.

Au fur et à mesure que la technologie SNP s'est généralisée et que le nombre de marqueurs que l'on peut typer au niveau d'un gène a augmenté, le besoin pour des méthodes qui testeraient non pas des allèles mais des haplotypes est devenu de plus en plus pressant. De nombreuses méthodes ont été proposées ces dernières années. Elles correspondent à des généralisations du TDT^{60,62} ou du FBAT⁶³. Le tableau III présente les principales méthodes d'étude d'associations alléliques ou haplotypiques. Les liens aux logiciels correspondants sont disponibles sur la page : <http://linkage.rockefeller.edu/soft/>.

ESTIMATION DE L'ÂGE D'UNE MUTATION

Parfois, il est possible de dater une mutation survenue chez un individu et qui s'est par la suite diffusée dans la population. Quand cette mutation est relativement récente (entre 10 et 100 générations), il est possible d'estimer le nombre de générations pendant lesquelles elle s'est diffusée (son âge), en étudiant le déséquilibre de liaison avec des marqueurs proches (de 1 à 10 cM) de celle-ci. Pour cela, on utilise la relation décrite plus haut en l'inversant⁶⁴ et on obtient $g = \log(\delta) / \log(1-\theta)$ où δ est le paramètre de DL décrit plus haut⁷. Pour avoir une meilleure estimation, on rajoute un terme correctif qui tient compte des paramètres démographiques de la population $g_0 = ed / (ed-1)$, où d est le taux d'expansion de la population (généralement pris entre 0.2 et 0.4 en absence d'information démographique).

Et la pharmaco-génomique.

La discipline qui s'intéresse à associer la réponse aux traitements à des différences au niveau de la séquence de certains gènes clefs est appelée pharmaco-génomique. Il s'agit en fait de trouver, suite à des études de DL, des TagSNP, de préférence fonctionnels, dont l'haplotype peut être associé à la réponse différentielle aux médicaments⁶⁶. Vu les enjeux socio-économiques, cette discipline connaît un développement très rapide et quelques succès ont déjà été rapportés⁶⁶.

AVENIR DES ETUDES DE DL

L'utilisation des haplotypes déterminés par des méthodes statistiques à partir des données génotypiques dans les études de DL et d'association, pose un réel problème. D'une part, ils donnent des estimations biaisées des mesures de DL¹⁸, ce qui compromet toutes les étapes ultérieures basées sur ces mesures et notamment la détermination de TagSNP ; mais l'utilisation de ces haplotypes dans les tests d'as-

Tableau III. Principales méthodes utilisées dans les études familiales d'association

Logiciels	Tests et utilisations	Type familles	Réf.
TDT/S-TDT	TDT et S-TDT et test combiné	Trios et familles nucléaires	[53], [56]
FBAT	Association allélique et sur haplotypes avec estimations des fréquences des haplotypes dans les familles	Pedigree, familles nucléaires,	[63]
PDT	Association allélique pour un pedigree	Pedigree	[59]
Unphased	TDT sur haplotype, TDT conditionnel	Trios, pedigree	[62]
Transmit	Test association haplotype, parents sans génotypes, phase inconnue	Familles nucléaires	[60]

sociations entraîne d'autre part une perte importante d'information (de l'ordre de 20%) par rapport à une méthode qui se baserait directement sur les données génotypiques⁶⁷. Ceci suggère que des mesures de DL composite (longtemps marginalisées) sont plus intéressantes dans les études de DL et de TagSNP. De même, des tests d'association qui utilisent les données génotypiques, ont des jours meilleurs devant eux. D'un autre côté, et puisque les tests au niveau des haplotypes (si connus et non pas estimés) restent le mieux qu'on puisse faire, il faudra continuer à développer des procédures expérimentales qui permettraient de déterminer les haplotypes de façon exacte⁶⁸.

L'intérêt croissant pour les études de DL et des haplotypes au niveau des gènes impliqués dans les maladies et la réponse aux médicaments s'est également concrétisé par la mise en place d'un grand projet international HapMap⁶⁹ avec un financement de 100 millions de dollars sur 3 ans (2003-2005). Le but du projet HapMap est de construire une carte d'haplotypes de 600,000 SNP (1 tous les 5 kb) sur quatre échantillons (270 individus au total) de 4 populations : CEPH (individus résidents aux USA et originaires d'Europe), Yoruba d'Ibadan (Nigéria), Tokyo (Japon) et Pékin (Chine). Seuls les SNP dont la fréquence de l'allèle rare est supérieure à 5%, ont été considérés. Récemment, suite à la baisse du prix du typage SNP (divisé par trente), il a été décidé d'augmenter le nombre de SNP à 2.25 millions de sorte à avoir un SNP tous les 1.5 kb⁷⁰. Les données du projet sont déjà disponibles sur le site HapMap (<http://www.hapmap.org/>). Actuellement, plus de 1 millions de SNP ont été typés sur les 4 populations.

Prenons l'exemple du gène ACE (MIM106180) codant pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine (EC 3.4.15.1), ce gène joue un rôle très important dans de nombreuses pathologies communes (notamment l'hypertension) et est la cible de plusieurs médicaments (inhibiteurs de ACE). On voit sur le site HapMap que 16 SNP au total ont été typés dans au moins une population. Six ont été typés sur toutes les populations dont deux se sont avérés non polymorphes. Pour quatre autres marqueurs (rs4305; rs4344 ; rs4461142, rs8066276), on trouve que les fréquences des allèles sont discordantes entre les populations européenne et africaine c'est-à-dire que l'allèle fré-

quent dans un échantillon est l'allèle rare dans l'autre échantillon. Les fréquences de l'allèle fréquent chez les européens sont de 0.603/0.075, 0.509/0.440, 0.525/0.929 et 0.625/0.258, respectivement, pour les 4 SNP et pour les deux échantillons. Ceci laisse penser que les profils de DL dans ce gène seront différents entre les deux populations comme cela a été observé pour d'autres gènes⁷¹. Par ailleurs, de nombreuses études ont utilisé le gène ACE comme modèle pour déterminer les tagSNP. Utilisant les mêmes données, ces études ont abouti à des choix très différents des tSNP; un seul tSNP (sur les 5 à 15 identifiés selon la méthode) a été retrouvé par quatre méthodes de manière cohérente⁶⁶.

On voit à travers cet exemple et beaucoup d'autres études publiés comment la fin du projet HapMap sera tout aussi importante que celle du projet de séquençage du génome humain, puisqu'il nous donnera accès à la variation de la séquence dans les populations humaines. Les retombées en seront énormes dans le domaine de la médecine. Mais, il faudra probablement attendre encore quelques années pour savoir la part du mythe et de la réalité dans les spéculations faites autour de la médecine personnalisée. D'ici là, les paris sont ouverts et tous les espoirs sont permis.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par le Ministère de la Recherche Scientifique, de la Technologie et du Développement des Compétences. Nous remercions les reviewers pour leurs commentaires qui ont sensiblement améliorés la qualité du manuscrit.

REFERENCES

- 1- **H.S. Jennings** (1917). The numerical results of diverse systems of breeding, with respect to two pairs of characters, linked or independent, with special relation to the effects of linkage. *Genetics*, **2**, 97-154
- 2- **R.C. Lewontin** (1964). The interaction of selection and linkage. II. Optimum models. *Genetics*, **50**, 757-82.
- 3- **B.S. Weir** (1996). Genetic Data Analysis. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- 4- **C. Zapata** (2000). The D' measure of overall gametic disequilibrium between pairs of multialle-

- lic loci. *Evolution Int. J. Or. Evolution*, **54**, 1809-12.
- 5- **L. Kruglyak** (2000). Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat. Genet.*, **22**, 139-44.
 - 6- **L. Tiret , O Poirier, V Nicaud, S Barbaux, SM Herrmann, C Perret, Raoux S, C Francomme, G Lebard, D Tregouet, F. Cambien** (2002). Association studies of common diseases. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 419-29
 - 7- **BO Bengtsson et G. Thomson** (1981). Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases. *Tissue Antigens*, **18**, 356-63.
 - 8- **SW Guo** (1997). Linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping: a comparison. *Hum. Hered.*, **47**, 301-14
 - 9- **PW Hedrick** (1987). Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. *Genetics*, **117**, 331-41.
 - 10- **D Zaykin, L Zhivotovsky et BS Weir** (1995). Exact tests for association between alleles at arbitrary numbers of loci. *Genetica*, **96**, 69-78.
 - 11- **JH. Bennett** (1954). On the theory of Random mating. *Ann. Eugen.*, **18**, 311-317.
 - 12- **R. Gorelick et MD. Laubichler** (2004). Decomposing multi-locus linkage disequilibrium. *Genetics*, **166**, 1581-1583.
 - 13- **H. Geiringer** (1944). On the probability theory for linkage in Mendelian heredity. *Ann. Math. Stat.*, **15**, 25-57.
 - 14- **Z Meng, DV Zaykin, CF Xu, M Wagner et MG. Ehm** (2003). Selection of genetic markers for association analyses, using linkage disequilibrium and haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.*, **73**, 115-130.
 - 15- **N Patil, AJ Berno, DA Hinds et al.** (2001). Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science*, **294**, 1719-1723.
 - 16- **L. Excoffier et M. Slatkin** (1995). Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid Population. *Mol. Biol. Evol.*, **12**, 921-917.
 - 17- **M Stephens NJ Smith et P. Donnelly** (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 978-989.
 - 18- **D.J. Schaid** (2004). Linkage disequilibrium testing when phase is unknown. *Genetics*, **166**, 505-512.
 - 19- **G. Abecasis, E Noguchi, A Heinzmann et al.** (2002). Extent and distribution of linkage disequilibrium in three genomic regions. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 191-197.
 - 20- **JR Long, IJ Zhao, PY Liu et al.** (2004). Patterns of linkage disequilibrium and haplotype distribution in disease candidate genes. *BMC Genet.*, **5**, 11.
 - 21- **DC. Hamilton et DE. Cole** (2004). Standardizing a composite measure of linkage disequilibrium. *Ann. Hum. Genet.*, **68**, 234-239.
 - 22- **S. Schneider, D. Roessli, et L. Excoffier** (2000). Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva. <http://lgb.unige.ch/arlequin/>
 - 23- **G Abecasis et WO Cookson** (2000). GOLD- graphical overview of linkage disequilibrium. *Bioinformatics*, **16**, 182-183.
 - 24- **K. Zhang , M Deng, T Chen, MS Waterman, F. Sun** (2002). Dynamic programming algorithm for haplotype block partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 7335-7339.
 - 25- **G Greenspan et D Geiger** (2004). High density linkage disequilibrium mapping using models of haplotype block variation. *Bioinformatics*, **20** Suppl 1,1137-1144
 - 26- **T Niu, ZS Qin, X Xu et JS. Liu** (2002). Bayesian haplotype inference for multiple linked single-nucleotide polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, **70**,157-169.
 - 27- **M Stephens et P Donnelly** (2003). A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am. J. Hum. Genet.*, **73**, 1162-1169.
 - 28- **ZS Qin , Niu T et JS. Liu** (2002). Partition-ligation-expectation-maximization algorithm for haplotype inference with single-nucleotide polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 1242-1247.
 - 29- **M Nei et Li WH** (1973). Linkage disequilibrium in subdivided populations. *Genetics*, **75**, 213-219.
 - 30- **P Andolfatto et M. Nordborg** (1998). The effect of gene conversion on intralocus associations. *Genetics*, **148**, 1397-1399.
 - 31- **M. Przeworski et JD Wall** (2001.) Why is there so little intragenic linkage disequilibrium in humans? *Genet. Res.*, **77**, 143-151.

- 32- **GA Huttley, MW Smith, M Carrington et SJ. O'Brien** (1999). A scan for linkage disequilibrium across the human genome. *Genetics*, **152**, 1711-1722.
- 33- **S Giglio, KW Broman, N Matsumoto et al.** (2001). Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 874-83
- 34- **P Andolfatto, F Depaulis et A. Navarro** (2001). Inversion polymorphisms and nucleotide variability in *Drosophila*. *Genet. Res.*, **77**, 1-8.
- 35- **DE Reich, M Cargill, S Bolk et al.** (2001). Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*, **411**, 199-204.
- 36- **SB Gabriel, SF Schaffner, H Nguyen, et al.** (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, **296**, 2225-2229.
- 37- **SK Service, RA Ophoff et NB. Freimer** (2001). The genome-wide distribution of background linkage disequilibrium in a population isolate. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 545-551.
- 38- **M Richards, V Macaulay, E Hickey et al.** (2000). Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am. J. Hum. Genet.*, **67**, 1251-1276.
- 39- **S Shifman et A. Darvasi** (2001). The value of isolated populations. *Nat. Genet.*, **28**, 309-310.
- 40- **DB Goldstein** (2001). Islands of linkage disequilibrium. *Nat. Genet.*, **29**, 109-111.
- 41- **MJ Daly, JD Rioux, SF Schaffner, TJ Hudson et ES. Lander** (2001). High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat. Genet.*, **29**, 229-232.
- 42- **AJ Jeffreys, I Kauppi et R. Neumann** (2001). Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat. Genet.*, **29**, 217-222.
- 43- **GA McVean, SR Myers, S Hunt et al** (2004). The fine-scale structure of recombination rate variation in the human genome. *Science*, **304**, 581-584.
- 44- **GC Johnson, L Esposito, BJ Barratt et al.** (2001). Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat. Genet.*, **29**, 233-237.
- 45- **K Zhang, M Deng, T Chen, MS Waterman et F. Sun** (2002). A dynamic programming algorithm for haplotype block partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 7335-7339.
- 46- **Z Lin et RB Altman** (2004). Finding haplotype tagging SNPs by use of principal components analysis. *Am. J. Hum. Genet.*, **75**, 850-861.
- 47- **DB Goldstein, KR Ahmadi, ME Weale et NW. Wood** (2003). Genome scans and candidate gene approaches in the study of common diseases and variable drug responses. *Trends Genet.*, **19**, 615-622.
- 48- **B Devlin et K. Roeder** (1999). Genomic control for association studies. *Biometrics*, **55**, 997-1004.
- 49- **JK Pritchard, M Stephens, NA Rosenberg et P. Donnelly** (2000). Association mapping in structured populations. *Am. J. Hum. Genet.*, **67**, 170-181.
- 50- **JK Pritchard et M. Przeworski** (2001). Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am. J. Hum. Genet.*, **69**, 1-14.
- 51- **CT Falk et P Rubinstein** (1987). Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann. Hum. Genet.*, **51**, 227-233.
- 52- **JD Terwilliger et J Ott** (1992). A haplotype-based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations. *Hum. Hered.*, **42**, 337-346.
- 53- **RS Spielman, RE McGinnis et WJ. Ewens** (1993). Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am. J. Hum. Genet.*, **52**, 506-516.
- 54- **WM Chen et H.W. Deng** (2001). A general approach for computing the statistical power of transmission/disequilibrium test for complex disease genes. *Genet. Epidemiol.*, **21**, 53-67.
- 55- **S Bennett et RN Curnow** (2001). Consanguinity and the transmission/disequilibrium test for allelic association. *Genet. Epidemiol.*, **21**, 68-77.
- 56- **E Génin, AA Todorov et F Clerget-Darpoux** (2002). Properties of the transmission disequilibrium test in the presence of inbreeding. *Genet. Epidemiol.*, **22**, 116-127.
- 57- **RS Spielman et WJ. Ewens** (1998). A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test. *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 450-458.
- 58- **NM Laird, S Horvath et X. Xu** (2000). Implementing a unified approach to family-based

- tests of association. *Genet. Epidemiol.*, **19** Suppl 1, S36-42.
- 59- ER Martin, SA Monks, LL Warren et NL Kaplan** (2000). A test for linkage and association in general pedigrees: the pedigree disequilibrium test. *Am. J. Hum. Genet.*, **67**,146-154.
- 60- D Clayton , H. Jones** (1999). Transmission/disequilibrium tests for extended marker haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.*, **65**, 1161-1169.
- 61- F. Dudbridge, BP Koeleman, JA Todd et DG. Clayton** (2000). Unbiased application of the transmission/disequilibrium test to multilocus haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.*, **66**,2009-2012.
- 62- F. Dudbridge** (2003). Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet. Epidemiol.*, **25**, 115-121.
- 63- S Horvath, X Xu, SL Lake, EK Silverman, ST Weiss, NM. Laird** (2004). Family-based tests for associating haplotypes with general phenotype data: application to asthma genetics. *Genet. Epidemiol.*, **26**, 61-69.
- 64- N Risch et al.** (1995). Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nat. Genet.*, **9**,152-159.
- 65- B Rannala et G. Bertorelle** (2001). Using linked markers to infer the Age of a Mutation. *Human Mutation*,**18**, 87-100.
- 66- WE Evans et MV. Relling** (2004). Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature*, **429**, 464-468.
- 67- AP Morris, JC Whittaker, DJ. Balding** (2004). Little loss of information due to unknown phase for fine-scale linkage-disequilibrium mapping with single-nucleotide-polymorphism genotype data. *Am. J. Hum. Genet.*, **74**, 945-953.
- 68- PY Kwok et M. Xiao** (2004). Single-molecule analysis for molecular haplotyping. *Hum. Mutat.*, **23**, 442-446.
- 69- The International HapMap Consortium** (2003). The International HapMap Project. *Nature*, **426**,789-796.
- 70- J. Couzin** (2004). Consensus emerges on HapMap strategy. *Science*, **304**,671-673.
- 71- S Nejentsev et al.** (2004). Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphism between populations in the vitamin D receptor gene. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 1633-1639.

USEFULNESS OF LIGATION-MEDIATED PCR GENOTYPING IN TRACKING OUTBREAK-ASSOCIATED *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS

H. MARDASSI¹*, A. NAMOUCHI¹, A. KARBOUL¹, N.KHABOUCHE¹,
R. HALITTI², M. ZARROUK², B.MHENNI¹ AND S. KAABI¹

¹ Laboratoire des Mycobactéries, Institut Pasteur de Tunis, 13 Place Pasteur, BP 74, 1002, Tunis, Tunisie.

² Hôpital Régional de Menzel-Bourguiba, Menzel Bourguiba, Bizerte, Tunisie.

* Corresponding author

E.mail: belmi.merdassi@pasteur.rns.tn

RESUME

L'émergence d'une épidémie de tuberculose à bacille multirésistant a fait ressentir le besoin de disposer d'un test rapide de typage moléculaire, applicable à l'échelle nationale et ce, afin de tracker la souche épidémique et prévenir l'émergence de nouveaux foyers. A cet effet, nous avons appliqué la méthode de génotypage LM-PCR (ligation-mediated PCR), laquelle est basée sur l'amplification des séquences en amont de l'élément mobile IS6110 grâce à la ligation préalable d'un oligonucleotide synthétique utilisé comme site d'amorçage. Bien que cette méthode s'est avérée moins discriminante que l'approche standard, à savoir IS6110 RFLP, nous étions en mesure d'identifier rapidement et de manière prospective de nouveaux cas associés à l'épidémie. Comparativement à la méthode IS6110 RFLP, la technique LM-PCR s'est avérée suffisamment pratique pour justifier son application au sein de laboratoires impliqués dans la surveillance de la tuberculose multirésistante à l'échelle Nationale.

Mots clés : *M. tuberculosis*, tuberculose, épidémie, MDR, génotypage, LM-PCR, IS6110 RFLP, surveillance

SUMMARY

With the emergence of a multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) outbreak, the availability of a rapid typing method to carry out a nationwide prospective survey for the tracking of newly emerging MDR-TB foci became a priority. For this purpose, we have applied the IS6110 PCR-based genotyping assay, namely, LM-PCR (ligation-mediated PCR). The latter relies on ligation of a synthetic oligonucleotide priming site to a restriction site flanking IS6110. Sequences between the IS element and the restriction site are then amplified using an IS6110 specific outward primer and an oligonucleotide specific to the ligated priming site. Although it was found slightly less discriminative than the standard IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis (IS6110 RFLP), LM-PCR allowed for the rapid and prospective identification of new outbreak-related cases within a large pool of circulating *M. tuberculosis* isolates. In comparison to IS6110 RFLP, LM-PCR was found simple enough to justify its implementation in laboratories involved in MDR-TB surveillance at a nationwide scale.

Key words: *M. tuberculosis*, tuberculosis, outbreak, MDR, genotyping, LM-PCR, IS6110 RFLP, surveillance.

INTRODUCTION

With no doubt, IS6110 RFLP analysis remains the most potent method to discriminate between *Mycobacterium tuberculosis* strains^{3,3}. Several studies have showed the usefulness of this approach to identify outbreaks and unsuspected chains of TB transmission⁴⁻¹³, locate the source of infection¹⁴⁻¹⁶, reveal laboratory contamination¹⁷⁻¹⁹ and evaluation of the genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains²⁰⁻²⁷. Although several other *M. tuberculosis* genetic markers have been used, none has reached the discriminatory power of IS6110 RFLP. Even when combinations of such new typing methods were proposed, IS6110 RFLP genotyping was still required to definitely confirm the existence of effective epidemiological link^{1, 2, 28}.

MDR-TB is an emerging problem and, although initially considered as only limited to some hot spot regions where HIV infection is prevalent^{25, 26, 29}, several reports have recently expressed the need for tight control at any region of the world³⁰. Thus, it is crucial that sanitary services involved in TB surveillance be endowed with a versatile strain-specific typing method that allows rapid intervention to prevent further dissemination of MDR strains within the general community. In the present paper, we demonstrate that in the particular case of a microepidemic involving an MDR strain, where IS6110 element was found relatively unstable, LM-PCR, due to its slightly lower discriminatory power, could represent the method of choice for the surveillance of the epidemic strain. As the method is not time-consuming, it could be routinely applied for prospective, population-based, epidemiological studies for the rapid tracking of particular *M. tuberculosis* strains and identification of sites of transmission.

MATERIALS AND METHODS

M. TUBERCULOSIS STRAINS AND DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING

Eighty-five isolates of *M. tuberculosis* included in this study were recovered in the laboratory of Mycobacteriology of the Institut Pasteur de Tunis in the context of routine diagnostic activity. All isolates originate from a referral regional hospital located northern Tunisia (Menzel-Bourguiba). Cultures were performed on Löwenstein-Jensen medium and identified

as *M. tuberculosis* on the basis of biochemical characteristics (thiophen-2-carboxylic acid hydrazide [TCH] susceptibility test, growth on medium containing p-nitrobenzoic acid [PNB] catalase test, niacin accumulation test, and nitrate reduction test)³¹. Drug susceptibility testing was performed by the indirect proportion method on the same medium containing critical concentrations of 0.2 µg/mL isoniazid, 30 µg/mL rifampicin, 2 µg/mL ethambutol, 5 µg/mL streptomycin, 20 µg/mL ethionamide, and 200 µg/mL pyrazinamide. Resistance was defined according to Canetti et al.³².

DNA PREPARATION

For IS6110 RFLP, 2 to 3 Löwenstein-Jensen slants were required to recover a sufficient amount of DNA. The latter was purified following the protocol described by van Embden³³. In contrast, only a few colonies were used for LM-PCR typing. They were collected and resuspended in 100 µL of TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA [pH 8]). The mix was inactivated for 30 min at 100°C and 10 to 15 µL were used for fingerprinting.

LM-PCR TYPING

The method LM-PCR relies on the insertion element IS6110, but unlike IS6110 RFLP, it is based on PCR amplification. According to the published procedure³⁴, it detects size polymorphisms of amplified sequences lying upstream of the IS6110 mobile element. Typically, DNA is digested with *SalI*, and an asymmetrical double-stranded oligonucleotide (linker) is ligated to the restricted DNA ends. DNA fragments containing IS6110 are then amplified by using an IS6110-specific primer and a primer located within the linker. The PCR products are routinely separated in a 2% agarose gel.

IS6110 RFLP

IS6110-based fingerprinting was performed according to the standardized procedure for *M. tuberculosis*³⁵. Briefly, genomic DNA was restricted with *PvuII*, migrated on agarose gel electrophoresis and transferred to nylon membrane. The latter was hybridized overnight with a labeled plasmid vector containing the right-handed IS6110 probe (relative to the unique *PvuII* restriction site) that was generated by PCR using the following primer pair: 6110G1 (5'CTGACC-GAGCTGGGTGTGCC3') and 6110G2 (5' TCTGATCT-GAGACCTCAGCC 3'). Labeling and detection of

hybridizing DNA bands by enhanced chemiluminescence were performed following the manufacturer's instructions (Direct nucleic acid labeling and detection systems. RPN 3001, Amersham)

RESULTS

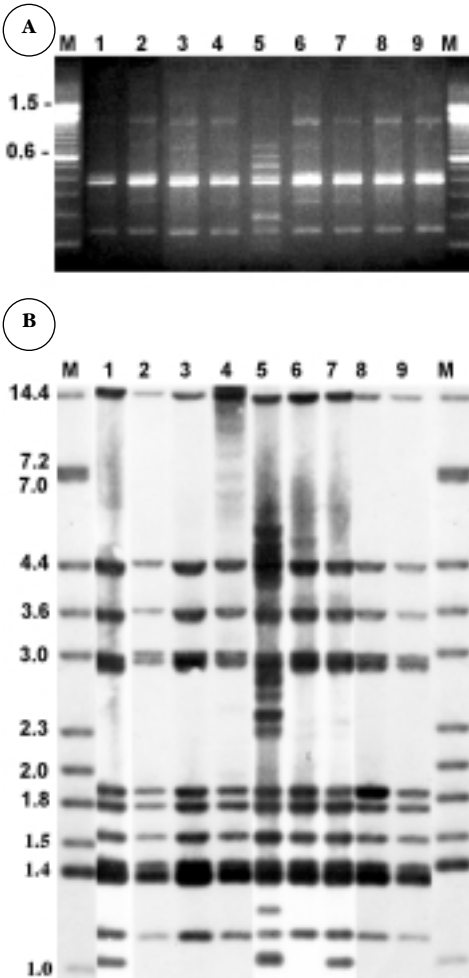


Figure 1. LM-PCR profile (A) of nine patients involved in the MDR outbreak as compared to IS6110 RFLP pattern. Lane M in (A) corresponds to the 100 bp DNA ladder (Invitrogen). Lane M in (B) relates to the MTB14363 reference strain.

In the present study, an MDR strain of *M. tuberculosis* has been the focus of particular surveillance as it was already shown to be endowed with increased

transmissibility leading to a typical outbreak within immune competent, non institutionalized, Tunisian individuals³⁵. Thus, a rapid discriminative test was required in order to identify newly emerging transmission foci associated to the aforementioned MDR strain. The test must be versatile enough so that it could be used to screen for the presence of this outbreak associated MDR strain at the national level. Since it is based on PCR amplification and, hence, amenable to high throughput screening, LM-PCR appears to fulfill these requirements.

The LM-PCR profile of the epidemic strain was established and yielded regularly five bands, two of which, are particularly intense (Fig.1A). When applied to ten patients associated to the MDR outbreak with nearly identical IS6110 RFLP profile (Fig. 1B), the same five-banded pattern was observed for all patients, but one (Fig.1A). The latter displayed the five-banded profile with additional amplified products. In fact, initial investigations have already established that this particular patient was the subject of dual infection³⁵; one isolate being the MDR outbreak-associated strain. Among the nine remaining patients with identical LM-PCR pattern, some differed by a single IS6110 band (Fig.1B). Thus, unlike IS6110 profiling, LM-PCR was unable to further discriminate between the outbreak-associated patients but efficiently clustered them.

To further demonstrate the utility of the LM-PCR method in detecting particular *M. tuberculosis* strains, we have used it as initial genotyping method, especially that a new MDR strain was recovered in the laboratory and a small amount of corresponding DNA was available upon the first culture, precluding the immediate use of IS6110 RFLP typing. Crude DNA was obtained by simply boiling a small amount of bacilli and then subjected to LM-PCR analysis. For comparison, *M. tuberculosis* DNA from two patients involved in the outbreak were included (Fig. 2, lanes 5 and 6). Interestingly, the LM-PCR profile of the new MDR strain was identical to that of the outbreak MDR strain (Fig. 2; compare lane 10 to lanes 5 and 6). Further analysis of this strain by IS6110 RFLP definitely confirmed that it was indeed the outbreak strain. It is worthy of note that in this particular situation, LM-PCR helped us to identify a new case related to this microepidemic among a large pool of newly iso-

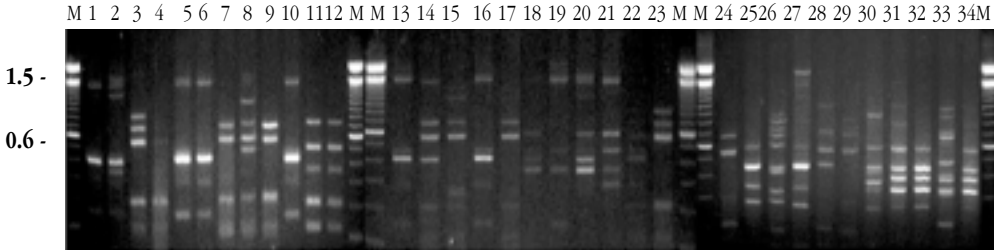


Figure 2. Assessment of the LM-PCR as a prospective means to track the outbreak MDR Haarlem strain. Lane M corresponds to the 100 bp DNA ladder (Invitrogen).

lated strains five weeks before IS6110 RFLP analysis could be performed. Consequently, policy measures to prevent further dissemination of this MDR strain were rapidly undertaken.

Further inspection of the LM-PCR patterns revealed several clusters unrelated to the microepidemic-associated strain. Indeed, at least 4 distinct clusters (lanes 3 and 8, lanes 11 and 12, lanes 13 and 16, lanes 31, 32, and 34) exist in this pool confirming the utility of LM-PCR typing as a rapid and prospective surveillance of ongoing transmission foci.

DISCUSSION

The availability of a typing test that allows identification of *Mycobacterium tuberculosis* at the strain level, appears now as a prerequisite for any efficient TB surveillance program^{7, 14, 24}. To date, the highest discriminatory test remains undoubtedly IS6110 RFLP. It has been suggested that IS6110 RFLP typing must be undertaken as a systematic strategy for efficient national TB control program^{7, 36, 37}. However, a number of constraints limit the use of IS6110 RFLP on a routine basis such as the necessity of large amounts of pure DNA, the lengthy delay in obtaining results, and the cost. Thus, several barriers prevent the widespread use of this technique for the prospective evaluation of particular epidemiological situations. The heaviness of this typing method precludes its implementation at a nationwide or at a regional scale. Alternative practical typing methods targeting other *M. tuberculosis* chromosomal markers have been developed. Although some of them are very useful to provide a snapshot on the TB dynamics within a particular area, or even at the global scale, they unfortunately failed to reach a discriminatory power allowing differentiation at the strain level^{1, 2, 38}. Furthermore, IS6110 mar-

ker, due to its relative short molecular clock, is very useful to identify recent and ongoing active TB transmission^{39, 40}. Hence, the surveillance of particular *M. tuberculosis* strains, requires a method with discriminative power that approaches IS6110 RFLP with robustness in terms of simplicity and applicability. Since LM-PCR relies on PCR and targets IS6110 insertion sequence, it should represent an ideal candidate for large scale analysis while still preserving a high degree of strain differentiation. Indeed, in previous studies, LM-PCR was found to be the highest discriminatory method despite the limitation imposed by the size of the restricted IS6110 flanking sequence^{2, 21, 34}. This has led to the proposal that LM-PCR, along with spoligotyping, would represent the best combination for molecular epidemiological studies as they simultaneously provide information on the overall diversity of *M. tuberculosis* complex strains and the eventual existence of outbreaks or ongoing transmission foci^{20, 21, 28}. However, one should keep in mind that, like IS6110 RFLP, strain differentiation by LM-PCR should be complemented by a second typing technique for strains with few IS6110 copies.

In our hands, LM-PCR was highly reproducible from one assay to another and yielded similar patterns for all patients involved in the MDR-TB outbreak. Although, IS6110 RFLP further subdivided outbreak-associated isolates into two groups, LM-PCR was sufficiently discriminative to help identify new cases harboring the outbreak MDR strain. As this new MDR case was identified among 32 patients within two days instead of the whole 4 to 5-week period generally required for IS6110 RFLP, the use of LM-PCR for the rapid tracking of highly virulent strains could be readily envisaged at the national level. This finding is of paramount importance for any TB control program

of developing countries as it would prevent the emergence of new foci of MDR outbreaks. Hence, it is conceivable that LM-PCR, given its versatility (i.e., no need for considerable amounts of purified DNA, no need for highly skilled personnel in molecular biology, not time-consuming, and amenable to population-based molecular epidemiology), makes part of a routine activity to monitor for the emergence of particular strains. Since several years, molecular epidemiology of TB has been restricted to laboratories endowed with the capacity to perform research. Although the benefit, for the TB program, that resulted from these studies have been pinpointed in many occasions^{3, 36}, implementation of molecular techniques as a prospective surveillance tool in developing countries is still uncertain. As a central level TB laboratory operating in a developing country and, in light of our own experience with LM-PCR, we believe that this approach is of great value in terms of applicability for community-based molecular typing. It could efficiently assist TB-control actors in deciphering ongoing transmission in the community and in preventing further dissemination of MDR *M. tuberculosis* strains.

ACKNOWLEDGMENTS

This investigation received financial support from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR, in the context of the South-South Initiative for Tropical Diseases Research (SSI-TDR) of the Pathogenesis and Applied Genomics (PAG) Committee.

REFERENCES

- 1- **D. van Soolingen** (2001). Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Intern. Med.*, **249**,1-26
- 2- **K. Kremer, D. van Soolingen, R. Frothingham, W. H. Haas, P. W. Hermans, C. Martin, P. Palittapongarnpim, B. B. Plikaytis, L. W. Riley, M. A. Yakrus, J. M. Musser and J. D. van Embden** (1999). Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 2607-18
- 3- **P. F. Barnes and M. D Cave** (2003). Molecular epidemiology of tuberculosis. *N. Engl. J. Med.*, **349**, 1149-1156
- 4- **C. Beck-Sague, S. W. Dooley, M. D. Hutton, J. Otten, A. Breeden, J. T. Crawford, A. E. Pitchenik, C. Woodley, G. Cauthen and W. R. Jarvis** (1992). Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. Factors in transmission to staff and HIV-infected patients. *J. Am. Med. Ass.*, **268**, 1280-1286
- 5- **B. R. Edlin, J. I. Tokars, M. H. Grieco, J. T. Crawford, J. Williams, E. M. Sordillo, K. R. Ong, J. O. Kilburn, S. W. Dooley, K.G. Castro et al.** (1992). An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **326**, 1514-21
- 6- **V. G. Coronado, C. M. Beck-Sague, M. D. Hutton, B. J. Davis, P. Nicholas, C. Villareal, C. L. Woodley, J. O. Kilburn, J. T. Crawford, T. R. Frieden et al.** (1993). Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Infect. Dis.*, **168**, 1052-1055
- 7- **P. J. Bifani, B. Mathema, Z. Liu, S. L. Moghazeh, B. Shopsin, B. Tempalski, J. Driscoll, R. Frothingham, J. M. Musser, P. Alcabes and B. N. Kreiswirth** (1999). Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *J. Am. Med. Ass.*, **282**, 2321-2327
- 8- **U. R. Dahle, P. Sandven, E. Heldal and D.A. Caugant** (2003). Continued low rates of transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Norway. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2968-2973
- 9- **U.R. Dahle, P. Sandven, E. Heldal, T. Mannsaaker and D. A. Caugant** (2003). Deciphering an outbreak of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **4**, 67-72
- 10- **C. L. Daley, P. M. Small, G. F. Schecter, G. K. Schoolnik, R. A. McAdam, W. R. Jr. Jacobs and P. C. Hopewell** (1992). An outbreak of tuberculosis with accelerated progression

- among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N. Engl. J. Med.*, **1326**, 231-235
- 11- **S. Samper, C. Martin, A. Pinedo, A. Rivero, J. Blazquez, F. Baquero, D. van Soolingen and J. van Embden** (1997). Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS*, **11**, 1237-1242
 - 12- **M. A. Fischl, R. B. Uttamchandani, G. L. Daikos, R. B. Poblete, J. N. Moreno, R. R. Reyes, A. M. Boota, L.M. Thompson, T. J. Cleary and S. Lai** (1992). An outbreak of tuberculosis caused by multiple-drug-resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. *Ann. Intern. Med.*, **117**, 177-183
 - 13- **A. van Rie, R. M. Warren, N. Beyers, R. P. Gie, C. N. Classen, M. Richardson, S. L. Sampson, T. C. Victor and P. D. van Helden** (1999). Transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain resembling "strain W" among noninstitutionalized, human immunodeficiency virus-seronegative patients. *J. Infect. Dis.*, **180**, 1608-1615
 - 14- **P. F. Barnes, Z. Yang, J. M. Pogoda, S. Preston-Martin, B. E. Jones, M. Oyata, L. Knowles, S. Harvey, K. D. Eisenach and M. D. Cave** (1999). Foci of tuberculosis transmission in central Los Angeles. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, **159**, 1081-1086
 - 15- **B. A. Ellis, J. T. Crawford, C. R. Braden, S. J. McNabb, M. Moore and S. Kammerer** (2002). National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network Work Group. Molecular epidemiology of tuberculosis in a sentinel surveillance population. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 1197-1209.
 - 16- **P. J. Bifani, B. B. Plikaytis, V. Kapur, K. Stockbauer, X. Pan, M. L. Lutfey, S. L. Moghazeh, W. Eisner, T. M. Daniel, M.H. Kaplan, J. T. Crawford, J. M. Musser and B. N. Kreiswirth** (1996). Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *J. Am. Med. Ass.*, **275**, 452-457
 - 17- **R. M. Jasmer, M. Roemer, J. Hamilton, J. Bunter, C. R. Braden, T. M. Shinnick and E. P. Desmond** (2002). A prospective, multicenter study of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 1260-1263
 - 18- **J. M. Van Duin, J. E. Pijnenburg, C. M. van Rijswoud, P. E. de Haas, W. D. Hendriks and D. van Soolingen** (1998). Investigation of cross contamination in a *Mycobacterium tuberculosis* laboratory using IS6110 DNA fingerprinting. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, **2**, 425-429
 - 19- **C. R. Braden, G. L. Templeton, W. W. Stead, J. H. Bates, M. D. Cave and S. E. Valway** (1997). Retrospective detection of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures with use of DNA fingerprint analysis. *Clin. Infect. Dis.*, **24**, 35-40
 - 20- **S. N. Niobe-Eyangoh, C. Kuaban, P. Sorlin, P. Cunin, J. Thonnon, C. Sola, N. Rastogi, V. Vincent and M. C. Gutierrez** (2003). Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2547-2553
 - 21- **S. Ferdinand, C. Sola, B. Verdol, E. Legrand, K. S. Goh, M. Berchel, A. Aubery, M. Timothee, P. Joseph, J. W. Pape and N. Rastogi** (2003). Molecular characterization and drug resistance patterns of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in an AIDS counseling center in Port-au-Prince, Haiti: a 1-year study. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 694-702
 - 22- **J. T. Douglas, L. Qian, J. C. Montoya, J. M. Musser, J. D. Van Embden, D. Van Soolingen and K. Kremer** (2003). Characterization of the Manila family of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2723-2726
 - 23- **R. W. Wilson, Z. Yang, M. Kelley, M. D. Cave, J. M. Pogoda, R. J. Wallace Jr, J. P. Cegielski, D. F. Dunbar, D. Bergmire-Sweat, L. B. Elliott and P. F. Barnes** (1999). Evidence from molecular fingerprinting of limited spread of drug-resistant tuberculosis in Texas. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3255-3259

- 24- **S. S. Munsiff, B. Nivin, G. Sacajiu, B. Mathema, P. Bifani and B. N. Kreiswirth** (2003). Persistence of a highly resistant strain of tuberculosis in New York City during 1990-1999. *J. Infect. Dis.*, **188**, 356-363
- 25- **J. R. Glynn, J. Whiteley, P. J. Bifani, K. Kremer and D. van Soolingen** (2002). Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 843-849
- 26- **P. J. Bifani, B. Mathema, N. E. Kurepina and B. N. Kreiswirth** (2002). Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.*, **10**, 45-52
- 27- **S. Phyu, R. Jureen, T. Ti, U. R. Dahle and H. M. Grewal** (2003). Heterogeneity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Yangon, Myanmar. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4907-4908
- 28- **S. Bonora S, M. C. Gutierrez, G. Di Perri, F. Brunello, B. Allegranzi, M. Ligozzi, R. Fontana, E. Concia and V. Vincent** (1999). Comparative evaluation of ligation-mediated PCR and spoligotyping as screening methods for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3118-3123
- 29- **T. R. Frieden, T. R. Sterling, S. S. Munsiff, C. J. Watt and C. Dye** (2003). *Tuberculosis*. *Lancet*, **362**, 887-899
- 30- **H. S. Cox, J. D. Orozco, R. Male, S. Rusch-Gerdes, D. Falzon, I. Small, D. Doshetov, Y. Kebede and M. Aziz** (2004). Multidrug-resistant tuberculosis in central Asia. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 865-872
- 31- **I. N. De Kantor, S. J. Kim, T. Frieden, A. Laszlo, F. Luelmo, P.-Y. Norval, H. Rieder, P. Valenzuela and K. Weyer** (1998). Laboratory services in tuberculosis control. Culture (Part III). WHO/TB/98.258
- 32- **G. Canetti, S. Froman, J. Grosset, P. Hauduroy, A. M. Langerov, H. T. Mahler, G. Meissner, D. A. Mitchison and L. Sula** (1963). *Mycobacteria*: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull. World Health Organ.*, **29**, 565-578
- 33- **J. D. van Embden, M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T.M. Shinnick et al.** (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 406-409
- 34- **G. Prod'homme, C. Guilhot, M. C. Gutierrez, A. Varnerot, B. Gicquel and V. Vincent** (1997). Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by ligation-mediated PCR fingerprint analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 3331-3334
- 35- **H. Mardassi, A. Namouchi, R. Haltiti, M. Zarrouk, B. Mhenni, A. Karboul, N. Khabouchi, N. C. G. van Pittius, E. Streicher, B. Gicquel and K. Dellagi** (2005). Tuberculosis due to resistant Haarlem strain, Tunisia. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 957-961
- 36- **S. J. McConkey, M. Williams, D. Weiss, H. Adams, M. D. Cave, Z. Yang, T. Lindner and T. C. Bailey** (2002). Prospective use of molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by use of restriction fragment-length polymorphism in a public tuberculosis-control program. *Clin. Infect. Dis.*, **34**, 612-619
- 37- **F. A. Drobniewski, A. Gibson, M. Ruddy and M. D. Yates** (2003). Evaluation and utilization as a public health tool of a national molecular epidemiological tuberculosis outbreak database within the United Kingdom from 1997 to 2001. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1861-1868
- 38- **I. Filliol, J. R. Driscoll, D. Van Soolingen, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valetudie, D. D. Anh, R. Barlow, D. Banerjee, P. J. Bifani et al.** (2002). Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 1347-1349
- 39- **A. Alito, N. Morcillo, S. Scipioni, A. Dolmann, M. I. Romano, A. Cataldi and D. van Soolingen** (2005). The IS6110 restriction fragment length polymorphism in particular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliable use in outbreak investigation. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 788-791
- 40- **A. S. de Boer, M W Borgdorff, P. E. de Haas, N. J. Nagelkerke, J. D. van Embden and D. van Soolingen** (1999). Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J. Infect. Dis.*, **180**, 1238-1244

PREDOMINANCE ET EVOLUTION DES GENES *BLA*_{SHV} CHEZ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* DANS UN MILIEU HOSPITALIER DE TUNIS

T. BEN-HAMOUDA¹ ET K. BEN-MAHREZ^{2*}

¹ Laboratoire Interactions Légumineuses-Microorganismes, INRST, Hammam-Lif, Tunisie.

² Laboratoire de Biochimie et de Biotechnologie, Faculté des Sciences de Tunis, Université

* Auteur correspondant

E-mail : kamel.benmahrez@fst.rnu.tn

RESUME

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) produites par des souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* sont étudiées par isoélectrofocalisation et par amplification et séquençage de leurs gènes. Les résultats montrent que les BLSE les plus fréquentes sont de type SHV. Le séquençage révèle la présence des gènes correspondant aux deux BLSE: SHV-2a et SHV-12, ce qui laisse suggérer une évolution directe de SHV-12 à partir de SHV-2a.

Mots clefs : *Klebsiella pneumoniae*, β -lactamases, BLSE, SHV, évolution.

SUMMARY

Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) produced by clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* were investigated, using isoelectric-focusing and DNA amplification followed by sequencing. A predominance of SHV variants was found. Sequencing identified the genes for the SHV-2a and -12 enzymes, suggesting direct evolution of SHV-12 from SHV-2a.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, β -lactamases, ESBLs, SHV, evolution.

INTRODUCTION

Chez les bactéries à Gram négatif, la production de β -lactamases demeure le mécanisme le plus important de résistance aux β -lactamines^{1,2}. TEM-1, TEM-2 et SHV-1, β -lactamases les plus communément isolées au début des années 80 étaient à l'origine de cette résistance particulièrement grave en milieu hospitalier. Les céphalosporines à spectre étendu, résistantes à l'hydrolyse par ces β -lactamases, ont été alors introduites en clinique^{3,4}. En réponse à la pression de sélection maintenue *in vivo* par ces céphalosporines, les pénicillinases primaires de type TEM et SHV ont évolué par mutations ponctuelles. On a assisté ainsi à l'apparition de nouvelles β -lactamases à large spectre d'activité, dérivant de TEM-1, TEM-2 et SHV-1 et désignées β -lac-

tamases à spectre étendu (BLSE). Ces enzymes ont été particulièrement isolées chez *K. pneumoniae*^{5,6}.

Chez cette espèce, la résistance naturelle aux β -lactamines est liée à la production constitutive d'une β -lactamase chromosomique dite SHV-1 qui entraîne la résistance aux pénicillines et à un niveau moindre aux céphalosporines de première génération^{7,8}. Des mutations responsables de l'élargissement de ce spectre d'activité touchent des acides aminés dont certains sont directement impliqués dans la formation du site actif de l'enzyme. Ainsi la majorité des BLSE dérivant de SHV-1 est caractérisée par la substitution du résidu Gly en position 238 par le résidu Ser, comme c'est le cas de SHV-2, SHV-2a, SHV-5, SHV-12, etc...⁸

Le milieu hospitalier dans notre pays n'a pas été épargné par la dissémination des bactéries résistantes aux β -lactamines^{9,10,11,12}. Des souches productrices de BLSE ont été décrites dans différents hôpitaux de la Tunisie^{13,14,15}. La présence du gène *blashV-2a* codant pour la BLSE SHV-2a a déjà été signalée chez des souches de *Salmonella* isolées dans un hôpital tunisien¹⁶. Face à la diversification des β -lactamases et à la dissémination de leurs gènes enregistrées pendant la dernière décennie à travers les différents continents¹⁷⁻²³ nous nous sommes proposés d'identifier les β -lactamases circulant dans notre milieu hospitalier et d'étudier leur évolution.

MATERIEL ET METHODES

SOUCHES BACTÉRIENNES

Quarante-neuf souches de *K. pneumoniae* isolées en 1995-1996 dans un hôpital de Tunis ont fait l'objet de ce travail (Tableau I). Ces souches ont été précédemment décrites comme étant résistantes aux pénicillines (amoxicilline et ticarcilline), à la céfalotine et aux céphalosporines à spectre étendu (ceftriaxone, céfotaxime et ceftazidime) et sont productrices de BLSE selon le test de double synergie¹⁵.

Les souches utilisées comme sources de β -lactamases de référence sont les suivantes: *Escherichia coli* R111 productrice de TEM-1 de pI 5,4; *E. coli* RP4 productrice de TEM-2 de pI 5,6; *E. coli* D660 productrice de TEM-21 de pI 6,4 et *E. coli* p453 productrice de SHV-1 de pI 7,6.

E. coli DH5 α (recA1, F⁻, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rk⁻, mk⁺), supE44, relA1, Δ lacU169, ϕ 80 lacZAM15) a été utilisée comme souche hôte dans les expériences de transformation.

ISOÉLECTROFOCALISATION

La préparation des extraits protéiques, leur analyse par isoélectrofocalisation et la révélation des activités β -lactamases avec le procédé iodométrique sont décrites par Bellaaj et coll¹². Des extraits protéiques contenant 80 μ g de protéines totales sont soumis à une séparation selon le point isoélectrique sur un gel horizontal de polyacrylamide à 7% contenant 6% (V/V) d'ampholytes pH 3-10. L'isoélectrofocalisation est menée sous une tension totale de 1000 V pendant

Tableau I : Les activités β -lactamases des différentes souches *K. pneumoniae* et de leurs transformants.

Souche	pI de(s) β -lactamase(s)	Souche	pI de(s) β -lactamase(s)
<i>K. p</i> 1	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 26	<u>7,6</u> ; 8,2
<i>K. p</i> 2	<u>7,6</u> ; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 27	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 3	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 28	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 4	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 29	<u>5,4</u> ; 7,6; 8,2
<i>K. p</i> 5	7,6; 8,2'	<i>K. p</i> 30	7,6; 8,2
<i>K. p</i> 6	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 31	7,6; 8,2'
<i>K. p</i> 7	7,6; 8,2'	<i>K. p</i> 32	7,6; 8,2'
<i>K. p</i> 8	<u>7,6</u> ; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 33	<u>7,6</u> ; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 9	<u>6</u> ; 7,6; 8,2	<i>K. p</i> 34	<u>7,6</u>
<i>K. p</i> 10	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 35	<u>6</u>
<i>K. p</i> 11	<u>5,4</u> ; 7,6; 8,2	<i>K. p</i> 36	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 12	7,6; 8,2'	<i>K. p</i> 37	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 13	7,6'	<i>K. p</i> 38	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 14	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 39	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 15	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 40	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 16	<u>5,4</u> ; 7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 41	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 17	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 42	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 18	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 43	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 19	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 44	<u>7,6</u> ; 8,2
<i>K. p</i> 20	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 45	6; <u>7,6</u> ; 8,2
<i>K. p</i> 21	<u>5,4</u> ; 7,6; 8,2	<i>K. p</i> 46	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 22	<u>7,6</u>	<i>K. p</i> 47	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 23	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 48	7,6; <u>8,2</u>
<i>K. p</i> 24	7,6; <u>8,2</u>	<i>K. p</i> 49	7,6'
<i>K. p</i> 25	7,6; <u>8,2</u>		

K. p. : *Klebsiella pneumoniae* ; souligné: β -lactamase(s) produite(s) par les transformants correspondants.

'aucun transformant n'a été obtenu.

2 heures 45 min. Le gel est alors coloré par une solution d'iode puis lavé dans du tampon 25 mM phosphate de sodium pH 7. Le gel est enfin immergé dans une solution d'ampicilline (1 mM) ou de céfalotine (5 mM) ou de céfotaxime (5 mM). La décoloration du gel révèle la présence d'activités β -lactamases.

EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE ET TRANSFORMATION BACTÉRIENNE

L'ADN plasmidique des différentes souches a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline,²⁴ et utilisé pour transformer *E. coli* DH5 α . Les transformants ont été sélectionnés sur milieu *Luria-Bertani* (LB) avec l'ampicilline (100 μ g/ml) comme marqueur de sélection²⁴.

AMPLIFICATION PAR PCR DES GÈNES *BLASHV*

L'ADN plasmidique des transformants a été utilisé comme matrice pour l'amplification des gènes *blashv*. Les amorces SHV-A et SHV-B ont été utilisées pour une amplification partielle du gène et les amorces SHV-C et SHV-D pour une amplification de la totalité du même gène (Tableau II). Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermo-cycleur (TRIO-thermoblock, Biometra) dans 50 µl du mélange réactionnel contenant 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂, 5% DMSO, 200 µM de chaque dNTP, 100 ng de chaque amorce, 50 ng d'ADN plasmidique et 1 U de Dynazyme™ EXT DNA polymerase (Finnzymes, Finlande) selon le programme suivant: 1 min à 94°C, 30 sec à 52°C, et 1 min à 72°C (30 cycles).

Tableau II: Séquences et position des amorces utilisées pour amplification et séquençage des gènes *blashv*⁽²⁵⁾

Amorce	Séquences	Origine et position
SHV-A	5'-CACTCAAGGATGTATTGTG-3'	<i>blashv</i> -1 (103)
SHV-B	5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTCG-3'	<i>blashv</i> -1 (988)
SHV-C	5'-ACTGAATGAGGCGCTTCC-3'	<i>blashv</i> -1 (616)
SHV-D	5'-ATCCCGCAGATAAATCACC-3'	<i>blashv</i> -1 (910)

CLONAGE ET SÉQUENÇAGE DES GÈNES *BLASHV*

Les fragments amplifiés par PCR en présence du couple d'amorces SHV-A et SHV-B ont été élués des gels d'agarose, après électrophorèse, en utilisant le kit «QIAquick Gel Extraction Kit» et mis en solution dans 10 µl d'eau stérile selon les recommandations du fournisseur. Les fragments sont alors insérés en présence de ligase dans le vecteur pTAG. En effet, l'enzyme Dynazyme utilisée pour l'amplification par PCR rajoute des résidus adényliques à l'extrémité 3' du brin de l'ADN qu'elle synthétise lors de l'élongation. De ce fait, les fragments d'ADN produits lors de l'amplification possèdent une extrémité cohésive favorable au clonage au niveau du site d'insertion du vecteur pTAG. Des cellules DH5α perméabilisés au CaCl₂

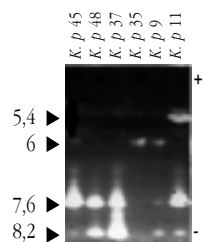
ont été transformées par une fraction du mélange de la ligation selon la technique décrite en 1989 par Sambrook *et coll*²⁴. Les colonies transformées ont été sélectionnées sur milieu LB solide contenant de l'ampicilline à 100 µg/ml. L'ADN plasmidique extrait à partir de quelques colonies recombinantes a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% avant et après une double digestion par *EcoR* I/*Hind* III pour vérifier la présence d'insert. Les réactions de séquençage sont réalisées selon la méthode de Sanger²⁶ en utilisant les amorces SHV-A et SHV-B (Tableau II) et l'ADN polymérase modifiée du phage T7 (sequenase; USB Corporation) et en appliquant les recommandations du fournisseur.

La recherche de similitude entre les séquences obtenues et celles contenues dans les banques de données est réalisée sur le site NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. La traduction des séquences nucléotidiques est faite avec le logiciel «Protein Sequence Analysis Version 3.3». L'alignement des différentes séquences est effectué avec le programme «CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment».

RESULTATS PRÉDOMINANCE DES β -LACTAMASES DE TYPE SHV

Les extraits protéiques de toutes les souches ont été analysés par isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide dans un gradient de pH allant de 3 à 10. La révélation des activités β -lactamases en présence d'ampicilline comme substrat a montré quatre activités enzymatiques de pI égal respectivement à 8,2; 7,6; 6 ou 5,4 (Fig. 1). Le nombre et le pI des β -lactamases varient selon la souche. Les β -lactamases de pI 6 et 5,4, et donc du type TEM sont présentes respectivement dans 3 et 4 souches, alors que celles du type SHV (pI 7,6 et 8,2) sont exprimées par 48 et 44 souches respectivement (Tableau I).

Figure 1. Mise en évidence des activités β -lactamases après isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide 7% en présence d'ampicilline 1 mM. La figure illustre (à titre d'exemples), les souches K. p 45, K. p 48, K. p 37, K. p 35, K. p 9 et K. p 11. Les chiffres 5,4; 6; 7,6 et 8,2 indiquent les valeurs des pI.



IDENTIFICATION DES BLSE PAR ISOÉLECTROFOCALISATION

Après transformation de la souche réceptrice *E. coli* DH5 α avec l'ADN plasmidique isolé à partir des différentes souches étudiées, les extraits protéiques des transformants ont été analysés par isoélectrofocalisation suivie d'une révélation des activités β -lactamases en présence de la céfalotine comme substrat. La transformation avec l'ADN plasmidique des différentes souches de *K. pneumoniae* entraîne l'acquisition de la β -lactamase de pI 8,2 essentiellement (Fig. 2). Des transformants produisant la β -lactamase de pI 7,6, de pI 6 ou pI 5,4 ont été aussi sélectionnés. Le nombre et le pI des enzymes transférées par transformation varient selon la souche à partir de laquelle l'ADN plasmidique a été extrait (Tableau I).

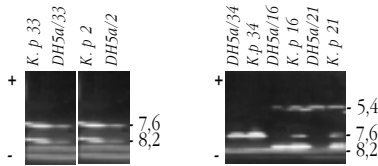


Figure 2. Activités β -lactamases mises en évidence après isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide 7%, en présence de céfalotine 5mM, chez les souches *K. pneumoniae* (K. p 34; K. p 16; K. p 21; K. p 33 et K. p 2 à titre d'exemples) et *E. coli* DH 5a transformée par l'ADN plasmidique des mêmes souches (DH 5a /K. p).

Les chiffres 5,4; 7,6 et 8,2 indiquent les valeurs des pI.

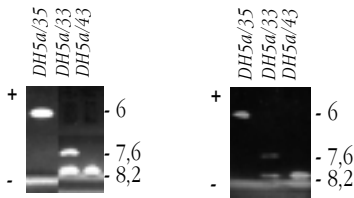


Figure 3. Détection des activités BLSE par isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide 7% en présence de: A: céfalotine 5mM B: céfotaxime 5mM

La figure montre à titre d'exemples les transformants issus des souches K. p 35, K. p 33 et K. p 43.

Les chiffres 6; 7,6 et 8,2 indiquent les valeurs des pI. céfalotine 5mM, chez les souches *K. pneumoniae* 34; K. p 16; K. p 21; K. p 33 et K. p 2 à titre d'exemples) et *E. coli* DH 5a transformée par l'ADN plasmidique des mêmes souches (DH 5a /K. p). Les chiffres 5,4; 7,6 et 8,2 indiquent les valeurs des pI.

AMPLIFICATION DES GÈNES BLASHV PAR PCR

Après avoir mis en évidence par isoélectrofocalisation la production fréquente de BLSE de type SHV (pI 7,6 et 8,2), deux couples d'oligonucléotides spécifiques, SHV-A et SHV-B d'une part et SHV-C et SHV-D (Tableau II) d'autre part, ont été utilisés pour amplifier par PCR les gènes *blashv* chez les transformants issus de 41 parmi les 49 souches étudiées. Le premier couple produit un fragment de 880 pb couvrant la région allant de la position 103 à 988 du gène *blashv-1*. Le deuxième couple d'amorces permet d'amplifier 300 pb se trouvant entre la position 616 et 910, région dans laquelle se produisent des mutations spécifiques modifiant le spectre de substrats des BLSE.²⁵ L'analyse des produits de PCR sur gels d'agarose à 2% montre des bandes à la taille attendue chez tous les transformants, comme dans le cas du témoin positif (Fig. 4).

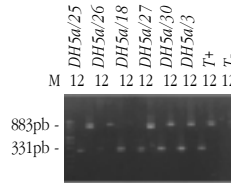


Figure 4. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification des gènes *blashv* d'*E. coli* DH5a transformée avec l'ADN de *K. pneumoniae*.

La figure montre à titre d'exemples l'amplification de l'ADN des transformants issus des souches K. p 25, K. p 26, K. p 18, K. p 27, K. p 30 et K. p 3.

1: amplification avec les oligonucléotides C et D.

2: amplification avec les oligonucléotides A et B.

T+: amplification de l'ADN p453; T-: ADN d'*E. coli* DH5a;

M: Marqueurs de taille (pUC Mix).

IDENTIFICATION DES GÈNES BLASHV

L'analyse des séquences nucléotidiques (Fig. 5) des fragments amplifiés à partir de l'ADN plasmidique de six souches représentatives (K. p 22, K. p 30, K. p 37, K. p 39, K. p 43 et K. p 44) montre qu'elles sont identiques à la séquence du gène *blashv-2a* dans le cas des deux clones produisant la BLSE de pI 7,6 (K. p 22 et K. p 44); et à celle du gène *blashv-12* dans le cas des quatre clones exprimant la BLSE de pI 8,2 (K. p 30, K. p 37, K. p 39 et K. p 43).

30	40	230	240	250
SHV-2a	LEQIK	Q SESQ L //FIADK T GAS E R G ARGIVALL		
SHV-12	LEQIK	Q SESQ L //FIADK T GAS K R G ARGIVALL		
30	LEQIK	Q SESQ L //FIADK T GAS K R G ARGIVALL		
37	LEQIK	Q SESQ L //FIADK T GAS K R G ARGIVALL		
39	LEQIK	Q SESQ L //FIADK T GAS K R G ARGIVALL		
43	LEQIK	Q SESQ L //FIADK T GAS K R G ARGIVALL		
22	LEQIK	Q SESQ L //FIADK T GAS E R G ARGIVALL		
44	LEQIK	Q SESQ L //FIADK T GAS E R G ARGIVALL		

Figure 5. Comparaison des séquences protéiques des clones correspondant aux souches *K. p* 30; *K. p* 37; *K. p* 39; *K. p* 43; *K. p* 22 et *K. p* 44 avec celles de SHV-2a et SHV-12.

La numérotation des acides aminés est faite selon Ambler et coll. (1991)⁸⁸.

Les deux acides aminés Gln et Ser caractéristiques de SHV-2a et SHV-12 sont indiqués en gras, alors que le résidu Lys spécifique de SHV-12 est souligné.

Seules les régions de la séquence comportant les mutations sont montrées.

Montre l'interruption introduite dans la séquence entre les résidus 40 et 230.

DISCUSSION

Au moins 340 différentes β -lactamases ayant des structures primaires et des propriétés catalytiques très variées ont été décrites²⁷. L'analyse par isoélectrofocalisation des activités β -lactamases a constitué la première approche adoptée pour caractériser les enzymes produites par les souches cliniques de *K. pneumoniae*. Cette analyse nous a permis, dans un premier temps, de confirmer le résultat du test de la sensibilité aux antibiotiques. En effet, la révélation de BLSE capables d'hydrolyser aussi bien le céfotaxime que la ceftazidime explique la résistance des souches aux β -lactamines y compris les céphalosporines à spectre étendu et l'aztréonam. Il s'agit de trois différentes BLSE de pI 6; 7,6 et 8,2. Le phénomène de la multiplicité et de la diversité des BLSE est en effet fréquent actuellement en milieux hospitaliers²⁸⁻³¹.

Diverses BLSE de type TEM ont été identifiées chez *K. pneumoniae*, c'est l'exemple de TEM-47 et TEM-48^{28,29}. Au cours de notre étude une BLSE de type TEM, de pI 6, a été identifiée chez trois souches, alors que les deux autres activités de pI 7,6 et 8,2 constituent le profil majoritaire. La prédominance, chez *K. pneumoniae*, des β -lactamases de type SHV par rap-

port à celles de type TEM, a été aussi constatée lors d'études européennes et américaines et plus récemment dans des pays d'Extrême Orient^{29,32-34}. Il est de plus en plus confirmé que les gènes de type SHV sont ubiquitaires chez *K. pneumoniae*^{5,35}.

L'amplification d'ADN par PCR, appliquée à tous les transformants producteurs de BLSE de type SHV a confirmé la présence de gènes *blashv* plasmidiques chez les souches étudiées. L'emploi des deux méthodes à savoir l'isoélectrofocalisation et l'amplification par PCR conjointement, constitue un excellent outil pour l'étude des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE³⁶. En effet, la détermination du pI et l'amplification de l'ADN nous ont permis de montrer que des gènes codant pour des BLSE de type SHV circulent en milieu hospitalier tunisien.

L'isolement des gènes *blashv* et leur séquençage fournit des données épidémiologiques importantes, on s'est donc proposé d'identifier les gènes des BLSE de type SHV produites par les souches cliniques étudiées. Deux β -lactamases du type SHV ont été révélées par séquençage. Il s'agit de SHV-2a et de SHV-12^{37,38}.

Les trois substitutions d'acides aminés partagées par toutes les séquences établies dans cette étude ont été décrites auparavant. La mutation Glycine-Sérine en position 238 est apparue avec SHV-2, la première BLSE décrite^{39,40} et elle est rencontrée chez la majorité des BLSE (SHV-2a, SHV-5, SHV-12...) et même dans plusieurs variants de type TEM⁴¹. Cette mutation est à l'origine de l'élargissement de la cavité de fixation du substrat, permettant l'interaction de l'enzyme avec les oxyimino- β -lactamines. La substitution Glu240Lys caractérise plusieurs mutants SHV et TEM. La lysine en se liant aux groupements carboxyles des chaînes latérales de la ceftazidime et de l'aztréonam, facilite leur hydrolyse.⁴¹⁻⁴³ L'émergence de cette mutation est associée à l'utilisation de la ceftazidime^{44,45}. La mutation leucine-glutamine en position 35 permet de distinguer les BLSE SHV-2a/SHV-12 de SHV-2/SHV-5⁴⁶. A partir des séquences établies et en tenant compte de l'absence de SHV-5 parmi les souches étudiées, les β -lactamases de type SHV pourraient avoir évolué à partir de SHV-1, par des mutations successives, SHV-1 aurait généré SHV-2 (mutation en position 238) puis SHV-2a (mutation en position 35). SHV-12 avec juste une mutation additionnelle en position 240 pourrait dériver de SHV-2a sans passer par SHV-5. Cette suc-

cession de mutations trace au mieux le chemin de l'évolution des BLSE de type SHV en Tunisie (Fig. 6)

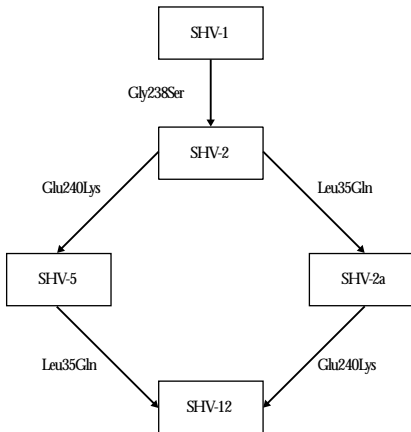


Figure 6. Schéma de l'évolution probable des gènes *bla*_{SHV}. Le schéma impliquant le passage par SHV-5 est celui généralement admis⁴⁶.

Ce schéma d'évolution rappelle l'évolution des BLSE décrite en Corée⁴⁷ et diffère du schéma généralement admis et d'après lequel SHV-12 aurait évolué à partir de SHV-5⁴⁶.

REMERCIEMENTS

Une partie de ce travail a été financée par le Secrétariat d'Etat à la Recherche Scientifique et à la Technologie.

Les auteurs remercient Dr. Thierry Foulon, UMR 7631, Université Pierre et Marie Curie-CNRS, France, pour son aide dans la réalisation du séquençage.

REFERENCES

- 1- **D. M. Livermore** (1998). β -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J. Antimicrob. Chemother.*, **41** (Suppl D), 25-41.
- 2- **R. Cantón, T. M. Coque and F. Baquero** (2003). Multi-resistant Gram-negative bacilli : from epidemics to endemics. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **16**, 315-325.
- 3- **A. A. Medeiros** (1997). Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.*, **24** (Suppl. 1), S19-S45.
- 4- **F. Moosdeen** (1997). The evolution of resistance to cephalosporins. *Clin. Infect. Dis.*, **24**, 487- 493.
- 5- **D. M. Livermore** (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, **8**, 557-584.
- 6- **D. Sirot** (1995). Extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, **36** (Suppl. A), 19-34.
- 7- **K. Bush, G. A. Jacoby and A. A. Medeiros** (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 1211-1233.
- 8- **P. Bradford** (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**, 933-951.
- 9- **A. Ben Hassen, G. Fournier, A. Kechrid, C. Fendri, S. Ben Redjeb and A. Philippon** (1990). Résistance enzymatique au céfotaxime chez cinquante six souches de *Klebsiella* spp, *Escherichia coli* et *Salmonella* spp dans un hôpital Tunisien (1984-1988). *Path. Biol.*, **38**, 464-469.
- 10- **A. Hammami, G. Arlet, S. Ben Redjeb, F. Grimont, A. Ben Hassen, A. Rekik and A. Philippon** (1991). Nosocomial outbreak of acute gastroenteritis in a neonatal intensive care unit in Tunisia caused by multiply drug resistant *Salmonella* wien producing SHV-2 beta-lactamase. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **10**, 641-646.
- 11- **M. Guessous, K. Ben-Mahrez, C. Belhadj and O. Belhadj** (1996). Characterization of the drug resistance plasmid R2418: restriction map and role of insertion and deletion in its evolution. *Can. J. Microbiol.*, **42**, 12-18.
- 12- **A. Bellaaj, C. Bollet, N. Alfeddy, F. Limam, C. Belhadj, A. Regli, R. Chollet, O. Belhadj and K. Ben-Mahrez** (2002). Molecular characterization of amoxicillin-clavulanate resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.*, **8**, 267-272.
- 13- **K. Ben-Mahrez, S. Réjiba, C. Belhadj and O. Belhadj** (1999). β -lactamase-mediated resistance to extended spectrum cephalosporins among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Res. Microbiol.*, **150**, 403-406.
- 14- **S. Réjiba, F. Limam, C. Belhadj, O. Belhadj and K. Ben-Mahrez** (2002). Biochemical characteriza-

- tion of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* 802. *Microb. Drug Resist.*, **8**, 9-13.
- 15- **T. Ben-Hamouda, T. Foulon, A. Ben-Cheikh-Masmoudi, C. Fendri, O. Belhadj and K. Ben-Mahrez** (2003). Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *J. Med. Microbiol.*, **52**, 427-433.
 - 16- **A. Makanera, G. Arlet, V. Gautier and M. Manai** (2003). Molecular epidemiology and characterization of plasmid-encoded β -lactamases produced by Tunisian clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Mbandaka resistant to broad-spectrum cephalosporins. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2940-2945.
 - 17- **T. M. Coque, A. Oliver, J. C. Pérez-Díaz, F. Baquero and R. Cantón** (2002). Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 500-510.
 - 18- **M. M. Navia, J. Ruiz and J. Vila** (2002). Characterization of an integron carrying a new class D β -lactamase (OXA-37) in *Acinetobacter baumannii*. *Microb. Drug Resist.*, **8**, 261-265.
 - 19- **P. Nordmann and L. Poirel** (2002). Emerging carbapenems in gram-negative aerobes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **8**, 321-331.
 - 20- **J. J. Yan, W. C. Ko, C. L. Chuang and J. J. Wu** (2002). Metallo-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *J. Antimicrobiol. Chemother.*, **50**, 503-511.
 - 21- **P. Giakkoupi, A. Xanthaki, M. Kanelopoulou, A. Vlahaki, V. Miriagou, S. Kontou, E. Papafraggas, H. Malamou-Lada, L. S. Tzouvelekis, N. J. Legakis and A. C. Vatopoulos** (2003). Spread of integron-associated VIM-type metallo- β -lactamase genes among imipenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 822-825.
 - 22- **S. H. Jeong, K. Lee, Y. Chong, J. H. Yum, S. H. Lee, H. J. Choi, J. M. Kim, K. H. Park, B. H. Han, S. W. Lee and T. S. Jeong** (2003). Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- β -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J. Antimicrobiol. Chemother.*, **51**, 397-400.
 - 23- **V. Miriagou, E. Tzelepi, D. Gianneli and L. S. Tzouvelekis** (2003). *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo- β -lactamase VIM-1. *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, **47**, 395-397.
 - 24- **J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 - 25- **J. Mercier and R. C. Levesque** (1990). Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6 β -lactamases and cloning and sequencing of SHV-1 β -lactamase. *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, **34**, 1577-1583.
 - 26- **F. Sanger, S. Nicklen and R. A. Coulson** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
 - 27- **K. Bush** (2001). New β -lactamases in Gram-negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.*, **32**, 1085-1089.
 - 28- **M. Gniadkowski, A. Palucha, P. Grzesiowski and W. Hryniewicz** (1998a). Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: Clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene. *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, **42**, 3079-3085.
 - 29- **M. Gniadkowski, I. Schneider, R. Jungwirth, W. E. Hryniewicz and A. Bauernfeind** (1998b). Ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from three Polish hospitals: Identification of three novel TEM- and SHV-5-type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, **42**, 514-520.
 - 30- **M. Yuan, H. Aucken, L. M. C. Hall, T. L. Pitt and D. M. Livermore** (1998). Epidemiological typing of *Klebsiellae* with extended-spectrum β -lactamases from European intensive care units. *J. Antimicrobiol. Chemother.*, **41**, 527-539.
 - 31- **S. Y. Essack, L. M. C. Hall, D. G. Pillay, M. L. McFadyen and D. Livermore** (2001). Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with

- extended-spectrum β -lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, **45**, 88-95.
- 32- **G. A. Jacoby and P. Han** (1996). Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 908-911.
- 33- **K. Shannon, P. Stapleton, X. Xiang, A. Johnson, H. Beattie, F. El Bakri, B. Cookson and G. French** (1998). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3105-3110.
- 34- **A. Chanawong, F. H. M'Zali, J. Heritage, A. Lulitanond and P. M. Hawkey** (2001). SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J. Antimicrobiol. Chemother.*, **48**, 839-852.
- 35- **G. S. Babini and D. M. Livermore** (2000). Are SHV β -lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, **44**, 2230.
- 36- **C. D. Steward, J. K. Rasheed, S. K. Hubert, J. W. Biddle, P. M. Raney, G. J. Anderson, P. P. Williams, K. L. Brittain, A. Oliver, J. E. McGowan and F. C. Tenover** (2001). Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the national committee for clinical laboratory standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2864-2872.
- 37- **A. Podbielski, J. Schönling, B. Melzer, K. Warnatz and H.-G. Leusch** (1991). Molecular characterization of a new plasmid-encoded SHV-type β -lactamase (SHV-2 variant) conferring high-level cefotaxime resistance upon *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 569-578.
- 38- **M. T. Nüesch-Inderbinnen, F. H. Kayser and H. Hächler** (1997). Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: Two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, **41**, 943-949.
- 39- **H. Knothe, P. Shah, V. Kremery, M. Antal and S. Mitsuhashi** (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, **11**, 315-317.
- 40- **M. Barthélémy, J. Peduzzi, H. Ben Yaghlane and R. Labia** (1988). Single amino acid substitution between SHV-1 β -lactamase and cefotaxime-hydrolyzing SHV-2 enzyme. *FEBS Lett.*, **231**, 217-220.
- 41- **J. R. Knox** (1995). Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutation, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, **39**, 2593-2601.
- 42- **A. Huletsky, J. R. Knox and R. C. Levesque** (1993). The role of Ser 238 and Lys 240 in the hydrolysis of third generation cephalosporins by SHV-type β -lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modelling. *J. Biol. Chem.*, **268**, 3690-3697.
- 43- **C. Cantu, W. Huang and T. Palzkill** (1996). Selection and characterization of amino acid substitutions at residues 237-240 of TEM-1 β -lactamase with altered substrate specificity for aztreonam and ceftazidime. *J. Biol. Chem.*, **271**, 22583-22545.
- 44- **J. P. Quinn, D. Miyashiro, D. Sahm, R. Flamm and K. Bush** (1989). Novel plasmid-mediated β -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, **33**, 1451-1456.
- 45- **P. A. Bradford, C. E. Cherubin, V. Idemyor, B. Rasmussen and K. Bush** (1994). Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago Hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing β -lactamases in a single isolate. *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, **38**, 761-766.
- 46- **J. Heritage, F. H. M'Zali, D. Gascony-Binzi and P. M. Hawkey** (1999). Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *J. Antimicrobiol.*
- 47- **J. Kim, H.-S. Shin, S.-Y. Seol and D.-T. Cho** (2002). Relationship between blaSHV-12 and blaSHV-2a in Korea. *J. Antimicrobiol. Chemother.*, **49**, 261-267.
- 48- **R. P. Ambler, A. F. W. Coulson, J.-M. Frère, J.-M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby and S. G. Waley** (1991). A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem. J.*, **276**, 269-270.

IDENTIFICATION OF SECOND LIPOLYSIS ACTIVATING PROTEIN FROM SCORPION *BUTHUS OCCITANUS TUNETANUS*

N. SOUDANI¹, J. GHARBI-CHIH², N. SRAIRI-ABID¹, H. KAABI¹,
A.MARGOTAT³, J. TORRESANI³ AND M. EL AYEB^{1*}.

¹ Laboratoire des venins et toxines, Institut Pasteur de Tunis, BP 74-1002 Tunis, Tunisie.

² Laboratoire de Biochimie (E51 C08-09), Faculté de Médecine de Tunis;

³ INSERM Unité 476 Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine, 13385 Marseille Cédex 5, France

* Corresponding author

E-mail: mobamed.elayeb@pasteur.rns.tn

RESUME

Nous avons identifié et isolé à partir de venin de scorpion *Buthus occitanus tunetanus* un deuxième facteur actif sur la lipolyse adipocytaire, LVP2 ; sa masse moléculaire étant de 16,89 Kda, déterminée par spectrométrie de masse. Ce facteur a été purifié et défini comme étant de structure hétérodimérique. LVP2, protéine non toxique, stimule la lipolyse adipocytaire d'une manière dose-dépendante avec un EC50 $\approx 2 \pm 0,75$ $\mu\text{g/ml}$ en comparaison avec le venin total $12 \pm 1,5$ $\mu\text{g/ml}$. Des études de compétition pour les sites liants [³H] CGP 12177 (radio-ligand spécifique des récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques) en présence de LVP2, montrent une inhibition de la fixation spécifique du radio-ligand avec IC50 de 74 ± 3 et 421 ± 2 nM, respectivement, pour CGP12177 et LVP2. Ainsi, l'analyse pharmacologique basée sur l'étude des réponses lipolytiques et confirmée par l'étude des sites liants, indique l'implication majeure d'un mécanisme de type β adrénergique et plus spécifiquement du sous-type β_2 . Les chaînes α et β isolées des LVP2 n'ont aucune activité lipolytique ou de compétition pour le radio-ligand sus-cité. L'intégrité des 2 chaînes est indispensable pour l'activité biologique de cette protéine. Ainsi, l'analyse pharmacologique et les réponses lipolytiques suggèrent l'implication d'un mécanisme d'action des LVP2 à travers des récepteurs de type β adrénergique.

Mots clés : Venin de scorpion; *Buthus occitanus tunetanus* (Bot); LVP (Protéine de venin activant la lipolyse); récepteurs β adrénergiques (β AR).

ABSTRACT

Besides the previously described LVP1, a second protein, LVP2, inducing a lipolytic response in adipose cells, was purified from scorpion *Buthus occitanus tunetanus* venom. It represented 2% of crude venom proteins, with pHi ≈ 6 and molecular mass of 16889 Da. The reduction and the alkylation of LVP2 revealed an heterodimeric structure. Isolated α and β chains of LVP2 have a molecular weight (MW) of 8822 Da and 8902, respectively. This protein was not toxic to mice and stimulated lipolysis on freshly dissociated rat adipocytes in a dose-dependent manner with EC50 $\approx 2 \pm 0.75$ $\mu\text{g/ml}$. LVP2 subunits did not display any lipolytic activity. As previously described for venom and LVP1, β adrenergic receptor (β AR) antagonists interfere with LVP2 activity. Furthermore, it is shown that LVP2 competes with [³H] CGP 12177 (β_1/β_2 AR antagonist) for binding to adipocyte plasma membrane with an IC50 of about 10⁻⁷M. Thus, these results bring original information on the existence of proteins that are present in scorpion venoms and can exert a distinct biological activity on adipocyte lipolysis through a β -type adreno-receptor pathway.

Key words: Scorpion venom; *Buthus occitanus tunetanus* (Bot); lipolysis activating venom protein (LVP); β adrenergic receptors (β AR).

INTRODUCTION

The major components of scorpion venom studied are the polypeptides that recognise ion channels and receptors in excitable membranes. They are harmful to a variety of organisms including man¹. The molecules responsible for the toxicity of the scorpion venom are polypeptides of 4–8 kDa that have been classified according to their receptor targets. Four different families of toxins have been found to interact specifically with ion channels: Na⁺ channels², K⁺ channels, Cl⁻ channels^{3,4} and Ca²⁺ channels^{5,7}. Scorpion toxins that affect Na⁺ channels are basic proteins with 60–76 amino acid residues which are stabilized by four disulphide bridges and are capable of specifically recognizing the Na⁺ channels of mammals, insects and crustaceans^{8–10}. The short-chain peptides (23–41 amino acid residues) are specific blockers of K⁺ channels^{11,12}. The presence of other pharmacologically active compounds was not excluded, but the identification and the characterization of such compounds are not yet established¹³. In a previous study, we have shown that scorpion *Butbus occitanus tunetanus* (Bot) venom contains compounds able to activate lipolysis in adipose cells¹⁴. A protein activating lipolysis, LVP1, was purified from Bot venom; this protein revealed an heterodimeric structure. The amino acid sequences of both chains share a high similarity with those of some Na⁺ channel scorpion toxins. Pharmacological investigations conducted with β adrenoreceptors (β AR) general or selective antagonists or agonists, suggested that the lipolytic action of venom and LVP1 was mainly achieved through a β AR pathway involving more specifically the β 2/ β 1 adrenoreceptor subtypes^{14,15}. In the present report, we describe the isolation and the characterisation of an other non toxic lipolysis activating protein LVP2. Characterization of such protein was based on its pharmacological properties: a potent ability to increase adipocyte lipolysis and an ability to compete with β AR radio-ligands for binding adipocyte plasma membrane in agreement with our previous results, suggesting an involvement of a β AR-type pathway for lipolysis activation by venom¹⁴ and LVP1¹⁵.

MATERIALS AND METHODS

SCORPION VENOM

Venom from the scorpion *Butbus occitanus tunetanus* (Bot) was obtained by electrical milking of field-collected scorpions in the Veterinarian Laboratory of Institut Pasteur of Tunis.

PURIFICATION PROCEDURE

Bot crude venom was water extracted, then submitted to gel filtration chromatography on Sephadex G50 columns; three fractions (I, II and III) were resolved¹⁴. HPLC purification of descending flank fraction I (Id) was performed with Beckman Series 125 pump and Beckman diode array detector set at 214 and 280, which was controlled by GOLD software. For HPLC, Buffer A was 0.1 % trifluoro-acetic acid in water; Buffer B was 0.1 % trifluoro-acetic acid in acetonitrile. The first step consisted of semi-preparative high pressure liquid chromatography, carried out onto 10 x 250 mm column prepared with ultraspher octyl, 5 μ m (Beckman). The sub-fractions 1, 2, 3 and 4 of fraction Id were eluted at 2 ml.min⁻¹ in a gradient of Buffer B in A from 34 to 37 % for 15 min (Figure 1 A). Fraction 3 was loaded onto analytical C18 reverse phase HPLC column (5 μ m 4.6 x 250, Beckman). The proteins of fraction 3 were eluted from the column using a gradient of Buffer B in A from 10 to 50 % for 50 min (Figure 1 B).

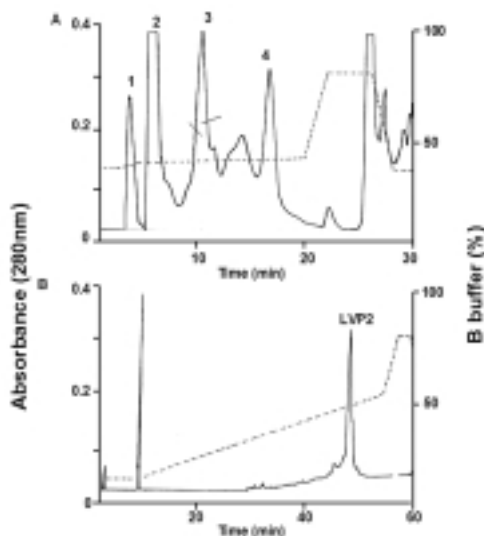


Figure 1. Reverse-phase HPLC LVP2 purification

(A) Sephadex-G50 fraction Id was resolved on a C8 semi-preparative column (Beckman, 5 μ m; 10 x 250 mm) in gradient of buffer B in A from 34 to 37 % in 15 min at a flow rate of 2 ml/min. Fraction 3 and 4 are collected at 10 and 16 min, respectively.

(B) LVP2 was purified from fraction 3 on an analytical C18 column (Beckman, 5 μ m; 4.5 x 250 mm) with a gradient of buffer B in A from 10 to 50 % in 50 min and collected at 57 min.

POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS AND ISOELECTRO-FOCUSING

The homogeneity and the apparent mass of the purified protein were determined by SDS-PAGE, according to the method of Laemmli¹⁶ and using 15 % polyacrylamide gel stained with coomassie blue. An appropriate molecular weight (MW) standard kit (BioLab) was used. Analytical isoelectric focusing was performed in phast gel IEF 3-9 using the Phast System (Pharmacia-LKB).

PROTEIN ASSAY

Protein concentration was measured by the BCA protein assay (Pierre Chemical Co.) using bovine serum albumin (BSA) as a standard¹⁵.

REDUCTION AND ALKYLATION OF PROTEIN

Reduction and alkylation of LVP2 were performed as previously described¹⁵; the S-alkylated proteins were desalted on a RP-C18 column (5 μ m, 46 x 250 mm) using a Beckman HPLC.

NH₂-TERMINAL AMINO-ACID SEQUENCE ANALYSIS AND SEQUENCE SIMILARITY SEARCH OF LVP2

Sequence analyses of S alkylated proteins were achieved by performing 15 cycles of automated Edman degradation in Applied Biosystems 476 A protein sequencer. Samples were deposited onto Biobrene-precycled glass-fibre discs.

MASS SPECTROMETRY

Samples were analysed on a Voyager DE RP MALDI-TO-TOF mass spectrometer (Perspective Biosystems, Inc., Framingham, MA) as previously described¹⁵. Mass spectra recorded in linear mode were externally calibrated with suitable standards and then analysed using the GRAMS/386 software.

TOXICITY TEST:

Purified fractions were tested for in vivo toxicity on 20 \pm 2g C57/Black male mice by intra-cerebro-ventricular (ICV) injection of 5 μ l of a solution containing increasing amounts of the proteins diluted in 0.1 % (W/V) BSA. Six mice were used for each concentration; the ICV being the most sensitive route for studying scorpion toxins in mammals.

ELISA CHARACTERISATION

ELISA tests were used to check the cross-antigenicity of LVP2. Wells of a 96-well Nunc plates were coated for 90min at 37°C with 100 μ l of 5 μ g/ml dilutions of

LVP2 in 0.1 M sodium carbonate, pH 9.6. After washing with 0,05% Tween/0,9% NaCl, the blocking solution (0,5% BSA in 50mM sodium phosphate, 130 mM NaCl, pH 7,4) was added (1h, 37°C). After six washes, the different dilutions of rabbit serum anti-AahI, anti-AahII, anti-AahIT, anti-LqhIT and anti-BotI in (50 mM sodium phosphate, 130 mM NaCl, pH 7,4) were added (90min, 37°C). Peroxidase-coupled anti-rabbit IgG (Sigma, diluted 1/1000) was then added (60min, 37°C). The wells were washed and peroxidase activity detected using 200 μ l of *O*-phenylene diamine solution (0,4mg ml⁻¹ in sodium citrate, pH5.2, in the presence of 0,04% hydrogen peroxide). The reaction was stopped by adding 50 μ l 1M sulphuric acid and absorbance values at 492 nm were registered with a Titertek Multiscan MCC/340.

ISOLATION OF ADIPOCYTES AND CRUDE MEMBRANE PREPARATION

Peri-epididymal white adipose tissue was obtained from Wistar male rats (200 to 250 g) after an overnight fasting and dissection into small fragments (20-30 mg). Fat cells were prepared for lipolysis or membrane binding studies as previously described^{14,15}. Lipolysis measurements were performed as previously described^{14,15}. The glycerol release into the incubation medium was determined by the fluorometric adaptation of Wieland's method¹⁷. For membrane preparation, adipocytes were lysed at room temperature in hypotonic medium containing the following protease inhibitors: 10 μ g ml⁻¹aprotinine, pepstatin and leupeptin, then centrifuged for 15 min at 40000 x g at 15°C¹⁸. The pellet was washed two times in binding buffer (50 mM Tris, 0.5 mM MgCl₂ and 1 mM ascorbic acid pH 7.5) and again centrifuged. The resulting pellet was resuspended in buffer to a final concentration of 1-2 mg protein.ml⁻¹ and used immediately for binding analysis or frozen at -80°C and used within a week.

BINDING STUDIES

The binding buffer containing 20 μ l ligand and 50 μ l crude membranes (equivalent to 50-80 μ g protein) was added to obtain a final volume of 400 μ l. Competition studies were performed with 5 nM [³H]-CGP 12177¹⁹ and increasing concentrations of competitors. The mixture was incubated in a shaking water bath at 25°C for 1h. The reaction was stopped by adding 4 ml of cold binding buffer, immediately fol-

lowed by filtration under vacuum through Whatman GF/C glass-fibre filters (Midstone, U.K.), using a millipore apparatus (Bedford, MA, USA). Filters were rapidly washed with 15 ml cold binding buffer²⁰.

The membrane bound radio-labelled ligand trapped by filters was measured using a liquid scintillation counter (LS6000SC, Beckman, U.S.A). In saturation experiments, non specific binding was determined in the presence of 100 μ M of non labelled CGP 12177 in parallel incubation.

RESULTS AND DISCUSSION

Based on the ability of *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) venom and LVP1^{14,15} to induce adipocyte lipolysis, as previously described, LVP2 was purified in two steps (Figure 1). Fraction I descending flank (Id) from Sephadex-G50 filtration was retained for further purification since it carries the almost whole lipolytic activity. This fraction was then resolved on a C8 semi-preparative HPLC (Figure 1 A) that gave several peaks among which peaks 3 and 4 activated adipocyte lipolysis. As for LVP1 purification from peak 4, and using analytical a C18 columns, LVP2 was eluted at a fixed retention time of 57 min and obtained in single molecular species (as shown in Figure 1 B).

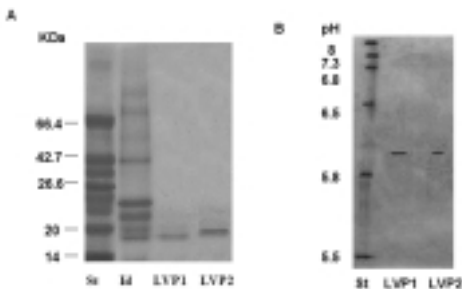


Figure 2. Electrophoretic characterization of LVP2 (A) SDS-PAGE was performed in gel 15 %. Standards molecular weight (St); Fraction I (I); Fraction I descending flank (Id); LVP1 and LVP2. (MW) were serum albumin bovine (66.4 KDa), triphosphate isomerase (26.6 KDa), trypsin inhibitor (20 KDa) and lysozyme (14.3 KDa).

(B) Isoelectric focusing of LVP2, IEF standard pH (3-9) was used. The gels were stained with coomassie brilliant blue.

LVP 2 is represented in Bot venom at 2% of extracted proteins. This percentage is in the same range as those previously reported for LVP1 (1%) and for Na⁺

channel scorpion toxins present in Bot venom 28. Further characterization of LVP2 was performed by SDS-PAGE analysis and compared to sub-fractions derived from fraction I after sephadex-G50 purification step (I, Ia, Id). LVP2 migrated as a single band and were present only in the fraction Id (Figure 2 A). Their estimated molecular weights was within 16 to 17 KDa in the same range as for LVP1. The homogeneity of LVP2 was thus assessed by SDS-PAGE and further confirmed by isoelectrofocusing, since a single band having an isoelectric point of pH6, was detected for LVP2, as previously obtained for LVP115 (Figure 2 B).

Reduction and alkylation of LVP2 followed by HPLC separation revealed a dimeric structure (Figure 3). In both cases, the α and β chains appeared to be different since they migrated separately on a C18 analytical column. LVP2 is thus an heterodimeric protein. These results were confirmed by mass spectrometry and the average molecular mass (M-H)⁺ for native LVP2 was determined to be 16889 Da. Thealdi-tof determined molecular masses of α and β chains are of 8822 Da and 8902 Da, respectively.

The mass differences between native LVP2 and the sum of reduced and alkylated α and β chains suggested that each chain contains 4 half cysteins.

These residues may be involved in either intra- or inter-chain disulfide bridges. This differed from the findings for LVP1 in which both chains contain 7 half cysteins^{14,15}.

Unexpectedly, despite a similarity in biological activity, LVP1 and LVP2 may present a significant structural difference.

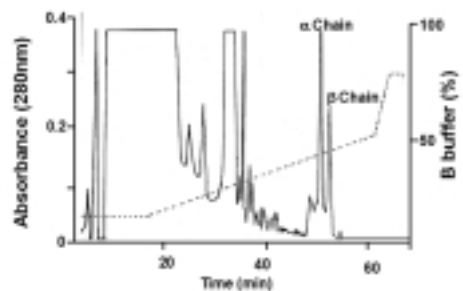


Figure 3. Purification of α and β chains of LVP2 The column C18 (4.5 x 250 mm) was eluted with linear gradient of 10-50 % buffer B in A in 50 min. Chains α and β of LVP2 were eluted at 53 and 55 min, respectively.

The purity was further assessed for LVP2 using the automatic Edman degradation of both S-pyridyethylated LVP2 α and β chains. The sequencing was proceeded with a yield of 91 % during 19 and 10 cycles for α and β subunits, respectively, and led to the identification of the corresponding residues.

A search for protein similarity to LVP2 α (DDYQPF-GEHNYYGKKAQTD) and β (FTPKNYPKN) was performed with BLAST analysis²¹ database program. No significant similarity with any proteins in nR data bank was detected.

Antigenic homologies between LVP2, in one side and AaH1, AaH2, AaH3, AaH4, LqhIT and BotI on the other side, were tested using specific anti-AaH1, anti-AaH2, anti-AaH3, anti-AaH4, anti-LqhIT and anti-BotI sera. No significant binding of anti-BotI on LVP2-coated plates was observed. LVP2 partially cross reacted with the toxin LqhIT but seemed to be more antigenically related to AaH1, AaH2 and AaH3 (Figure 4A). These results indicated that LVP2 shares some epitopes with anti-AaH1, anti-AaH2 and anti-AaH3. Reduction and alkylation of LVP2 increased the reactivity with anti-AaH1 and anti-AaH2 (Figure 4B), suggesting the presence of homologous continuous sequential epitopes.

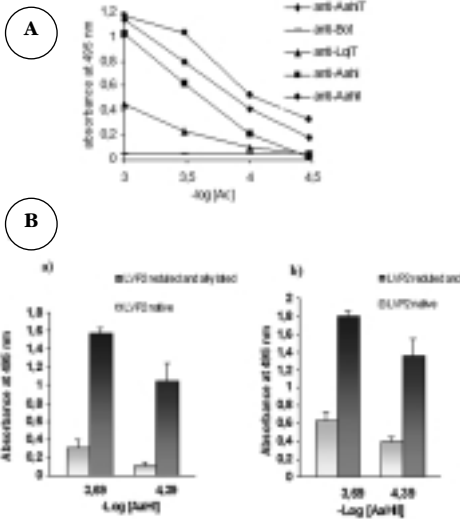


Figure 4. Immunochemical characterization (A) Binding of anti-AaH1, AaH2, anti-AaH3, anti-LqhIT and anti-Bot on LVP2 at 5µg/ml absorbed on plates. (B) Binding of anti-AaH1 (a), AaH2 (b) on LVP2 native and LVP2 after reduction and alkylation. Elisa tests were conducted as described in Materials and Methods.

As we have previously demonstrated in freshly dissociated rat adipocytes, Bot venom and LVP1 enhanced lipolysis 3 to 4 fold over the basal level. The half effects (EC50) of Bot venom and LVP1 occurred at 12 µg/ml and 1±0.5 µg/ml, respectively¹⁴. In the present study, as shown in Figure 5 A, LVP2 stimulated lipolysis in a dose-dependent manner with a maximum effect observed at 5 µg/ml. The deduced EC50 was 2±0.75 µg/ml. Considering all the above elements, it can be concluded, as for LVP1, that LVP2 is roughly ten fold more active than crude venom. No significant lipolytic effect could be detected over the basal level using up to 5 µg/ml of α and β chains of LVP2. The full expression of LVP2 lipolytic activity is thus dependent on its structural dimeric integrity.

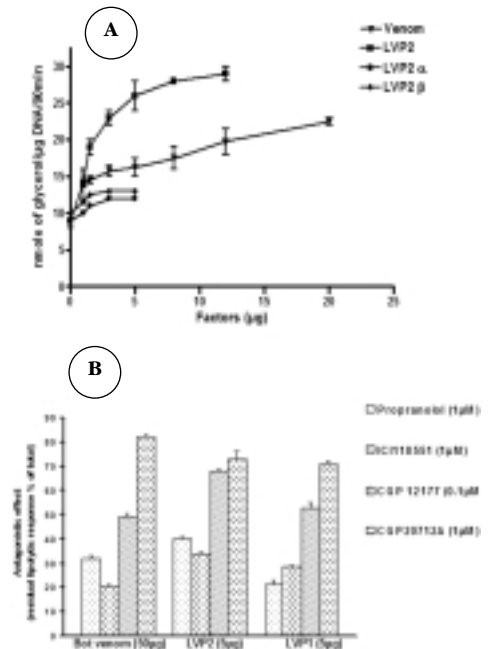


Figure 5. Effect of LVP2 and their α and β chains on lipolysis (A) Activation of adipocyte lipolysis: dose response curve. Lipolysis was estimated by glycerol release in the incubation medium. (B) Comparative effects of some antagonists on lipolysis induced by Bot venom, LVP2 and LVP1. The data values are means + SE of 3-5 separate experiments performed in triplicate. The lipolytic response represents the lipolysis induced by Bot venom or LVP1 without antagonist expressed in nmol. of glycerol released in the medium /µg of cell DNA/90min minus basal lipolysis (11±1 nmol./µg DNA/90min).

It was previously demonstrated that lipolytic activity of Bot venom and LVP1 is largely mediated through the β AR pathway, with a likely preferential involvement of β_2 AR^{14,15}. A comparative analysis on the effects of some β antagonist agents on rat adipocyte lipolysis induced by LVP1 and LVP2, was then performed. The general antagonist propranolol at 10^{-6} M abolished, with the same order of magnitude, lipolysis induced either by LVP1 or LVP2 (Figure 5B). Lipolysis induced by either LVP also appeared to be preferentially mediated through β_2 adreno-receptor subtype since a maximum inhibitory effect was obtained using ICI 118551 at 10^{-6} M, a selective β_2 AR antagonist. The antagonistic effect was less efficient when using CGP 12177 (β_1/β_2 antagonist and β_3 agonist at higher concentration $\geq 10^{-7}$ M) whereas CGP 20712A, a β_1 antagonist, was poorly active at 10^{-6} M. Altogether, these results indicate that LVPs may support the whole lipolytic activity of Bot venom and orient towards the involvement of a β_2 AR pathway in the lipolytic response.

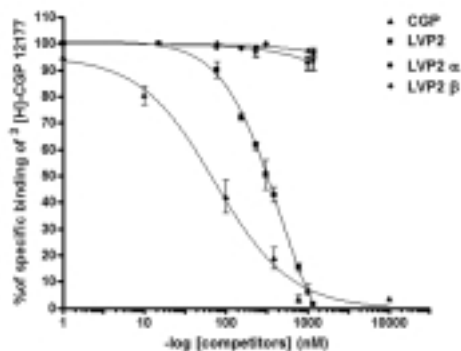


Figure 6. Effect of LVP2 and their α and β chains on $[^3\text{H}]$ -CGP 12177 binding sites of white adipocyte membranes. Competition dose response curve for specific $[^3\text{H}]$ -CGP 12177 (5 nM) binding to white rat adipocyte membrane. The data result are means \pm SEM of 3 experiments performed in duplicate and expressed as percentage of specific binding in the absence of competitor. The non specific binding defined in the presence of 100 μM CGP 12177 reaches about 40 % of total binding.

To further investigate whether the lipolytic activity of LVP2 could be related to an implication of β AR, increasing concentrations of LVP2 were tested for their ability to compete with specific binding of $[^3\text{H}]$ -

CGP 12177 to adipocyte plasma membrane. Figure 5 B shows a comparative binding study using 5 nM of $[^3\text{H}]$ -CGP 12177 in presence of LVP2 and their subunits as competitors. The concentrations giving a half inhibition of radio-ligand binding (IC_{50}) were 74 ± 3 and 421 ± 2 nM for CGP12177 and LVP2, respectively. As for lipolytic activity, α and β chains of LVP2 did not induce any significant effect. This suggests that the active site for lipolysis activation involves a structural organization necessitating the two subunits. Thus, it is probably a conformational site.

We report here the isolation and the characterization from Bot of a second non toxic protein that activates lipolysis in adipocyte. The heterodimeric structure of this protein is a particularity among the commonly characterized scorpion toxins. Furthermore, LVP2 is a heterodimeric molecule whose biological activity is dependent on the structural dimeric integrity.

Triacylglycerols, stored as lipid droplets in white adipocytes, represent a large energy store in mammals whose energy is released from fat cells in the form of free fatty acids. Multiple hormones and receptors are involved in the cellular responses and the balance between lipogenesis and lipolysis in adipocytes^{22,23}. Among others, these include lipolytic agents like β -adrenergic agonists and anti-lipolytic factors such as insulin or adenosine. The major pathway leading to lipolysis is the activation of adenylate cyclase. The resulting increase in intracellular cAMP leads to the dissociation of PKA, whose free catalytic subunits phosphorylate, among other substrates, HSL and perilipin A²⁴. The phosphorylation of HSL leads to enhanced hydrolytic activity, translocation from cytosol to the lipid droplet surface and subsequent release of free fatty acids and glycerol²⁵. The lipolytic response to LVP2 could be exerted, at least in part, through the β AR pathway, with some experimental evidence for a preferential involvement of β_2 AR subtype.

At present, it is difficult to provide a clear description of the structure/activity relationship among LVPs and specific receptors sites which have to be deciphered. However, these proteins constitute valuable tools for understanding the molecular events that result from the interaction with adipocyte membrane leading to hormone sensitive lipase activation with glycerol and fatty acids releases.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is supported in part by CMCU project (N°02/F0917) and by PACA region MRST financial support. The authors wish to address their warm thanks to Dr Mabrouk K. (Laboratoire d'Ingénierie des Protéines, CNRS, Faculté de Médecine Nord, Marseille, France) for the mass determination of LVP2 by mass spectrometry, to Prof Mechmech R. Dean of Faculty of Medicine of Tunis and to Prof. Dellagi K. Head of Institut Pasteur of Tunis.

REFERENCES

- 1- **S. Cestele, M. Stankiewicz, P. Mansuelle, M. De Waard, B. Dargent, N. Gilles, M. Pelhate, H. Rochat, M.F. Martin-Eauclaire and D. Gordon** (1999). Scorpion alpha-like toxins, toxic to both mammals and insects, differentially interact with receptor site 3 on voltage-gated sodium channels in mammals and insects. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 975-85.
- 2- **S. Zhu, F. Bosmans and J. Tytgat** (2004). Adaptive evolution of scorpion sodium channel toxins. *J. Mol. Evol.*, **58**, 145-53.
- 3- **J. Tytgat, T. Debont, K. Rostoll, GJ. Muller, F. Verdonck, P. Daenens, JJ. van der Walt and LD. Possani** (1998). Purification and partial characterization of a 'short' insectotoxin-like peptide from the venom of the scorpion *Parabuthus schlechteri*. *FEBS. Lett.*, **441**, 387-91.
- 4- **J.D. McCann, J. Matsuda, M. Garcia, G. Kaczorowski and MJ. Welsh** (1990). Basolateral K⁺ channels in airway epithelia. I. Regulation by Ca²⁺ and block by charybdotoxin. *Am. J. Physiol.*, **258**, L334-42.
- 5- **I. Lopez-Gonzalez, T. Olamendi-Portugal, JL. De la Vega-Beltran, J. Van der Walt, K. Dyason, LD. Possani, R. Felix and A. Darszon** (2003). Scorpion toxins that block T-type Ca²⁺ channels in spermatogenic cells inhibit the sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **300**, 408-14.
- 6- **CQ. Xu, LL. He, B. Brone, MF. Martin-Eauclaire, E. Van Kerkhove, Z. Zhou and CW. Chi.** (2004). A novel scorpion toxin blocking small conductance Ca²⁺ activated K⁺ channel. *Toxicon*, **43**, 961-71.
- 7- **H. Jager and S. Grissmer** (2004). Characterization of the outer pore region of the apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ channel rSK2. *Toxicon*, **43**, 951-60.
- 8- **LD. Possani, B. Becerril, M. Delepierre and J. Tytgat** (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur. J. Biochem.*, **264**, 287-300.
- 9- **Y. Xiao and S. Liang** (2003). Inhibition of neuronal tetrodotoxin-sensitive Na⁺ channels by two spider toxins: hainantoxin-III and hainantoxin-IV. *Eur. J. Pharmacol.*, **477**, 1-7.
- 10- **G. Nicastro, L. Franzon, C. de Chiara, AC. Mancin, JR. Giglio and A. Spisni** (2003). Solution structure of crostamine, a Na⁺ channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1969-79.
- 11- **B. Mahjoubi-Boubaker, M. Crest, RB. Khalifa, ME. Ayeb and R. Kharrat** (2004). Kbot1, a three disulfide bridge toxin from *Buthus occitanus tunetanus* venom, highly active on both SK and Kv channels. *Peptides*, **25**, 637-45.
- 12- **N. Zhang, M. Li, X. Chen, Y. Wang, G. Wu, G. Hu and H. Wu** (2004). Solution structure of BmKK2, a new potassium channel blocker from the venom of chinese scorpion *Buthus martensi Karsch*. *Proteins*, **55**, 835-45.
- 13- **M.F. Martin Eauclaire and F Couraud** (1995). Hand book of Neuro-toxicology, Marcell and Dekker, New York, 683-716.
- 14- **S. Drira-Chaabane, M. El Ayeb, J. Torresani and J. Gharbi-Chihi** (1996). Lipolytic action of *Buthus occitanus tunetanus* venom: involvement of the beta adrenergic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226** (1), 280-286
- 15- **N. Soudani, J. Gharbi-Chihi, N. Srairi-Abid, C. Martin-El Yazidi, R. Planells, A. Margotat, J. Torresani, M. El Ayeb** (2005). Isolation and molecular characterization of LVP1 lipolysis activating peptide from scorpion *Buthus occitanus tunetanus* venom. *Biochemica Biophysica Acta*, **1747**, 47-56
- 16- **U.K. Laemmli** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (259), 680-685.
- 17- **O.H. Wieland** (1983). The mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structure and regulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **96**, 123-170.

- 18- **M. Rodbell** (1964) . Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J. Biol. Chem.*, **239**, 375-380.
- 19- **G. Tavernier, J. Galitzky, P. Valet, A. Remaury, A. Bouloumie, M. Lafontan and D. Langin** (1995) . Molecular mechanisms underlying regional variations of catecholamine-induced lipolysis in rat adipocytes. *Am. J. Physiol.*, **268** (6 Pt 1), E1135-1142.
- 20- **C. Carpene, M.C. Rebourcet, C. Guichard, M. Lafontan and M. Lavau** (1990) . Increased alpha 2-adrenergic binding sites and antilipolytic effect in adipocytes from genetically obese rats. *J. Lipid. Res.*, **31** (5), 811-819.
- 21- **S.F. Altshul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman** (1997) . Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402.
- 22- **C. Holm, T. Osterlund, H. Laurell, J.A Contreras** (2000) . Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu. Rev. Nutr.*, **20**, 365-93.
- 23- **C. Londos, D.L. Brasaemle, C.J. Schultz, D.C Adler-Wailes, D.M Levin, A.R. Kimmel, C.M Rondinone** (1999) . On the control of lipolysis in adipocyte. *Ann. NY. Acad.*, **892**, 155-68.
- 24- **A.S. Greenberg, WJ Shen, K. Muliro, S. Patel, S.C. Souza, R.A .Roth, F.B. Kraemer** (2001) . Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, **276**, 45456-61.
- 25- **C. Holm** (2003) .Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive and lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1120-4.

HIGH ANDROGEN RECEPTOR IMMUNOEXPRESSION IN HUMAN “SERTOLI CELL ONLY” TESTIS

L.HADJKACEM LOUKIL¹, T. SELLAMI BOUDAWARA²,
I.LAYADI¹, A. BAHLOUL³, R. JLIDI², H.AYADI¹ AND L. AMMAR KESKES^{1*}.

¹ Laboratoire de Génétique Moléculaire Humaine, Faculté de Médecine, Sfax, Tunisie.

² Laboratoire d'anatomie pathologie, CHU Hôpital Habib Bourguiba, Sfax, Tunisie.

³ Unité de recherche US 17, CHU Hôpital Habib Bourguiba, Sfax, Tunisie.

* Corresponding author

E-mail : lkeskes@yahoo.fr

RESUME

Notre objectif était d'évaluer la distribution cellulaire du récepteur aux androgènes (RA) et son intensité de marquage dans les testicules d'hommes azoospermiques. Trente six biopsies sont immunomarquées en utilisant un anticorps monoclonal du RA humain. La localisation et l'intensité de marquage du RA ont été évaluées chez les testicules présentant des cellules de Sertoli uniquement (G1, n=21), dans les testicules ayant un blocage de la spermatogenèse (G2, n=11) et dans les testicules histologiquement normaux (G3, n=4). Nous avons trouvé un marquage du RA dans les cellules de Sertoli, les cellules péritubulaires et les cellules de Leydig, mais il était absent dans les cellules germinales. L'intensité du marquage a varié entre les trois groupes d'étude. L'immunomarquage du RA des cellules de Leydig et de Sertoli est plus élevé dans le groupe G1 (score et intensité) que dans les autres groupes. Pour les cellules de Sertoli, les moyennes du score d'immunomarquage du RA sont respectivement de 20 ± 2.36 , 10.18 ± 1.0 et 1 ± 1 , pour les groupes G1, G2 et G3. Pour les cellules de Leydig, les moyennes respectives du score sont de 10.24 ± 1.37 , 6 ± 0.71 et 0 , pour les groupes G1, G2 et G3. Nous avons trouvé des différences significatives entre G1 et G2 ($p=0.0008$), entre G1 et G3 ($p=1.54 \cdot 10^{-7}$) et entre G2 et G3 ($p=0.00032$). Ces résultats montrent que le RA est localisé dans les cellules somatiques et que son expression est plus élevée dans les testicules présentant le syndrome «SCO» que ceux histologiquement normaux ou ayant un blocage de spermatogenèse.

Mots clefs : Récepteur aux androgènes, testicules, cellules de Sertoli, immunohistochimie.

ABSTRACT

Our purpose was to evaluate cellular androgen receptor (AR) distribution and intensity of immunostaining in the human azoospermic testis. Thirty six biopsy specimens from azoospermic men were immunostained, using a monoclonal antibody of human AR. The localization and the intensity of AR immunostaining was evaluated in Sertoli Cell Only (SCO) testis (G1, n=21), in spermatogenesis arrest testis (G2, n=11) and in histologically normal testis (G3, n=4). We found an AR immunostaining in Sertoli, peritubular myoid and Leydig cells, but not in germ cells. The intensity of the immunostaining varied substantially between biopsy specimens of different patients. Sertoli and Leydig cells AR immunostaining (score and intensity) in SCO group was higher than in the other groups. For Sertoli cells, the score means of AR immunoreactivity were 20 ± 2.36 , 10.18 ± 1.0 and 1 ± 1 , for G1, G2 and G3 groups, respectively. For Leydig cells, the score means were 10.24 ± 1.37 , 6 ± 0.71 and 0 , for G1, G2 and G3 groups, respectively. We found significant differences between G1 and G2 ($p=0.0008$), between G1 and G3 ($p=1.54 \cdot 10^{-7}$) and G2 and G3 ($p=0.00032$). These results suggest that in the testis AR is located exclusively in somatic cells and its expression is higher in SCO syndrome than in normal and in arrest spermatogenesis testes.

Key words: Androgen receptor, testis, Sertoli cells, immunohistochemistry.

INTRODUCTION

Androgens play a crucial role in the development of male reproductive organs. Furthermore, they are needed for puberty, male fertility and male sexual function. Androgens are essential for the maintenance of normal spermatogenesis in the testis and the inhibition of germ cell apoptosis¹. The mechanism by which androgens regulate the spermatogenic process is not fully understood. In the mammalian testis, including that of humans, it is clear that paracrine regulation between spermatogenesis and steroidogenesis, occurs via the androgen receptor (AR) located in the nuclei of somatic cells^{2,3,4,5,6}. It has been assumed that the major cellular mediator of this regulatory function of AR is the Sertoli cell, based on its intimate contact with germ cells and stage-specific AR expression^{7, 8}. In mouse, Sertoli cell AR function is required for the maintenance of adhesion of round spermatids during their differentiation into elongated spermatozoa⁹.

Immunopositive AR levels vary widely between species and from one study to another. Whereas recent studies raised the intriguing possibility that some germ cells may exhibit immunoreactive AR^{10, 11}, other reports point out to testicular somatic cells as the exclusive androgen target cells in the testis^{6, 12}. Leydig cells in mice, for example, exhibit strong AR immunostaining, but express only limited and infrequent AR immunoreactivity in rats^{5, 6, 13}. AR staining in rodent Sertoli cells appears to depend on the cycle of the seminiferous epithelium^{4, 6}. In human, immunopositive AR levels would also appear to vary according to the cycle of the spermatogenesis¹⁴.

In the present investigation, AR expression was evaluated in human infertile testes, using immunohistochemistry method in order to determine its distribution in the different type of cells and its relation with clinical and histological parameters. We found that AR is located exclusively in somatic cells and that its expression is higher in testes completely depleted of germ cells, corresponding to "Sertoli cell only" (SCO) syndrome than in normal or in arrest spermatogenesis testes.

MATERIALS AND METHODS

TISSUE COLLECTION

Testes biopsies were collected from the histopathology department of the Habib Bourguiba hospital at Sfax. They have been performed in 36 azoospermic

men whom did not receive antiandrogens, nor chemotherapy, or other drug treatment known to exert an effect on testicular histology, before surgery. For AR immunostaining, the testicular tissue was fixed with formalin and processed for routine paraffin embedding. The 36 testes were divided in three groups according to the histological phenotype. The first group (G1) was composed by patients who have SCO syndrome, characterized by the presence of Sertoli cells line only in the seminiferous tubules (n = 21). The second group (G2) was composed by patients who have spermatogenesis arrest (n = 11). In the third group (G3), the majority of seminiferous tubules, interstitial spaces and spermatogenesis appeared normal (n = 4).

IMMUNOCYTOCHEMISTRY

Five-micrometer sections attached on silanized slides were dewaxed in xylene, rehydrated in graded ethanol, and heated in a microwave oven in 10 mM citrate buffer (pH 6) for 15 min at 750 W (from the boiling point). They were then incubated for 15–30 min with the primary antibody against AR, a mouse monoclonal antibody purchased from DAKO (anti-human androgen receptor made to a synthetic peptide corresponding to amino-acids 229-315). Immunobinding of anti-AR was visualized with biotin-labeled secondary antibodies and streptavidine-peroxidase complexes using diaminobenzidine as a chromogenic substrate (LSAB system; DAKO). The sections were counterstained for approximately 30 seconds with hematoxylin and then examined with an optical microscope.

SCORING OF IMMUNOSTAINING AND COMPARISON BETWEEN GROUPS

After identification of immunopositive cell types in each testis specimen, the AR staining was scored with regard to the approximate percentage of positive Sertoli and Leydig cells and relative immunostaining intensity using Khabir et al method¹⁵. The percentage of positive cells (Sertoli and Leydig cells, separately), was grade as: 0 (none); 1 (1-25% positive cells); 2 (26-50%); 3 (51-75%) and 4 (76-100%). Immunostaining intensity was rated as 0 (none); 1 (weak); 2 (moderate) and 3 (intense) by visual inspection. When slide exhibited heterogenous distribution of immunoreactivity, we divided it in area according to the intensity of immunostaining. The score of this division was: 1

(25% of slide); 2 (50%); 3 (75%) and 4 (100%). For example, when in 50% of slide (2), 90% of cells (4) exhibited weak intensity (1); in 25% of slide (1), 90% of cells (4) showed moderate intensity (2) and in 25% of slide (1), 60% of cells (3) showed weak intensity (1), the final score was $(2 \times 4 \times 1) + (1 \times 4 \times 2) + (1 \times 3 \times 1) = 19$. The maximal possible score was 48 for each type of cells. After scoring all samples, we calculated the mean score for each group.

Comparison between all groups was performed using Fisher and Student statistical tests. Significance was concluded for p values $< 5\%$.

RESULTS

For the 36 azoospermic men testes, the appearance of collagen structures within the interstitial tissue appeared normal, and no evidence of oedema in the interstitial space was noted. Leydig cells were present as either single cells or nests, without any evidence of abnormal morphology. In some cases, hyperplasia of Leydig cells was noted.

AR IMMUNOEXPRESSION

In the azoospermic men testis sections, specific immunostaining was detected exclusively in the nuclei of Sertoli cells, Leydig cells, and peritubular myoid cells (Fig. 1). No immunostaining was observed in germ cells (fig. 2B).

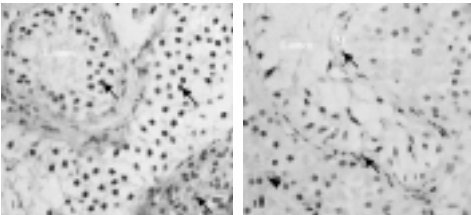


Figure 1: AR localization in SCO testis. In 1A, AR immunostaining in the nuclei of Sertoli cells (arrows) and in the nuclei of Leydig cells (L) (arrowhead). Sertoli cell (S) nuclei exhibit strong AR immunostaining intensity. 1B shows AR immunostaining in myoid cells (M) (arrows) and cytoplasmic immunostaining (arrowheads) in Leydig cells.

In SCO patient's specimens, the intensity of the AR immunostaining was stronger in the Sertoli cell nuclei than in the Leydig cell nuclei (Fig. 1A). The score means were 20 ± 2.36 and 10.24 ± 1.37 for Sertoli and Leydig cells, respectively. Cytoplasmic AR immunos-

taining was never observed in Sertoli cells, nor detected in the germ cells. In contrast, cytoplasmic AR immunostaining was observed in Leydig cells of some specimens (Fig 1B), in addition to nuclei immunostaining. Within the same seminiferous tubule cross-sections it was possible to detect a variation in the AR immunostaining intensity between different Sertoli cell nuclei.

In the four testes with normal spermatogenesis, very weak or no immunostaining was detected in Sertoli and Leydig cells (Fig. 2A). The score means were 1 ± 1 and 0 for Sertoli and Leydig cells, respectively.

The majority of Sertoli cells found in seminiferous tubules from in arrest spermatogenesis testes exhibited a moderate AR immunostaining intensity homogeneously distributed throughout the nuclei; in few nuclei, the staining was weak (Fig. 2B). In the nuclei of the Leydig cells, the staining appeared less strong than in the Sertoli cell nuclei. The score means were 10.18 ± 1 and 6 ± 0.71 for Sertoli cells and Leydig cells respectively.

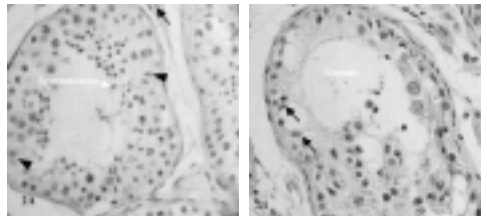


Figure 2: AR immunoreactivity in testes having normal spermatogenesis (2A) and in arrest spermatogenesis (2B). 2A shows no immunostaining in Sertoli cells (S) (arrowheads) and in Leydig cells (L) (arrows). In 2B, weak and moderate AR immunostaining in the nuclei of Sertoli cells (S) (arrows) in testis having spermatogenesis in arrest.

COMPARISON BETWEEN GROUPS

The comparison of score means in three groups showed significant differences between all groups for Sertoli cells and Leydig cells (Table I and II).

Table I: Means and SD of AR immunoreactivity scores in Sertoli and Leydig cells in all studied groups.

	Sertoli cells	Leydig cells
G1 (n=21)	20 ± 2.36	10.24 ± 1.37
G2 (n=11)	10.18 ± 1.07	6 ± 0.71
G3 (n=4)	1 ± 1	0.0

Table II: P values obtained by comparing the score means of AR immunoreactivity found in each group.

	P v a l u e	
	Sertoli cells	Leydig cells
G1 vs G2	0.08 10-2	0.01
G1 vs G3	0.015 10-5	0.032 10-5
G2 vs G3	0.032 10-2	0.076 10-4

DISCUSSION

There is ample documentation supporting the hypothesis that androgens are needed to complete normal spermatogenesis in all species studied, but understanding androgen regulation of spermatogenesis remains enigmatic. The effects of androgens are mediated by androgen receptor. In this study, we used a highly sensitive immunohistochemical assay to determine testicular cell types exhibiting immunopositive androgen receptor in three azoospermic human testis groups (SCO, normal and in arrest in spermatogenesis). We found that the expression of AR was limited to somatic cells (Sertoli, Leydig and peritubular cells) for all groups and no expression was seen in germ cells. These results are in accord with those reported in several prior studies in the human^{3, 12, 16, 19} and in the rat and mouse testis^{5, 6, 18, 8}, showing that only Sertoli, Leydig and peritubular myoid are AR immunoreactive, and no AR was detected in germ cells. But, using a polyclonal antibody, Kimura et al found that immunoreactive AR was restricted to the nuclei of various human tissues, including spermatogonia, spermatocytes, Sertoli cells and Leydig cells¹⁰. We found a significant difference between SCO, in arrest spermatogenesis and normal spermatogenesis testes. In fact, the expression of AR in the testis depends on the status of spermatogenesis and paracrine interaction between germ and Sertoli cells affects the expression of AR on Sertoli cells. In the absence of germ cells (SCO), Sertoli cells exhibit a high expression of AR, suggesting that germ cells exert a regulatory effect on this expression which could be mediated by paracrine or endocrine factors. Data in the literature suggest positive regulation of Sertoli cell AR protein by follicle-stimulating hormone (FSH) and androgens¹⁹. Responses of Sertoli cells to stimulation by androgens or FSH in humans would depend upon information transmitted from neighbouring germinal cells at specific stages of the cycle

of the seminiferous epithelium²⁰. The higher AR immunostaining in Sertoli and Leydig cells found in G1 rather in G2 and G3 could be explained by the existence of a stimulatory effect of the high rate of circulating FSH in SCO patients. Eight of our SCO patients had serum FSH greater than 12 mUI/ml (data not shown). However, in patients with oligozoospermia, Van Roijen JH et al found no correlation between the intensity of testis AR immunoreexpression in either Sertoli cells or peritubular myoid cells and the spermatogenic adequacy as measured by the method of Johnsen¹². This author suggested that immunodetectability of the AR is not related to the status of the spermatogenic epithelium and concluded that inappropriate expression of the AR is neither a cause nor a consequence of idiopathic infertility. In the mouse testis, Zhou et al showed that Sertoli cell expression of AR occurs in a stage dependant manner⁸.

In conclusion, this study demonstrates that immunoreexpression of AR in Sertoli cells in human testis is dependent on spermatogenesis pattern and that the lack of germ cells in SCO testis is associated with a strong immunoreexpression of AR.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Secrétariat d'état à la Recherche Scientifique et Technologique (S.E.R.S.T.) (Tunisia). We thank Mr. Ahmed Rebai for his contribution in the statistical study.

REFERENCES

- 1- **R.M. Sharpe** (1994). Regulation of spermatogenesis. In: The physiology of reproduction, 3rd Ed, pp 1363-1434. E. Knobil, JD. Neill eds. New York: Raven Press.
- 2- **M. SAR, D.B. Lubahn, F.S. French et E.M. Wilson** (1990). Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology*, **127**, 3180-3186.
- 3- **J.A. Ruizeveld de Winter, J. Trapman, M. Vermey, E. Mulder, N.D. Zegers et T.H. van der Kwast** (1991). Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **39**, 927-936.
- 4- **W.J. Bremner, M.R. Millar, R.M. Sharpe et P.T.K. Saunders** (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: eviden-

- ce for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology*, **135**, 1227–1234.
- 5- **W. Vornberger, G. Prins, N.A. Musto et C.A. Suarez-Quian** (1994). Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology*, **134**, 2307–2316.
 - 6- **C.A. Suarez-Quian, B.O. Oke, W. Vornberger, G. Prins, S. Xiao and N.A. Musto** (1996). Androgen receptor distribution in the testis. In: Cellular and molecular regulation of testicular cell, pp 189–212. Desjardins C, ed. New York: Springer-Verlag.
 - 7- **M. McGuinness et M. Griswold** (1996). Interactions between Sertoli cells and germ cells in the testis. *Seminars in Development and Biology*, **5**, 61–66.
 - 8- **Q. Zhou, R. Nie, G.S. Prins, P.T. Sauters, B.S. Katzenellenbogen et R.A. Hess** (2002). Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *Journal of Andrology*, **23**, 870–881.
 - 9- **R.W. Holdcraft et R.E. Braun** (2004). Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development*, **131**, 459–67.
 - 10- **N. Kimura, A. Mizokami, T. Onuma, H. Sasano et H. Nagura** (1993). Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **41**, 671–678.
 - 11- **P.J.A. Janssen, A.O. Brinkmann, W.J. Boersma and T.H. Vander Kwast** (1994). Immunohistochemical detection of the androgen receptor with monoclonal antibody F39.4 in routinely processed, paraffin-embedded human tissues after microwave pretreatment. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **42**, 1169–1175.
 - 12- **J.H. Van Rooijen, S. van Assen, T.H. van der Kwast, D.G. de Rooij, W.J.A. Boersma, J.T.M. Vreeburg et R.F.A. Weber** (1995). Androgen receptor immunoexpression in the testes of subfertile men. *Journal of Andrology*, **16**, 510–516.
 - 13- **C.A. Suarez-Quian, B.O. Oke, W. Vornberger** (1997). Localisation du récepteur des androgènes dans le testicule. *Andrologie*, **7**, 293–304.
 - 14- **C.A. Suarez-Quian, F. Martinez-Garcia, M. Nistal et J. Regadera** (1999). Androgen receptor distribution in adult human testis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**, 350–358.
 - 15- **A. Khabir, A. Sellami, M. Sakka, A. Ghorbel, J. Daoud, M. Frikha, M. Drira, P. Busson et R. Jlidi** (2000). Contrasted Frequencies of p53 Accumulation in the Two Age Groups of North African Nasopharyngeal Carcinomas. *Clinical Cancer Research*, **6**, 3932–3936.
 - 16- **M. Iwamura, P.A. Abrahamsson, C.M. Benning, A.T. Cockett et P.A. diSant'Agnese** (1994). Androgen receptor immunostaining and its tissue distribution in formalin fixed, paraffin-embedded sections after microwave treatment. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **42**, 783–788.
 - 17- **C.T. Anthony, W.J. Kovacs et M.K. Skinner** (1989). Analysis of the androgen receptor in isolated testicular cell types with a microassay that uses an affinity ligand. *Endocrinology*, **125**, 2628–2635.
 - 18- **X. Zhou, A. Kudo, H. Kawakami et H. Hirano** (1996). Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anatomical Record*, **245**, 509–518.
 - 19- **G. Verhoeven et J. Cailleau** (1988). Follicle-stimulating hormone and androgens increase the concentration of the androgen receptor in Sertoli cells. *Endocrinology*, **122**, 1541–1550.
 - 20- **I.B. Fritz** (1994). Somatic cell-germ cell relationships in mammalian testes during development and spermatogenesis. *Science*, **196**, 180–182.

LES EPIDERMOLYSES BULLEUSES HEREDITAIRES EN TUNISIE: ETUDE EPIDEMIO-CLINIQUE ET ULTRA-STRUCTURALE

F. CHERIF¹, N. MNAJJA¹, S. FERIANI², Z. MARRAKCHI BEN SAÏD³,
M.H. JAAFOURA⁴, A. BEN OSMAN DHAHRI¹ AND S. BOUBAKER^{2*}

¹ Laboratoire de Génétique Moléculaire Humaine, Faculté de Médecine, Sfax, Tunisie.

² Laboratoire d'anatomie pathologie, CHU Hôpital Habib Bourguiba, Sfax, Tunisie.

³ Unité de recherche US 17, CHU Hôpital Habib Bourguiba, Sfax, Tunisie.

* Corresponding author

E-mail : lkeskes@yahoo.fr

RESUME

Les épidermolyses bulleuses héréditaires (EBH) sont des genodermatoses rares caractérisées par une fragilité anormale de la jonction dermo-épidermique, aboutissant à la formation de décollements cutanés et/ou muqueux au moindre traumatisme. Le but de notre travail était de rapporter les particularités épidémiologiques, génétiques, ultrastructurales et évolutives d'une série de malades atteints d'EBH.

Mots clefs : Epidermolyses bulleuses héréditaires, microscopie électronique.

INTRODUCTION

Les épidermolyses bulleuses héréditaires (EBH) sont des maladies génétiques rares, caractérisées par une fragilité cutanée et muqueuse aboutissant à la formation de bulles et d'érosions d'apparition spontanée ou au moindre traumatisme. Elles sont liées à des mutations au niveau des gènes codant pour des protéines impliquées dans la cohésion dermo-épidermique¹.

Trois grands types d'EBH sont distingués en fonction du niveau de clivage dans la jonction dermo-épidermique (JDE) : les épidermolyses bulleuses simples (EBS) avec un clivage intra épidermique au niveau du kératinocyte basal qui impliquent les kératines 5 et 14; les épidermolyses bulleuses jonctionnelles (EBJ) avec un clivage au niveau de la membrane basale (MB) elle-même et qui impliquent la laminine 5, le collagène XVII ou l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$; les épidermo-

SUMMARY

Hereditary epidermolysis bullosa (EB) are a group of genodermatoses whose common primary feature is formation of blisters following minor trauma. The aim of the present study was to assess epidemiological, clinical, genetical and histological particularities of patients with hereditary epidermolysis bullosa.

Key words: Hereditary epidermolysis bullosa, electron microscopy

lyses bulleuses dystrophiques (EBD) avec un clivage au-dessous de la membrane basale (MB), au niveau du derme superficiel d'où le terme d'EBH dermolytique qui leur est parfois consacré et qui impliquent le collagène VII^{2,3,4}.

De nombreux sous-types sont distingués au sein de ces trois grands groupes. La classification actuellement utilisée a été simplifiée et repose sur des données génétiques, cliniques, ultra-structurales, moléculaires ainsi que sur la détermination de la protéine de structure impliquée⁵.

La gravité des EBH varie considérablement d'une forme à l'autre, allant de formes mineures occasionnant une gêne fonctionnelle modérée à des formes létales, en passant par des formes sévères à l'origine d'handicaps fonctionnels et d'atteintes viscérales graves.

A partir d'une série de malades tunisiens atteints d'EBH nous avons dégagé les particularités épidémiocliniques, génétiques, ultra-structurales et évolutives de nos patients.

MATERIEL ET METHODES

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur les malades atteints d'EBH ayant consulté dans notre service de dermatologie de l'hôpital La Rabta- Tunis entre 1983 et 2002. Les informations colligées étaient les suivantes:

- Données cliniques: âge, sexe, origine géographique, arbres généalogiques, âge de début, examen clinique (cutanéomuqueux et phanérien), atteintes extra-cutanées ou maladies associées, traitement, évolution et complications.
- Données paracliniques: numération de la formule sanguine, dosage du fer sérique, créatinémie, urée sanguine, proteinurie des 24 heures, transit œsogastro-duodéal (TOGD), échographie abdominale, lavement baryté, radiographie panoramique dentaire.
- Données ultrastructurales: étude en microscopie électronique de transmission d'une biopsie cutanée en peau frottée fixée dans la glutaraldéhyde à 2,5% selon la technique standard⁶.

RESULTATS

71 patients appartenant à 62 familles différentes ont été colligés sur une période de 20 ans (1983-2002). L'interrogatoire des malades ou de leur famille a permis de recenser 52 autres patients qui n'ont pu être examinés donc non inclus dans notre étude.

- Epidémiologie: quarante quatre malades (62%) provenaient du district de Tunis (Tunis, Ben Arous, Ariana). En excluant les 27 autres patients provenant du Centre, du Nord ou du Sud de la Tunisie, la prévalence des EBH au sein du district de Tunis était de 112 cas /1.000.000 de naissances. Le sex-ratio était équilibré (SR=1,1). L'âge moyen des malades était de 9 ans (3 jours - 51 ans). L'âge de début était variable: période néonatale (60%) ; de 1 mois à 1 an (26%) et au-delà de 1 an (15%). Une consanguinité parentale était retrouvée dans 75% cas.
- Conformément à la classification des EBH en 3 types, nos malades se répartissaient, selon les don-

nées cliniques, génétiques et ultrastructurales en 21 cas d'EBS (29,6 %), 11 cas d'EBJ (15,5 %) et 33 cas d'EBD (46,5 %). Les aspects observés en ultrastructure étaient tout à fait caractéristiques. Selon le niveau de clivage au sein de la JDE ou selon les anomalies de structure observées, l'étude en microscopie électronique a permis de classer de façon précise les 33 malades (fig.1). Dans tous les cas, les données ultrastructurales ont été confrontées aux données cliniques.



Figure 1a. Etude ultrastructurale d'une épidermolyse bulleuse simple : Zone non clivée. Tonofilaments (TN), hémidesmosomes (HD) et fibrilles d'ancrage (FA) normaux. (x 10 000)

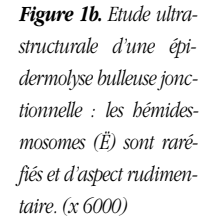


Figure 1b. Etude ultrastructurale d'une épidermolyse bulleuse jonctionnelle : les hémidesmosomes (Ē) sont raréfiés et d'aspect rudimentaire. (x 6000)

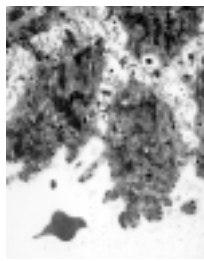


Figure 1c. Ec- Etude ultrastructurale d'une épidermolyse bulleuse dystrophique: Décollement (D) sous la lamina densa dans le derme superficiel. (x 5000)

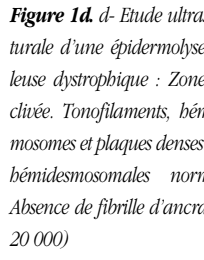
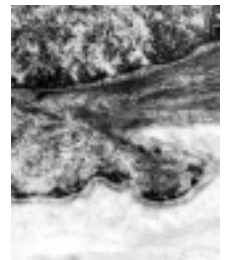


Figure 1d. d- Etude ultrastructurale d'une épidermolyse bulleuse dystrophique : Zone non clivée. Tonofilaments, hémidesmosomes et plaques denses sous-hémidesmosomales normaux. Absence de fibrille d'ancrage.(x 20 000)



Six malades sont restés inclassés (8,4 %). Ils présentaient des bulles et des érosions à début précoce, mais l'étude ultrastructurale n'a pu être réalisée

(malade décédé ou perdu de vue rapidement).

- Génétique: La transmission était autosomique dominante dans 3 cas (1 cas EBS et 2 cas EBD). Une transmission autosomique récessive a été retenue lorsqu'il existait une consanguinité parentale et des cas familiaux (62 cas), inversement une néo-mutation a été suspectée en l'absence de consanguinité des parents ou de cas similaires dans la famille (6 cas).
- Clinique: Pour les EBS, seuls les sous-types de Weber Cockayne, de Koebner et de Dowling-Meara ont été observés dans notre série (Tableau I).

Tableau I: Répartition des épidermolyses bulleuses simples dans notre série.

Type	Sous-type	Nombre	Pourcentage
EBS Weber	Cockayne	8	11,3 %
EBS	EBS Koebner	12	16,9 %
EBS	Dowling- Meara	1	1,4 %
TOTAL		21	29,6 %

EBS : Epidermolyses Bulleuses Simples

Les bulles à contenu séreux ou hémorragique étaient localisées principalement aux paumes et aux plantes dans les formes de Weber Cockayne ou généralisées dans les formes de Koebner et de Dowling-Meara. Elles évoluaient vers la formation d'érosions et de croûtes. La cicatrisation se faisant sans atrophie ni grains de milium (fig.2). Une atteinte de la muqueuse buccale a été notée dans 2 cas d'EBS de Koebner.



Figure 2. Epidermolyse bulleuse simple de Koebner : bulles à contenu séreux et hémorragique des pieds, érosions post-bulleuses. Cicatrisation sans grains de milium ni atrophie.

Le tableau II rapporte les différentes formes d'EBJ de notre série. L'atteinte bulleuse généralisée était présente dès la naissance, associée à une atteinte muqueuse sévère (fig.3). Une anonychie était notée dans 3 cas/4 au cours des EBJ de Herlitz avec pré-

sence dans 2 cas d'un tissu de granulation péri-unguéal. Dans les formes non-Herlitz, les bulles ont laissé place à des cicatrices atrophiques, avec alopecie au cuir chevelu. Une atteinte oculaire sévère était relevée dans 2 cas et des anomalies dentaires touchant notamment l'émail étaient notées dans 4 cas.

Un nouveau-né atteint d'EBJ avec atrésie du pylore a été colligé dans notre série. Le diagnostic d'atrésie du pylore avait été évoqué en période anténatale devant un hydramnios et une dilatation gastrique. A la naissance, il présentait des zones d'aplasie cutanée ; puis des vomissements non bilieux sont apparus dès les premières heures de vie.

Tableau II: Répartition des épidermolyses bulleuses jonctionnelles dans notre série.

Type	Sous-type	Nombre	Pourcentage
EBJ	Herlitz	4	5,6 %
EBJ	EBJ non Herlitz	6	8,5 %
EBJ	atrésie pylore	1	1,4 %
TOTAL		11	15,5 %

EBJ : Epidermolyses Bulleuses Jonctionnelles



Figure 3. Epidermolyse bulleuse jonctionnelle : bulles et érosions étendues du tronc, des membres et des oreilles.

Les formes dystrophiques d'EBH étaient les plus fréquentes dans notre série: 46,5% (Tableau III).

Tableau III : Répartition des épidermolyses bulleuses dystrophiques dans notre série.

Type	Sous-type	Nombre	Pourcentage
EBD	Dominante	3	4,2 %
EBD	EBD Hallopeau-Siemens	10	14,1 %
EBD	non Hallopeau-Siemens	20	28,2 %
TOTAL		33	46,5 %

EBD : Epidermolyses Bulleuses Dystrophiques

Les EBD de type Hallopeau-Siemens réalisaient un aspect caractéristique avec une fragilité cutanée extrême, évoluant vers la formation de grains de

milium et de cicatrices dystrophiques. Des syndactylies complètes ou partielles étaient notées dans 8 cas (fig.4).



Figure 4. Epidermolyse bulleuse dystrophique de type Hallopeau-Siemens : syndactylie des orteils, onychie.

Deux malades âgés de 5 et 9 ans présentaient des contractures en flexion des membres. L'atteinte unguéale était quasi-constante, dominée par l'anonychie (70% cas). Des érosions de la muqueuse buccale étaient retrouvées chez 8 patients (80% cas). Dans 2 cas étaient observés une sténose œsophagienne responsable de dysphagie, des caries et une mauvaise implantation des dents ainsi qu'un retard staturo-pondéral sévère respectivement à -2DS et -3DS.

Les EBD de type non Hallopeau-Siemens représentaient 61% des formes dystrophiques. Soixante pour cent des malades avaient une atteinte cutanée généralisée alors que 35% avaient des lésions qui prédominaient aux zones protubérantes. Les grains de milium et les cicatrices dystrophiques étaient notés respectivement dans 80 et 70% des cas (fig.5).

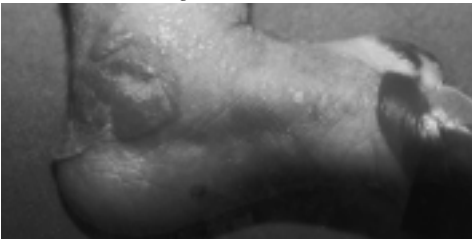


Figure 5. Epidermolyse bulleuse dystrophique de type non Hallopeau-Siemens: bulles laissant place à des grains de milium.

Une atteinte unguéale était notée dans 80% des cas dominée par l'onychodystrophie. 5 patients présentaient une alopecie cicatricielle. Une sténose œsophagienne était notée dans 2 cas ; elle était associée chez une patiente à une sténose anale révélée par des ténésmes. Trois malades présentaient une forme dominante d'EBD. L'atteinte généralisée prédominait aux zones protubérantes, avec des cicatrices dystrophiques. Les

papules blanchâtres dites albo-papuloides ont été constatées dans 2 cas. Il n'y avait ni atteinte muqueuse, ni atteinte dentaire.

- Examens paracliniques: Les examens biologiques n'ont été réalisés que dans les formes sévères (30 cas). Ils ont objectivé une anémie ferriprive dans 13 cas. Celle-ci était inférieure à 10 g/dl dans 10 cas. Le bilan rénal et l'échographie abdominale demandés à la recherche d'une amylose étaient normaux. Le TOGD pratiqué devant la dysphagie a permis de confirmer la sténose œsophagienne dans 4 cas. Celle-ci était étagée dans 1 cas. L'anuscopie faite chez une malade montrait une sténose anale.
- Traitement: Aucun traitement curatif n'étant encore actuellement disponible, notre prise en charge thérapeutique s'est basée essentiellement sur les traitements locaux et l'éducation des malades et de leur famille. Les traitements généraux prescrits: diphénylhydantoïne (14 cas), disulone (2 cas), corticothérapie générale (3 cas), clofazimine (1 cas) n'ont pas apporté d'amélioration probante et ont été abandonnés. Une supplémentation en fer a été proposée chez les patients ayant une anémie. Par ailleurs, devant une anémie mal tolérée (Hb = 4 g/dl) deux patients ont été transfusés. Des dilatations œsophagiennes au ballonnet ont été pratiquées chez 3 malades ayant une sténose œsophagienne. Une œsocoloplastie a été indiquée chez la patiente présentant une sténose œsophagienne étagée.
- L'évolution était variable selon les formes cliniques. Une atténuation des lésions avec l'âge était constatée dans les formes d'EBH simples et dystrophiques dominantes. Un état stationnaire ou une aggravation était observée dans les formes d'EBD récessives et dans les formes d'EBJ non-Herlitz. Malgré les soins et la réanimation, les patients atteints d'EBJ de Herlitz et d'EBJ avec atrésie pylorique sont décédés au bout de quelques jours.

DISCUSSION

Les EBH constituent un groupe hétérogène de maladies génétiques rares. Leur prévalence dans le monde varie suivant les séries de 3,7 à 54 cas/1.000.000 de naissances^{7,8,9}. En Tunisie, les EBH ont une prévalence plus élevée, atteignant dans certaines régions 176 cas/1.000.000 naissances¹⁰. Un fort taux de consanguinité dans notre pays pourrait expliquer ces données¹¹.

Les EBS constituent habituellement les formes les plus fréquentes. Leur transmission est autosomique dominante¹². Les rares formes autosomiques récessives seraient associées à un phénotype plus sévère¹³.

Dans notre étude, les EBS représentaient moins d'un tiers des cas. L'aspect clinique était caractéristique. Aucune forme sévère n'a été constatée malgré une transmission autosomique récessive prédominante. Les formes jonctionnelles d'EBH représentent selon Fine et al. à peine 1% des EBH¹². Leur fréquence était donc particulièrement élevée dans notre série. L'aspect clinique réalisait une atteinte cutanéomuqueuse grave et généralisée. L'anonychie et la présence de bourgeons charnus comme chez nos patients semble assez caractéristique des formes de Herlitz¹². Dans les formes non-Herlitz, étaient associées à l'atteinte cutanée, une atteinte muqueuse notamment oculaire, une alopecie cicatricielle et une anonychie; ces lésions sont également caractéristiques de cette forme¹².

Les formes dystrophiques d'EBH constituaient dans notre étude comme dans la série de patients tunisiens colligés dans la région de Sfax, les formes les plus fréquentes¹⁰. A côté des EBD de type Hallopeau-Siemens qui réalisaient des atteintes généralisées mutilantes, tout à fait caractéristiques¹², les EBD de type non Hallopeau-Siemens étaient les formes les plus fréquentes de notre série (28,2 %). Comme cela est classiquement décrit, elles étaient caractérisées par une grande variabilité d'expression phénotypique aussi bien inter qu'intra-familiale^{14, 15}. Cependant, l'atteinte œsophagienne habituellement non retrouvée dans cette forme¹² a été observée chez 2 malades, associée dans 1 cas à une sténose anale.

Six malades sont restés inclassés dans notre série du fait d'un aspect clinique peu caractéristique et de l'absence d'étude ultrastructurale. Cet examen constitue une étape fondamentale pour la classification précise des malades atteints d'EBH¹⁶, notamment en période néonatale, où les aspects cliniques entre les différentes formes d'EBH peuvent être proches. L'immunohistochimie qui permet d'identifier un certain nombre d'EBH en étudiant la localisation des différents antigènes de la JDE par rapport au plancher ou au toit de la bulle n'a pas été pratiquée dans notre étude. Bien que de réalisation rapide, elle ne permet pas de visualiser les anomalies de structure associées à chaque forme d'EBH^{5, 17}.

Après un diagnostic précis du sous-type d'EBH, une

prise en charge parfois multidisciplinaire doit être proposée pour améliorer la qualité de vie des malades. Comme le souligne notre étude, il n'existe pas de traitement de fond des EBH. Le traitement reste essentiellement symptomatique visant à éviter les traumatismes et à corriger les complications¹⁸.

L'évolution des différentes formes d'EBH était variable selon le type, marquée par un pronostic sombre pour les EBJ de Herlitz (4 décès) mais également par la survenue de complications graves et d'handicaps sévères pour les 10 cas d'EBD de Hallopeau-Siemens.

Depuis quelques années, de nombreuses publications rapportent la survenue à long terme de carcinomes épidermoïdes cutanés au cours des EBD de type Hallopeau-Siemens^{1, 19}. Aucun cas n'a été constaté chez nos patients. Néanmoins, une surveillance étroite des hyperkératoses et des érosions chroniques s'impose notamment chez les patients les plus âgés. Ces carcinomes épidermoïdes sont associés à un mauvais pronostic²⁰. Récemment, des atteintes rénales au cours des EBD récessives ont été également rapportées, associées soit à une amylose²¹, soit à une néphropathie à immunoglobuline A². Ces complications n'ont pas été notées dans notre série.

Dans notre pays où les mariages consanguins sont fréquents et où la prévalence des EBH, notamment des formes sévères, est élevée il serait important de pouvoir proposer rapidement un conseil génétique et un diagnostic anténatal à ces familles.

RÉFÉRENCES

- J. Uitto, R. Eady, J.D. Fine, M. Feder et J. Dart** (2000). The DEBRA International Visioning/Consensus Meeting on Epidermolysis Bullosa: summary and recommendations. *J. Invest. Dermatol.*, **114**, 734-737
- R.W. Pearson** (1962). Studies on the pathogenesis of epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.*, **39**, 551-575
- J.E. Mellerio** (1999). Molecular pathology of the cutaneous basement membrane zone. *Clin. Exp. Dermatol.*, **24**, 25-32
- L. Pulkkinen et J. Uitto** (1999). Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Matrix. Biol.*, **18**, 29-42
- J.D. Fine, R.A. Eady, E.A. Bauer, R.A. Briggaman, L. Bruckner-Tuderman, A. Christiano et al** (2000). Revised classification sys-

- tem for inherited epidermolysis bullosa: report of the second international consensus meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **42**, 1051-1066
- 6- **I. Hashimoto, T. Jr Gedde-Dahl, U.W. Schnyder et I. Anton-Lamprecht** (1976). Ultrastructural studies in epidermolysis bullosa hereditaria. IV. Recessive dystrophic types with junctional blistering. (Infantile or Herlitz-Pearson type and adult type). *Arch. Dermatol. Res.*, **257**, 17-32
 - 7- **F. Rouan, L. Pulkkinen L, M.F. Jonkman, J.W. Bauer, P.B. Cserhalmi-Friedman, A.M. Christiano et J. Uitto** (1998). Novel and de novo glycine substitution mutations in the type VII collagen gene (Col7A1) in dystrophic epidermolysis bullosa: implications for genetic counseling. *J. Invest. Dermatol.*, **111**, 1210-1213
 - 8- **J.D. Fine, L. Jhonson, C. Suchindran, A. Moshell et T. Gedde-Dahl** (1999). The epidemiology of inherited epidermolysis bullosa: findings within American, Canadian, European study populations. In: Fine JD, Bauer EA, McGuire J, Moshell A. Epidermolysis bullosa: Clinical, Epidemiologic and Laboratory Advances and the Findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry: pp.101-113, John Hopkins University Press, Baltimore.
 - 9- **M. Kunz, F. Rouan, L. Pulkkinen, H. Hamm, R. Jeschke, L. Bruckner-Tuderman, E.B. Brocker, G. Wiche, J. Uitto et D. Zillikens** (2000). Mutation reports: epidermolysis bullosa simplex associated with severe mucous membrane involvement and novel mutations in the plectin gene. *J. Invest. Dermatol.*, **114**, 376-380
 - 10- **H. Turki, S. Bouassida, N. Affes, M. Frikha et A. Zahaf** (1994). Profil des épidermolyses bulleuses héréditaires en Tunisie (étude de 62 observations de Sfax). *Ann. Dermatol. Venereol.*, **121**(suppl.I), s105
 - 11- **S. Riou, C. El Younsi et H. Chaabouni** (1989). Consanguinité dans la population du nord de la Tunisie. *Tun. Med.*, **67**, 167-172
 - 12- **J.D. Fine, E.A. Bauer, R.A. Briggaman, D.M. Carter, R.A. Eady, N.B. Esterly et al** (1991). Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa. A consensus report by the Subcommittee on Diagnosis and Classification of the National Epidermolysis Bullosa Registry. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **24**, 119-135
 - 13- **A. Abanmi, R.K. Joshi, D.N. Atukorala, N.B. Pedersen et O.A. Khamis** (1994). Autosomal recessive epidermolysis bullosa simplex. A case report. *Br.J. Dermatol.*, **130**, 115-117
 - 14- **R. Gardella, D. Castiglia, P. Posteraro, S. Bernardini, N. Zoppi, M. Paradisi, G. Tadini, S. Barlati, J.A. McGrath, G. Zambruno et M. Colombi** (2002). Genotype-phenotype correlation in Italian patients with dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.*, **119**, 1456-1462
 - 15- **J.O. Winberg, N. Hammami-Hauasli, O. Nilssen, I. Anton-Lamprecht, S.L. Naylor, K. Kerbacher, M. Zimmermann, P. Krajci, T. Jr Gedde-Dahl et L. Bruckner-Tuderman** (1997). Modulation of disease severity of dystrophic epidermolysis bullosa by splice site mutation in combination with a missense mutation in the COL7A1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 1125-1135
 - 16- **L.T. Smith** (1993). Ultrastructural findings in epidermolysis bullosa. *Arch. Dermatol.*, **129**, 1578-1584
 - 17- **D. Petronius, R. Bergman, O. Ben Izhak, R. Leiba et E. Sprecher** (2003). A comparative study of immunohistochemistry and electron microscopy used in the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Am. J. Dermatopathol.*, **25**, 198-203
 - 18- **L. De Raeve, J. Ramet, D. Danschutter et D. Roseeuw** (1998). Prise en charge des épidermolyses bulleuses congénitales. *Ann. Dermatol. Venereol.*, **125**, 743-747
 - 19- **J.A. McGrath, O.M. Schofield, B.J. Mayou, P.H. McKee et R.A. Eady** (1992). Epidermolysis bullosa complicated by squamous cell carcinoma : report of 10 cases. *J. Cutan. Patbol.*, **19**, 116-123
 - 20- **A.M. Christiano, J. Crollick, S. Pincus et J. Uitto** (1999). Squamous cell carcinoma in a family with dominant dystrophic epidermolysis bullosa: a molecular genetic study. *Exp. Dermatol.*, **8**, 146-152
 - 21- **K. Kaneko, M. Kakuta, Y. Ohtomo, T. Shimizu, T. Yamashiro, H. Ogawa et al** (2000). Renal amyloidosis in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatology*, **200**, 209-212
 - 22- **D. Farhi, S. Ingen-Housz-Oro, F. Ducret, N. Rioux-Leclercq, G. Cam, P. Simon, F. Martinez, C. Fumeron, L. Dubertret et C. Blanchet-Bardon** (2004). Recessive dystrophic epidermolysis bullosa (Hallepeau-Siemens) with IgA nephropathy: 4 cases. *Ann. Dermatol. Venereol.*, **131**, 963-967

LANTHANIDES ET MICROANALYSE EFFETS DE L'ADMINISTRATION ORALE DE DEUX LANTHANIDES : ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET MICROANALYTIQUE

E. FEHRI¹, A. AYADI¹, S. BOUBAKER², S. KARRAY², H. JAAFOURA³
A. EL HILI⁴, P. GALLE⁵ ET L. TEKAYA^{1*}

¹ Laboratoire de physiologie, Faculté de Médecine de Tunis

² Laboratoire d'Anatomo-Pathologie, Institut Pasteur de Tunis

³ Laboratoire d'Histologie-Embryologie Faculté de Médecine de Tunis

⁴ Laboratoire de microscopie électronique- Faculté des Sciences de Tunis

⁵ Service de Physique et Chimie Biologiques et Médicales- Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

* Auteur correspondant

RESUME

La localisation subcellulaire du lanthane et du cérium, au niveau de la muqueuse intestinale, a été étudiée, suite à l'administration par voie orale d'une solution soluble de: Chlorure de cérium ou chlorure de lanthane ou chlorure de lanthane suivi 30 minutes plus tard de chlorure de cérium à des jeunes rats mâles adultes et de souche Wistar. Deux méthodes d'observations et d'analyse ont été utilisées : La microscopie électronique par transmission et la microanalyse ionique.

La microscopie électronique par transmission (MET) a révélé la présence d'amas granulaires denses aux électrons localisés au niveau des lysosomes des entérocytes duodénaux lorsque les deux éléments ont été ingérés simultanément.

La microanalyse ionique a permis de montrer la présence du lanthane et du cérium sous forme de points brillants soulignant le contour de la villosité intestinale. Ces points correspondent aux lysosomes contenant les granulations décrites précédemment en MET. Ces inclusions sont formées par le cérium et/ou lanthane associé au phosphore et formant très probablement un sel insoluble de phosphate de cérium et/ou lanthane.

Mots clefs : Microanalyse, lysosomes, intestin.

INTRODUCTION

La quasi-totalité des études ayant abordé les mécanismes de concentration et de précipitation ont concerné essentiellement les oligo-éléments^{1,2}. Mais, si pour

ABSTRACT

The subcellular localization of cerium and lanthanum in the intestinal mucosa was studied after oral administration of cerium chloride or lanthanum chloride or lanthanum chloride followed 30 minutes after of cerium chloride to young adults Wistar rats. Two methods of observation and microanalysis were used. The transmission electron microscopy revealed the presence of dense electron granulations in the lysosomes of the duodenum enterocyte, when these elements were administered simultaneously. The ion mass microanalysis permits to detect the presence of La and Ce as bright points outlining the intestinal villi. These points correspond to the lysosomes containing the granulations previously described. These granulations are formed by the cerium and the lanthanum associated to the phosphor and forming probably insoluble salts of Ce/ La phosphate.

Key words: Microanalysis, lysosomes, intestine.

cette catégorie, le rôle métabolique est aujourd'hui parfaitement élucidé³, il n'en est pas de même pour d'autres éléments tels que les métaux lourds et les lanthanides dont l'utilisation est de plus en plus fréquen-

te, aussi bien dans les domaines industriel que médical. Parmi ces éléments, le lanthane et le cérium, lanthanides relativement abondants dans la nature, présentant des radio - isotopes à période importante, occupent une place de choix, compte tenu des risques potentiels qu'ils peuvent engendrer pour l'homme.

En effet, le lanthane est largement utilisé en médecine en tant que marqueur du transit intestinal⁴. En industrie, il est considéré comme constituant essentiel des pierres à briquet ainsi que des lampes⁵.

S'agissant du cérium, il est très utilisé en médecine comme agent antiémétique ou anticoagulant et présente en parallèle des applications industrielles notamment dans la fabrication de céramique, des verres filtrants ainsi que dans les pots catalytiques des véhicules automobiles. En outre, cet élément, possédant deux radio-isotopes le Ce-141 et le Ce-144 dont la demi-vie est de 32,8 et 284,5 jours respectivement⁵, est susceptible de poser de sérieux problèmes de santé publique. C'est ainsi qu'il a été détecté dans les poumons des habitants résidant à proximité des zones contaminées par les déchets radioactifs lors de la catastrophe nucléaire de Tchernobyl⁶.

L'utilisation répandue de ces deux lanthanides nous a incité à mettre l'accent sur la compréhension de leur métabolisme au sein de l'organisme. Deux organes ont été ainsi explorés: la muqueuse intestinale et le foie suite à l'administration par voie orale aux rats mâles de souche Wistar d'une solution soluble de:

- Chlorure de lanthane.
- Chlorure de cérium.
- Chlorure de lanthane suivie 30 minutes plus tard de l'ingestion de chlorure de cérium.

Pour cela, deux techniques des plus sensibles d'observation et d'analyse ont été utilisées:

- La microscopie électronique par transmission.
- La microscopie ionique analytique.

MATERIEL ET METHODES

TRAITEMENT DES RATS

Dans toutes nos expériences, les rats ont reçu par voie orale soit:

- Une solution soluble de chlorure de cérium (CeCl₃ Sigma, Saint Louis)
- Une solution soluble de chlorure de lanthane heptahydrate (LaCl₃·7H₂O Sigma, Saint Louis).
- Une solution soluble de chlorure de cérium suivie 30 minutes après d'une solution de lanthane.

Un premier groupe de 6 rats a reçu par voie orale et grâce à une sonde gastrique métallique, une dose unique de 1 ml contenant 40 mg de chlorure de cérium.

un 2^{ème} groupe de 6 rats a reçu par voie orale 1 ml d'une solution contenant 400mg de chlorure de lanthane.

Enfin, un 3^{ème} groupe de 6 rats a reçu 1 ml d'une solution contenant 200mg de chlorure de lanthane suivie 30 minutes plus tard de l'ingestion au même rat d'une solution contenant 20mg de chlorure de cérium.

Pour chaque série d'expériences, un groupe de rats témoins a reçu par voie orale du sérum physiologique dans les mêmes conditions expérimentales.

1 heure après l'ingestion des produits, l'animal a été anesthésié à l'éther et une laparotomie a été réalisée. Le duodénum proximal ainsi que le foie ont été prélevés.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les organes prélevés vont subir un certain nombre de traitement avant de s'apprêter à la réalisation des coupes. En effet, les échantillons tissulaires à étudier ont été découpés en petits fragments (1mm³) puis immédiatement immergés dans une solution de fixateur. Le fixateur chimique utilisé est la glutaraldéhyde, diluée à 3% dans un tampon cacodylate de sodium (0,15M, PH=7,4 ; T°=4°C pendant 1 heure). Les échantillons découpés sont ensuite lavés dans un bain de rinçage, cacodylate / eau distillée. A la suite du lavage, la moitié des échantillons a été immergée dans une solution de tétraoxyde d'osmium afin d'assurer leur post-fixation ainsi qu'une augmentation appréciable du contraste des images. A la sortie des liquides de post- fixation, les pièces ont été déshydratées dans des bains d'alcool éthylique à concentrations croissantes, puis dans l'oxyde de propylène. Tous les fragments sont ensuite inclus dans l'épon. Les échantillons sont enfin mis dans des moules contenant de l'épon pur et polymérisent à 60° pendant 48 heures.

CONFECTION DES COUPES HISTOLOGIQUES

A l'issue de ces étapes, les blocs contenant les échantillons sont alors prêts à la réalisation des coupes. Deux types de coupes ont été réalisées :

- Les coupes semi-fines de l'ordre de 1 à 2 µm d'épaisseur, ont été confectionnées grâce à un ultramicrotome (Leica Ultracut E) avec un couteau de verre, dépo-

sées sur lames d'or très pur (Au Purcla Lyon Allemand Louyot) de 1 cm² de surface et de 50 µm d'épaisseur. La pureté et la masse atomique élevée du support métallique (or) évitent tout risque d'interférence entre le signal ionique provenant du matériel biologique et le signal ionique provenant du support⁷. Les échantillons sont ensuite séchés à l'étuve à 37° pendant 48 heures. Ces coupes sont destinées à la microanalyse ionique car cette méthode est destructive et les images obtenues proviennent donc d'une pulvérisation des différentes couches atomiques du spécimen.

- Les coupes ultrafines de l'ordre de 70 nm d'épaisseur sont destinées à l'étude ultrastructurale des échantillons car l'illumination au moyen d'un faisceau d'électrons ne traverse que les coupes de quelques micromètres d'épaisseur⁸. Les coupes ultrafines ont été confectionnées grâce à un couteau de diamant. Les coupes osmiées ou non ont été déposées sur des grilles en cuivre ou en titane. Certaines de ces coupes sont contrastées par l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb et observées au microscope électronique par transmission.

MÉTHODE D'OBSERVATION ET D'ANALYSE

microscopie électronique par transmission

La microscopie électronique par transmission repose sur l'émission dans une colonne où règne un vide satisfaisant de faisceaux d'électrons qui ne traversent qu'un objet de très faible épaisseur. L'image résultante sera enregistrée sur une plaque sensible.

La microscopie ionique analytique

L'appareil utilisé est un microscope ionique de type "SMI 300" Cameca, destiné à l'exploration analytique submicroscopique. Il permet d'obtenir, grâce à sa très haute sensibilité et sa capacité d'analyse isotopique, la carte de distribution de la plupart des isotopes présents dans une coupe de tissu, avec une résolution spatiale de l'ordre de 0,5 µm. Le principe de cette méthode est basé sur l'émission ionique secondaire. L'arrachement des atomes du spécimen s'effectue très progressivement, ainsi, après bombardement primaire par O₂⁻, sont arrachées d'abord les couches atomiques les plus superficielles puis les couches atomiques les plus profondes. Les atomes émis de la préparation sous forme d'ions positifs sont caractéristiques de la surface du spécimen analysé. L'image est donc formée par les propres atomes de l'échantillon, il

est même possible de distinguer entre eux les différents isotopes des éléments présents dans une coupe de tissu⁷.

RÉSULTATS

EFFET DE L'ADMINISTRATION DE CHLORURE DE CERIUM PAR VOIE ORALE

Le duodénum

Microscopie électronique par transmission :
Figure 1

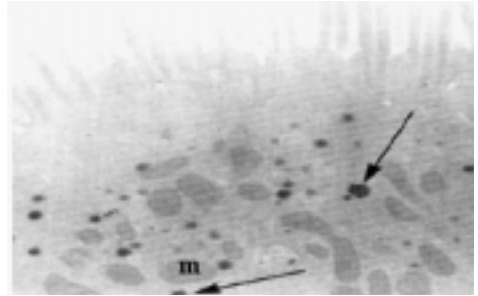


Figure 1. Microscopie électronique par transmission (GX10.000). Pôle apical d'un entérocyte. On observe des amas de grains denses (flèches) correspondant aux lysosomes (L), les microvillosités (Mv), de nombreuses mitochondries (m) et la limite cellulaire (tête de flèche).

L'étude ultrastructurale du duodénum de rats ayant reçu une dose unique de chlorure de cérium, montre au niveau des entérocytes des villosités intestinales, la présence d'amas granulaires relativement denses correspondant à des accumulations intralysosomiales localisées en grande partie au niveau de la moitié apicale des entérocytes duodénaux. Ces amas ont le plus souvent une forme arrondie.

Microscopie ionique analytique :
figure 2 (A et B)

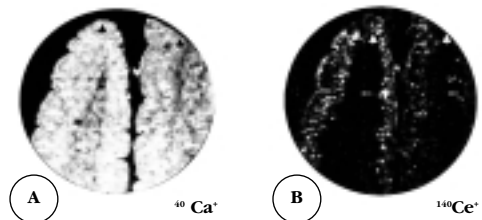


Figure 2. Microscopie ionique (GX400) l'image A montre la distribution du calcium (40Ca⁺). L'image B° montre la répartition du cérium (140Ce⁺). On peut observer le pôle apical des entérocytes (tête de flèches) et l'axe des villosités (v).

Les micrographies ioniques présentées ont été obtenues

par érosion de plusieurs centaines de couches atomiques de la préparation. Ces images comportent pour une plage circulaire de 250_μm de diamètre les images de la distribution du ⁴⁰Ca (Figure 2 A) et celle du ¹⁴⁰Ce (figure 2B). L'image du calcium à la masse 40 n'a pas un intérêt physiologique particulier, elle permet tout simplement de nous renseigner sur l'architecture du tissu étudié. Nous observons la présence de deux villosités coupées longitudinalement et dont le territoire apical est bien individualisé. Sur la même plage, on a pu obtenir l'image de répartition d'un isotope de cérium ¹⁴⁰Ce. Cette image montre la présence de points brillants, répartis de façon régulière, au niveau des pôles apicaux des entérocytes duodénaux. Ces points correspondent aux lysosomes contenant les granulations décrites précédemment en microscopie électronique par transmission.

Le foie

Microscopie électronique par transmission : Figure 3

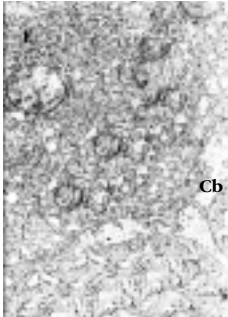


Figure 3. Microscopie électronique par transmission (Gx10.000) L'image montre 3 hépatocytes, le canalicule biliaire (Cb) et l'ergastoplasme (E). Aucune surcharge n'a été observée au sein du tissu hépatique.

L'étude ultrastructurale portant sur les coupes ultra-fines de foie de rats ayant reçu par voie orale une dose unique de chlorure de cérium n'a montré aucune surcharge au niveau des différents territoires hépatiques à savoir les hépatocytes et les cellules de küppfer.

Microscopie ionique analytique : figure 4 (A et B)

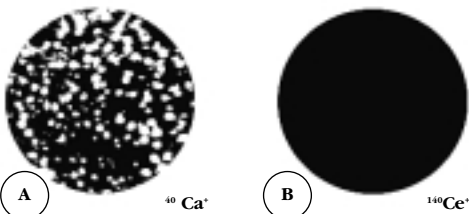


Figure 4. Microscopie ionique (GX400) l'image A montre la distribution du calcium (⁴⁰Ca+). L'image B montre la répartition du cérium (¹⁴⁰Ce+). On observe des hépatocytes avec leurs noyaux. Aucun signal correspondant au (¹⁴⁰Ce+) n'a été détecté.

L'image A de la figure 4 représente la répartition de l'ion calcium au sein d'une coupe de foie de rat ayant reçu une dose unique de chlorure de cérium, cette image montre notamment l'emplacement des noyaux cellulaires. L'image B réalisée sur le même champ, montre la répartition d'un isotope du cérium, ¹⁴⁰Ce. Aucun signal correspondant au cérium au sein du tissu analysé n'a été détecté.

EFFET DE L'ADMINISTRATION DE CHLORURE DE LANTHANE PAR VOIE ORALE

Le duodénum

Microscopie électronique par transmission : Figure 5

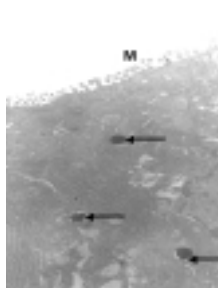


Figure 5. Microscopie électronique par transmission (Gx10.000) : Pôle apical d'un entérocyte duodéal. On observe les microvillosités (M), des amas de grains denses aux électrons (flèches) correspondant aux lysosomes.

L'étude ultrastructurale des coupes ultra-fines de duodénum de rats ayant reçu une dose unique de chlorure de lanthane, montre la présence de dépôts denses aux électrons. Ces dépôts correspondent à des accumulations intralysosomales localisés au niveau de la partie apicale des entérocytes duodénaux.

Microscopie ionique analytique : Figure 6 (A et B)

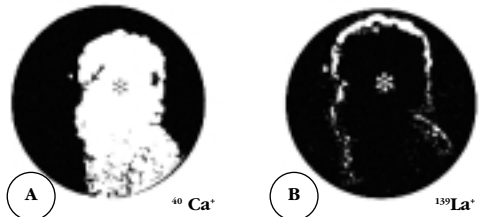


Figure 6. Microscopie ionique (GX400) : l'image A montre la répartition du calcium réalisée à la masse 40. On observe le pôle apical (tête de flèche) d'une villosité intestinale, les cellules caliciformes (flèches). L'image B montre la distribution du lanthane réalisée à la masse 139 au sein d'une villosité intestinale. On observe le pôle apical des entérocytes et l'axe de la villosité (*).

L'étude microanalytique des coupes semi-fines de duodénum de rats prélevés 1 heure après l'administration du chlorure de lanthane montre la présence de points brillants alignés suivant le contour des entérocytes duodénaux (figure 6B). L'intensité de la surcharge semble être plus marquée au niveau de l'apex de la villosité et l'analyse minutieuse de ces surcharges montre qu'elles correspondent aux lysosomes matures décrits précédemment en microscopie électronique par transmission. Sur la même plage, nous avons pu obtenir l'image de la répartition du $^{40}\text{Ca}^+$ (figure 6A) permettant de reconnaître la topographie d'une villosité intestinale.

Le foie

Microscopie électronique par transmission :
Figure 7

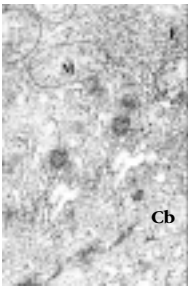


Figure 7. Microscopie électronique par transmission (Gx10.000) L'image montre un hépatocyte, un canalicule biliaire (Cb) l'ergastoplasme (E) et une mitochondrie (M). Aucune surcharge n'a été observée au sein de l'ensemble du tissu analysé.

L'image 7 représente l'étude ultrastructurale réalisée sur des coupes ultrafines de foie de rat ayant reçu par voie orale une dose unique de chlorure de lanthane. Cette image n'a montré aucune surcharge correspondant au lanthane au niveau des différents territoires hépatiques à savoir les hépatocytes, les cellules de küppfer et les canalicules biliaires.

Microscopie ionique analytique :

Figure 8 (A et B)

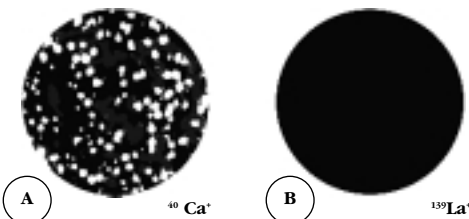


Figure 8. Microscopie ionique analytique (GX400) L'image A montre la répartition du calcium réalisée à la masse 40. On observe les cellules hépatiques et leurs noyaux. L'image B réalisée sur la même plage que la précédente, ne montre aucun signal correspondant au lanthane ou autre au sein du tissu analysé

La microanalyse ionique réalisée sur les coupes semi-fines de foie de rat ayant ingéré une dose unique de chlorure de lanthane, montre la micrographie ionique correspondant à la répartition du calcium (figure 8A), cette image a pour intérêt, la reconnaissance de la structure histologique du tissu. Nous observons ainsi les cellules hépatiques avec leurs noyaux. Sur la même plage, nous avons obtenu l'image de la répartition d'un isotope du lanthane le ^{139}La , aucune présence de cet élément n'a été détectée au niveau du foie.

EFFET DE L'ADMINISTRATION DE CHLORURE DE LANTHANE ET DE CHLORURE DE CERIUM

Le duodénum

Microscopie électronique par transmission :
Figure 9

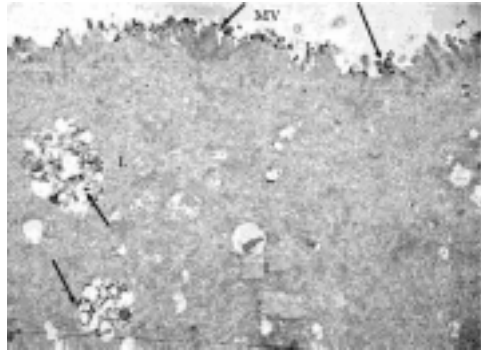


Figure 9. Microscopie électronique par transmission (Gx10.000): cette image présente le pôle apical d'un entérocyte duodéнал. On observe des amas de grains denses localisés au niveau des microvillosités (flèches) ainsi qu'au niveau des lysosomes (L). Les microvillosités (Mv) présentent un raccourcissement très remarquable de leur taille.

L'étude ultrastructurale du duodénum de rat ayant ingéré une solution soluble de chlorure de lanthane suivie 30 minutes plus tard de l'ingestion d'une solution soluble de chlorure de cérium et dont les prélèvements ont été effectués 1 heure après l'ingestion, a montré au niveau des entérocytes des villosités intestinales, la présence de lysosomes se distinguant par des surcharges particulièrement denses aux électrons. On note un raccourcissement très remarquable de la taille des microvillosités comparées à celles observées suite à un gavage unique d'une solution de chlorure de cérium seul (figure1). La même étude montre également la présen-

ce d'amas granulaires relativement denses et qui correspondent à des accumulations intralysosmales localisées en majorité au niveau de la moitié apicale des entérocytes duodénaux

Microscopie ionique analytique :

Figure 10 (A, B, C, et D)

Les images A et B correspondent respectivement à la répartition ionique du ^{23}Na et celle du ^{40}Ca . Ces images n'ont pas un intérêt physiologique particulier, elles permettent tout simplement de repérer la topographie du tissu analysé. Le champ choisi correspond à la présence d'une villosité intestinale complète limitée de part et d'autre par deux autres villosités incomplètes.

Les images C et D réalisées sur les coupes semi-fines de duodénum de rats ayant reçu une solution soluble de chlorure de lanthane suivie 30 minutes plus tard de l'ingestion de chlorure de cérium ont montré la présence de liserés de fortes intensités de lanthane et de cérium soulignant tout le contour de la villosité, allant des glandes de Lieberkühn jusqu'au sommet villositaire.

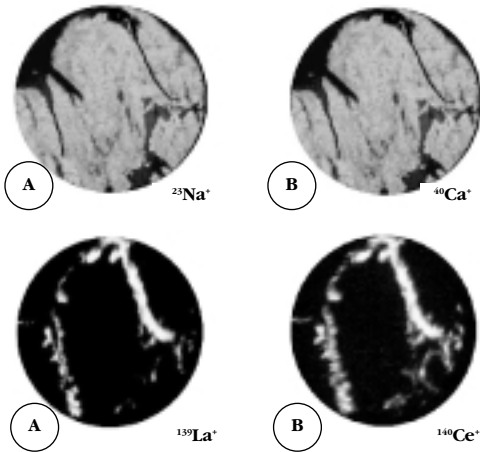


Figure 10. Microscopie ionique analytique (GX400) L'image A montre la répartition du sodium $^{23}\text{Na}^+$. L'image B montre la répartition du calcium $^{40}\text{Ca}^+$. L'image C montre la répartition du $^{139}\text{La}^+$. L'image D montre la répartition du $^{140}\text{Ce}^+$. Au niveau des images C et D, on note des surcharges d'intensité importante soulignant toute la villosité intestinale allant de la partie basale (glandes de Lieberkühn) jusqu'au sommet de la villosité.

Le foie

Microscopie électronique par transmission :

Figure 11

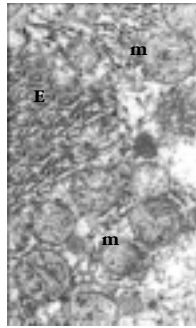


Figure 11. Microscopie électronique par transmission (Gx10.000). Cette planche présente l'étude ultrastructurale d'un hépatocyte. On observe l'ergastoplasme(E) ainsi que les mitochondries (M). Aucun signal n'a été détecté au sein du tissu hépatique.

L'étude ultrastructurale n'a montré aucune présence de dépôts denses aux électrons correspondant au lanthane et au cérium au niveau des différents territoires hépatiques.

Microscopie ionique analytique :

Figure 12 (A, B et C)

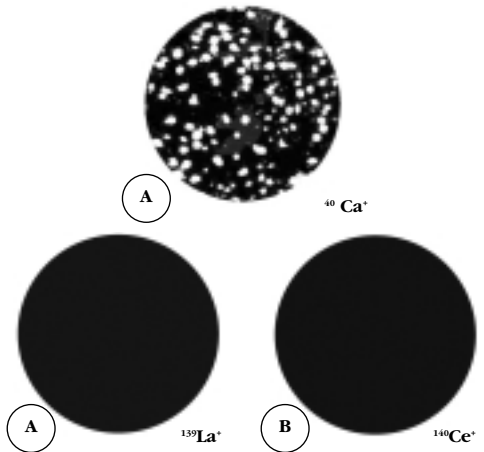


Figure 12. Microscopie ionique (GX400) :l'image A montre la répartition du calcium réalisée à la masse 40. On observe les cellules hépatiques et leurs noyaux. L'image B montre la distribution du lanthane réalisée à la masse 139 au sein du tissu hépatique. L'image C du cérium à la masse 140. Les images B et C ne montrent aucun signal correspondant au La-139 ni au Ce-140 au sein du tissu hépatique. L'étude microanalytique portant sur les coupes semi-fines de foie de rats ayant ingéré du chlorure de lanthane suivi 30 minutes après de chlorure de cérium nous a

permis d'obtenir l'image analytique (12 A), cette image représente la répartition du calcium au sein du foie et ayant pour objectif de reconnaître la topographie du tissu analysé ; c'est ainsi que nous repérons l'emplacement des noyaux cellulaires. Les images (12 B,C) correspondant respectivement aux images de la répartition du ^{139}La et du ^{140}Ce . Ces images n'ont montré aucune présence de ces deux éléments au sein du tissu hépatique analysé.

DISCUSSION

RAPPEL DES TRAVAUX ANTÉRIEURS

Le développement et l'application de méthodes particulièrement sensibles telles que la microanalyse ionique et/ou électronique ont permis de mettre en évidence un phénomène de concentration-précipitation des éléments minéraux dans le lysosome. Ce phénomène a été d'abord démontré au niveau du tube rénal pour l'uranium et l'or^{9,10}, ensuite pour d'autres métaux lourds tels que le chrome¹¹, les éléments du groupe IIIA de la classification périodique : l'aluminium^{12,13,14}, l'indium¹² et le gallium¹⁵, de même que le thorium¹⁶, le zinc¹⁷ et l'hafnium¹⁸. Ce même phénomène a été généralisé pour certains lanthanides comme le cérium^{19,20}, le lanthane^{21,22}, le gadolinium et le terbium^{21,23,24}. Ces éléments précipitent, sous forme de sels de phosphate insolubles, au niveau d'une large variété cellulaire tels que les hépatocytes, les cellules épithéliales des glandes mammaires, les macrophages alvéolaires, ainsi que ceux de la moelle osseuse et de la rate...

S'agissant de l'entérocyte, le même phénomène de précipitations-concentration a été décrit pour la première fois en 1991 pour l'aluminium²⁵. En effet, il a été démontré que l'aluminium (Maalox), administré par voie orale chez l'homme pour le traitement des ulcères gastro-duodénaux, précipite sous forme de phosphate d'aluminium insoluble dans les lysosomes des entérocytes.

Un phénomène similaire, a été ensuite démontré pour d'autres éléments de la classification périodique tels que les lanthanides : le cérium^{20,26}, le lanthane^{22, 26}, l'euprotium et le thulium²⁶ ainsi que deux éléments du groupe IIIA du tableau périodique tels que l'indium et le gallium²⁶. Ces travaux ont montré que ces éléments, administrés par voie orale aux rats, précipitent au niveau de la partie apicale des entérocytes duodénaux.

Ce mécanisme de précipitation sélective des éléments minéraux est dû à l'existence au sein des lysosomes,

de phosphatases acides capables de concentrer sélectivement les éléments minéraux sous forme de sels de phosphates insolubles.

APPORT DE CE TRAVAIL

Nos travaux portant sur la localisation du cérium ou du lanthane, utilisant la microscopie électronique par transmission et la microanalyse ionique confirment les travaux antérieurs portant sur la localisation intracellulaire de ces deux éléments, au niveau des lysosomes de la partie apicale des entérocytes duodénaux 19, 20, 26. Ces mêmes travaux rappellent également ceux obtenus pour d'autres lanthanides lorsqu'ils sont administrés par voie orale, tels que le thulium, l'euprotium, ainsi que d'autres éléments du groupe IIIA tels que l'aluminium, l'indium et le gallium 26.

Toutefois, l'administration de chlorure de lanthane suivie 30 minutes plus tard de l'administration de chlorure de cérium au même rat, révèle des différences aussi bien ultrastructurale que microanalytique. En effet, l'étude ultrastructurale des entérocytes duodénaux, montre la présence, en plus des lysosomes se distinguant par des surcharges particulièrement denses aux électrons, la présence d'amas granulaires qui apparaissent fortement concentrés au niveau des microvillosités duodénales. En outre, cette analyse met en évidence également des anomalies ultrastructurales inhabituelles telles qu'un raccourcissement très remarquable de la taille des microvillosités. De plus, les images microanalytiques ont montré la présence de dépôts de fortes intensités de lanthane et de cérium soulignant le contour de la villosité duodénales allant des cryptes de Lieberkühn jusqu'au sommet villositaire. Ce phénomène observé pour la première fois, pourrait être probablement dû à l'effet cumulatif des deux éléments administrés en même temps.

Par analogie avec les travaux antérieurs obtenus pour le cérium et le lanthane et ayant démontré que ces deux éléments administrés séparément et par voie intrapéritonéale, précipitent sous forme de sels de phosphates insolubles au niveau des lysosomes d'une large variété cellulaire tels que les hépatocytes et les cellules de küppfer, les macrophages alvéolaires, ainsi que ceux de la moelle osseuse et de la rate 19,20, il apparaît fort probable que le même phénomène de concentration-précipitation a eu lieu au

niveau des lysosomes des entérocytes duodénaux. Toutefois, la démonstration directe n'a pas pu être faite ici par la microanalyse par sonde électronique (M.A.S.E), méthode permettant de déterminer la forme chimique sous laquelle nos éléments précipitent, vu la faible quantité de lanthane et de cérium administrée d'une part et des faibles dimensions des lysosomes dans ces cellules particulières d'autre part.

Ce phénomène original de concentration sélective des éléments minéraux, mettant très probablement en jeu une activité enzymatique phosphatase acide, a été d'abord mis en évidence pour un élément toxique : l'aluminium 27. Ce mécanisme est maintenant bien compris. Il a été en effet démontré pour 15 éléments de la classification périodique et a tendance aujourd'hui à se généraliser.

Ce mécanisme a été impliqué pour les deux éléments qu'il s'agisse du lanthane, du cérium ou des deux éléments administrés à la fois. En effet, ce sont les lysosomes des entérocytes duodénaux, grâce à leur activité phosphatase acide qui permettent l'insolubilisation et la séquestration de ces deux éléments sous formes insolubles, limitant ainsi, voire empêchant leur pénétration dans le milieu intérieur. Les entérocytes prennent naissance à la base des villosités et plus précisément au niveau des cryptes de Lieberkühn, atteignent un certain degré de maturité durant leur migration jusqu'au sommet et deviennent alors fonctionnels. A la fin de cette migration, les cellules ayant acquis leur fonctionnalité, meurent naturellement par apoptose et desquamant dans la lumière intestinale puis sont éliminées par voie digestive au bout de 3 jours, temps correspondant à la durée de vie de l'entérocyte.

L'absence du lanthane et du cérium au niveau des cellules hépatiques suite à leur administration orale doit être interprétée à la lumière de nos connaissances actuelles sur l'aspect anatomo-fonctionnel de l'appareil digestif. En effet, malgré la relation très étroite qui existe entre le grêle et le foie, ni le lanthane, ni le cérium n'ont été retrouvés au sein du tissu hépatique, témoin du rôle joué par la muqueuse intestinale en tant que siège de précipitation de tout élément étranger empêchant ainsi son invasion dans le milieu intérieur et jouant de ce fait un véritable volant de sécurité à l'égard des éléments n'ayant pas de rôle physiologique connu.

REFERENCES

- 1- **M.Domellöf, B.Lönnnerdal, K.G. Dewey, R. J. Cohen and O. Hernell** (2004). Iron, zinc, and copper concentrations in breast milk are independent of maternal mineral status. *Am. J. Clin. Nutr.*, **79** (1), 111-115.
- 2- **W.Q.Weï, C.C.Abnet, Y.L.Qiao, S.M.Dawsey, Z.W. Dong, X.D.Sun, J.H.Fan, E.W.Gunter, P.R. Taylor and S.D Mark** (2004). Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. *Am. J.Clin. Nutr.*, **79** (1), 80-85.
- 3- **Y.R.Tang, S.Q.Zhang, Y.Xiong, Y.Zhao, H Fu, H.P. Zhang and K.M .Xiong** (2003). Studies of five microelement contents in human serum, hair, and fingernails correlated with aged hypertension and coronary heart disease. *Biol. Trac Elem Res.*, **92** (2), 97-104
- 4- **T.D.Luckey, R. Hartman and T. Knox** (1979). Lanthanide marker transit times and rates of flow and passage for three meals in humans. *Nutr. Rep. Int.*, **19** (4), 561-71.
- 5- **J.M Haguenoer et D. Furon** (1981). Toxicologie et hygiène industrielle. In : Les dérivés minéraux. 1^{re} partie Ed. *Technique et documentation Publisher. Paris*, **2**, 327-38.
- 6- **C.H. Evans** (1990). Biochemistry of the lanthanides. In *Plenum Press. New York*, 355-68.
- 7- **P. Galle** (1985). La microscopie ionique analytique des tissus biologiques. *Ann. Phys. Fr.*, **10**, 287-305.
- 8 **R. -Hould** (1994). Techniques d'histopathologie et cytopathologie. Edition Maloine, 239-48.
- 9- **P. Galle** (1974). Rôle des lysosomes et des mitochondries dans les phénomènes de concentration et d'élimination d'éléments minéraux (uranium et or) par le rein. *J. Microscopie*, **19**, 17-24.
- 10- **L.Manoubi, M H.Jaafoura, A.Skhir-Zhioua, A. J P. El Hili, Berry and P. Galle** (1994). Subcellular localization of gold in suprarenal, testicle and thyroid glands after injection of allochrysin in rats. *Cell. Mol. Biol.*, **40** (4), 483-7
- 11- **J.P.Berry, J.Houdry, P. Galle and G. Lagrue** (1978). Chromium concentration by proximal renal tubular cells. An ultrastructural microanalytical and cytochemical study. *J. Histochem. Cytochem.*, **26**, 651-57.

- 12- **P. Galle** (1981). Mécanisme d'élimination rénale de deux éléments du groupe IIIA de la classification périodique : l'aluminium et l'indium. Physiologie animale. *C. R. Acad.Sc.Paris, t série III.*, **292**, 91-96.
- 13- **P. Galle** (1983). Localisation ultrastructurale de l'aluminium dans les cellules parathyroïdiennes de malades en dialyse chronique. *Toxicologie C.R. Acad. Sc. Paris, t.*, **296** (3), 545-50.
- 14- **P.Galle, C C. Meyrigna and P. Heine** (1984). Sur la présence d'aluminium en forte concentration dans les neurones d'un malade décédé d'une démence rapidement évolutive. *Toxicologie. C.R.Acad. Sc. Paris, t série III*, **292**, 535-39.
- 15- **J.P.Berry, M.F.Poupon, P. Galle and F. Escaig** (1984). Role of lysosomes in gallium concentration by mammalian tissues. *Biol. Cell.*, **51**, 43-52.
- 16- **PH Hallegot and P. Galle** (1988). Microanalytical study of thorium 232 deposits in bone marrow and liver. *Radiat. Environ. Biophys.*, **27**, 67-78.
- 17- **L.E.A. Rodrigues, C.M.C. Mathia, P. Galle** (1990). Absence of Zinc toxicity. Effect of short-term Zinc oral administration on rat gastric mucosa. *Brazilian.J.Med.Biol.Res.*, **23**, 519-23.
- 18- **J.P. Berry and P. Galle** (1992). Preferential localization of hafnium in nodular lymphatic cells. Study by electron microprobe. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **24** (1), 15-18.
- 19- **J.P. Berry, R.Masse, F. Escaig and P. Galle** (1989). Intracellular localization of cerium. A microanalytical study using an electron microprobe and Ionic
- 20- **L. Manoubi, N. Hocine, M H. Jaafoura, A. El Hili and P. Galle** (1998). Subcellular localization of cerium in intestinal mucosa, liver, kidney, suprarenal and testicle glands after cerium administration in the rat. *J. Trace and Microprobe Techniques*, **16** (2), 209-19.
- 21- **N. Hocine, M.H. Jaafoura, J.P. Berry and P. Galle** (1994b). Intracellular localization of gadolinium, lanthanum and terbium. Three rare earths. A microanalytical study using ion microanalysis and an electron microprobe. Metal Ion In Biol and Med. Eds Ph. Collyer L. A. Poirier, N.A Littlefield., J.C. Etienne. John Libbey Eurotext.Paris, 193-98.
- 22- **L. Manoubi-Tekaya, N. Hocine AND P. Galle** (2000). Rôle des lysosomes dans le comportement intracellulaire d'éléments minéraux: cas du lanthane. *Tunis. Méd.*, **78** (3), 195-200.
- 23- **N Hocine, J.P Berry, F. Escaig and P. Galle** (1994a). Mapping and localization of gadolinium. A study using ion microanalysis and Electron microprobe. Les éditions de physique, 841-42.
- 24- **N. Hocine, J.P. Berry, M. H.Jaafoura, F. Escaig, R. Masse and P. Galle** (1995). Subcellular localization of gadolinium injected as a soluble salt in rats: A microanalytical study. *Cell. Mol. Biol.*, **41**(2), 271-78.
- 25- **C. Florent, B. Desaint, C. Legendre, P. Chappuis, P. Galle, J. Goboudeau, D.E. Capucine and M.D. Meynard** (1991). Morphologic and ultrastructural effects of Maalox TC on human gastric and duodenal mucosa. *J. Clin. Gastroenterol.*, **13** (suppl 1), S139-S44.
- 26- **C. Florent, L. Tekaya, F. Escaig, L. Labejof, G. Mouthon and P. Galle** (2001). Analytical microscopy observations of rat enterocytes after oral administration of soluble salts of lanthanides, actinides and elements of group III-A of the periodic chart. *Cell. Mol. Biol.* (Noisy-le-grand), **47** (3), 419-25.
- 27- **J.P. Berry, J. Hourdy, G. M .Sternberand P. Galle** (1982). Aluminium phosphate visualisation of acid phosphatase activity. A biochemical and X-ray microanalysis study. *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 86-90.

CHRONIC IODINE OVERLOAD AND APOPTOSIS IN COLD NODULES FROM ENDEMIC MULTINODULAR GOITERS

MV EL MAY^{1*}, S ZEKRI¹, S BOUBAKER², A LADGHAM³ AND A EL MAY³

¹ Faculty of Medicine, Tunis Tunisia

² Pasteur Institute – Electron Microscopy Unit Tunis Tunisia

³ Salah Azaiz Institute, Tunis Tunisia

* Corresponding author

E-mail : elmay_michele@yahoo.fr

RESUME

La présence d'apoptose et de nécrose a déjà été montrée dans des goitres expérimentaux en évolution et en involution, nous les avons étudiées dans des pièces de thyroïdectomie de dix patients tunisiens porteurs d'un goitre endémique multinodulaire. Cinq de ces patients avaient reçu une surcharge iodée chronique durant six mois.

Les noyaux des thyrocytes en apoptose ont été dénombrés sur des coupes semi-fines colorées à l'hématoxyline-éosine. La technique d'immunopéroxydase pratiquée sur coupes en paraffine a permis de visualiser les protéines bcl-2 et bax, et de comptabiliser les capillaires CD34 positifs. Nous avons également observé des coupes ultra-fines en microscopie électronique.

Après six mois d'une prise d'iode quotidienne, les thyrocytes en apoptose sont dix fois plus nombreux et le nombre de cellules endothéliales marquées par le CD34 est diminué de moitié. Les cellules folliculaires n'expriment plus le bcl-2 alors qu'une immunoréactivité avec un anticorps anti bax est apparue dans les cellules folliculaires thyroïdiennes et les cellules endothéliales. Chez les patients qui ont reçu de l'iode, la présence de nombreuses cellules folliculaires et endothéliales en apoptose est confirmée par l'observation en microscopie électronique.

Un excès chronique d'iode entraîne l'apoptose et la nécrose des cellules folliculaires et endothéliales de la thyroïde, ce qui conduit à l'accumulation de thyroglobuline dans le tissu conjonctif thyroïdien.

Mots clefs : bcl-2, bax, apoptose, angiogenèse, CD34, goitre endémique, iode.

ABSTRACT

As apoptosis and necrosis are known to exist during experimental goiter development and involution, we studied them in ten Tunisian multinodular endemic goiters, five of them having received a chronic excess of iodine during six months.

Apoptotic thyrocyte nuclei have been counted on hematoxylin-eosin stained semi-thin sections. Using immunoperoxidase on paraffin sections, bcl-2 and bax immunoreactivities have been evidenced, and CD34 positive microvessels counted; ultra-thin sections have also been observed.

After six months of iodine overload, apoptotic thyrocytes were ten times more numerous; CD34 positive endothelial cells were diminished by one half, bcl-2 immunoreactivity disappeared in thyrocytes and a bax one appeared in thyroid follicular and endothelial cells. Presence of numerous apoptotic follicular and endothelial cells was confirmed using electron microscopy.

Chronic iodine excess induces apoptosis and necrosis of thyroid follicular and endothelial cells, leading to thyroglobulin accumulation in connective tissue.

Key words: bcl-2, bax, apoptosis, angiogenesis, CD34, endemic goiter, iodine.

INTRODUCTION

The northwestern part of Tunisia has been considered as an endemic area because of a mild iodine deficiency¹. Iodine supplementation has been implemented in order to prevent endemic goiter. But to reduce goiter volume, usual treatment consists in administration of thyroid hormones or of iodine, especially in children. Cell death is thought to play a central role in reducing cell mass during goiter involution as necrosis and apoptosis during this involution have been described in different animal and in vitro systems². Numerous proteins regulate apoptosis, a physiological process of cell death. Some of them, as bcl2 protein, protect cells from apoptosis, while others as bax induce death by apoptosis. Recently, it has been suggested in rats that cell death during goiter involution not only concerns thyrocytes but also stromal and vascular cells^{2,3}.

We examined fragments of nodules from ten Tunisian patients with an endemic multinodular goiter, five of them having received a chronic excess of iodine during six months, in order to study apoptosis.

MATERIALS AND METHODS

The patients were introduced in the study with their consent, and underwent surgery. Five of them did not receive any medication (Group 1) ; the others received Lugol's solution daily (3.8 mg/day iodine) during six months before surgery (Group 2). All were euthyroid and had a large multinodular goiter, with cold nodules on scintigraphy. Details have been already published 4. For each patient, three different histological techniques have

been applied to fragments of nodules. Some fragments were fixed in formalin and embedded in paraffin to be processed with immunoperoxidase. Other fragments were fixed in a solution containing 1g/L glutaraldehyde and 20 g/L paraformaldehyde in a cacodylate buffer (0.1M, pH 7.4). And them some of them were embedded in Histo-resin and semi-thin sections were stained with hematoxylin-eosin for counting apoptotic thyrocytes while others were postfixed in a solution of 1% osmium tetroxide in a phosphate buffer (0.1M, pH 7.4) and processed for electron microscopy. Each hematoxylin-eosin stained section was examined at a magnification of x400. The number of apoptotic thyroid follicular cells in different fields was expressed as a percentage of the total number of counted thyrocytes (about 1 000) (intra observer variation : 1.8%). The adopted criteria to identify apoptotic cells were : heterochromatin condensation, irregular shrunken nucleus and eosinophilic cytoplasm. For immunoperoxidase, an indirect method with streptavidin-biotin (Dako, Denmark) was performed after microwave pretreatment. The following antibodies were used (Immunotech, France): anti bcl-2, anti bax , and anti CD 34, an antigen associated with angiogenesis⁵. CD 34 immunoreactive microvessels were quantified according to Bossi *et al.*⁶. On each section, the four most vascularized areas were selected, and the microvessels in a x 400 field of these four areas were counted; large vessels were not counted. Clusters of endothelial cells with or without a lumen were considered as individual vessels. Microvessel counts were expressed as the number (median; mean ± SE) of immunoreactive vessels per field.

Table 1 : Apoptotic thyroid follicular cells and CD34 positive microvessels in human multinodular goiters.

Percentages of apoptotic thyrocytes and number of CD34 positive microvessels (mv) per field are given in medians with minimal and maximal values in brackets. Five multinodular goiters per group have been considered.

	THYROCYTES			MICROVESSELS
	% of apoptotic nuclei	immunoreactivity		number of CD34+ mv per field
		anti bcl-2	anti bax	
GROUP 1	0.9 %	+++	-	66.5*
Without iodine	(0.6 – 1.1 %)			(26 – 180) mean = 47 SE = 4
GROUP 2	9 % *	-	++	35*
3.8 mg iodine/day during 6 months	(4 – 15 %)	(+ in 1 case)		(15 – 133) mean = 86 SE = 8

* highly significant difference (Student's t test : p < 0.001)

RESULTS

Results are shown in Table I and Figures 1 and 2.

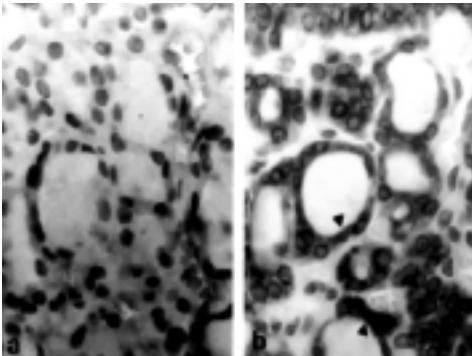
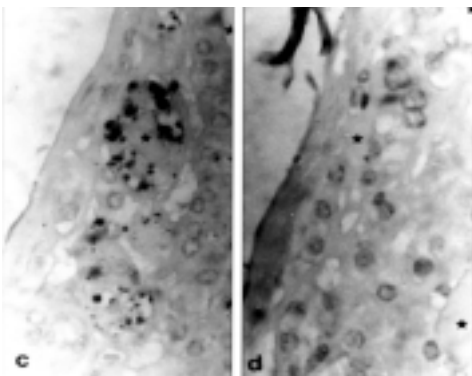


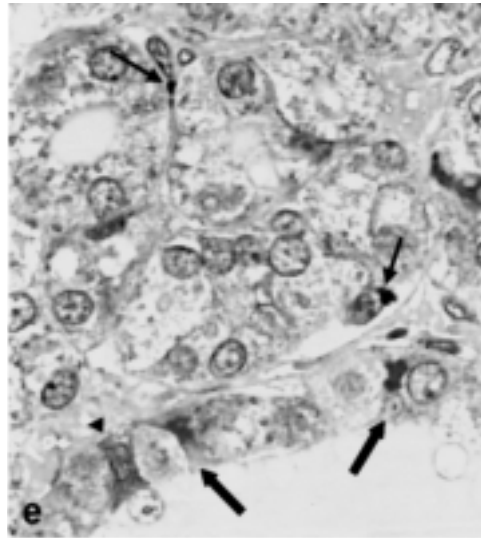
Figure 1: Immunohistochemical evidence of iodine overload effects on *bcl-2*, *bax* and *CD34* expression in endemic multinodular goiters

a, b: homologous fields on serial contiguous sections of a goiter without iodine overload – *a*: anti *bax*; *b*: anti *bcl-2* (arrowheads show stained cytoplasm in thyroid follicular cells) Gt: x 400

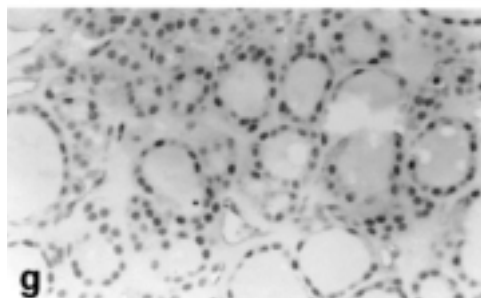
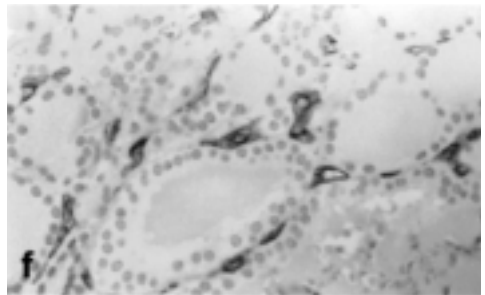


c, d: homologous fields on serial contiguous sections of a iodine overloaded goiter – *a*: anti *bax*; *b*: anti *bcl-2* (stars showing the same follicular lumina) Gt: x400

On hematoxylin-eosin stained sections, more apoptotic thyroid follicular cells were seen after chronic iodine overload. Some of them were detached into follicle lumen. In Group 1, the percentage of apoptotic thyroid follicular cells had a median of 0.85 % against 9.2 % in Group 2. Group 1 sections showed a strong cytoplasmic anti *bcl-2* immunoreactivity in all follicular cells (Fig. 1b) and none anti-*bax* (Fig. 1a). By



e: *bax* immunoreactivity in an iodine overloaded goiter (thin arrows: *bax* immunoreactive granules in endothelial cells; arrowhead: uniformly stained cytoplasm of an apoptosis undergoing follicular cell; thick arrows: two follicular cells in a late apoptosis stage with dense irregular nucleus and unstained cytoplasm. Note the presence of numerous huge stained granules in almost all follicular cells. Gt: x 1 000



f, g: *CD34* expression in endemic multinodular goiters – *f*: without iodine treatment; *g*: with iodine overload. Gt: x 400

contrast, after iodine overload, anti-bcl-2 immunoreactivity disappeared (Fig. 1d) and a marked anti-bax immunoreactivity appeared in numerous follicular (Fig. 1c and e) and endothelial cells (Fig. 1e), usually located in irregular granules. An uniform anti-bax immunoreactivity was evident in some shrunken follicular cells with a dense nucleus. It was evident that with cytoplasm and nucleus shrinkage, uniform anti-bax stain disappeared, nucleus became denser and indented, suggesting last apoptosis stages. In some follicles, almost all the cells were stained with anti-bax antibody.

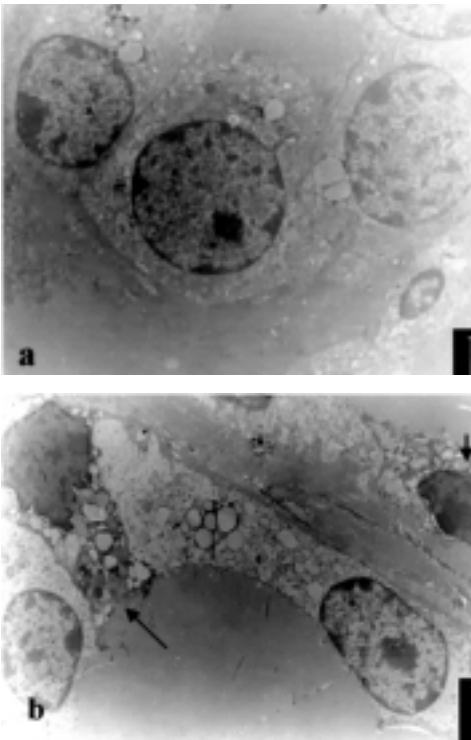
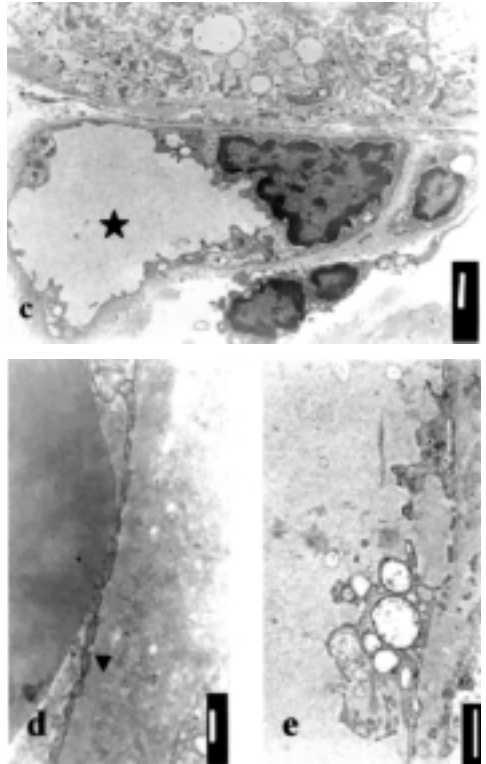


Figure 2: Ultrastructure of endemic multinodular goiters without (a,d) and with iodine treatment (b,c,e)
 a,b: follicular cells (arrows: apoptotic cells with shrunken cytoplasm and dense irregular shrunken nucleus showing enlarged nuclear envelope space)

Anti-CD34 immunoreactivity was strong in Group 1 (Fig. 1f) and stained a dense capillary network around thyroid follicles; it lined the whole capillary lumen. In Group 2, immunoreactivity was faint and,

when present, usually located to a small part of the endothelium; some microvessels were entirely negative (Fig. 2g), so staining was less dense than in Group 1. Immunoreactive microvessels were twice more numerous in Group 1 (median = 66.5%) than in Group 2 (median = 35%) and the difference was highly significant ($p < 0.001$).



c,d,e: endothelial cells (c - star: microvessel lumen lined by an apoptosis undergoing cell with long processes containing organelles; d,e: detail of cytoplasm - arrowheads: pores in endothelial cells showing enlargement after iodine treatment)

On ultrathin sections from Group 2, necrotic and apoptotic thyroid follicular (Fig. 2b) and endothelial cells (Fig. 2c) were frequently found, along with normal cells (Fig. 2a). In apoptotic cells, nuclei were small, irregular, sometimes fragmented, with a dense chromatin, a detached nuclear envelope and a shrunken cytoplasm. Usually, more than two such cells were present per follicle while no such thyroid follicular cells were found in Group 1 (Fig. 2a). Endothelial cells showed intense cell membrane bleb-

bing (Fig. 2c, e), consisting in long processes to the lumen containing vesicles or altered mitochondria (Fig. 2e). Compared to normal endothelium (Fig. 2d), basal lamina fenestrations were enlarged (Fig. 2e) and some endothelial cells have disappeared, just leaving their basal lamina, suggesting cell death.

DISCUSSION

Despite the small number of endemic goiters considered in our study, we found that without iodine ingestion the percentage of apoptotic follicular cells was as low as in normal thyroids ($0.4\% \pm 0.6$) and that in both cases, thyroid follicular cells had the same bcl-2 and bax immunoreactivity pattern⁷. A high bcl-2 expression level in fine-needle aspiration biopsy from adenomatous nodules has been already found⁸, which is in accordance with our result since our endemic goiters are multiadenomatous.

After iodine overload, apoptotic thyroid follicular cell number was about ten times higher. Our results suggest that a chronic iodine excess induces apoptosis by suppressing bcl-2 protection and activating bax expression. They are in accordance with other results from experimental systems, showing that necrosis and apoptosis levels are higher during goiter involution than during goiter development². Bcl-2 expression disappearance has been described by others³, but we showed that, in the same time, bax expression appears in thyroid follicular cells, suggesting a rupture in the balance between the different proteins involved. When submitted to hydrogen peroxide production, primary culture pig thyrocytes no longer expressed bcl-2 and increased their bax content⁹ so that, in our study, iodine did not act by itself but by hydrogen peroxide overproduction related to overload.

Electron microscopy showed endothelial cell alterations in our treated patients, and bax immunoreactivity appeared in these cells. Using CD 34, a specific marker of a cell surface angiogenesis associated antigen^{5,10}, we evidenced the presence of numerous immature endothelial cells in goiter, as active angiogenesis is known to exist in goiter¹¹; after iodine overload, their number decreased. These results are in favour of apoptosis and must be compared with the high percentage of apoptotic and necrotic non identified cells found in interstitium of mice and rat involuting goiters by others^{2,3}.

Diminution of goiter volume after iodine treatment may be linked to modifications of the level of pro- and anti-apoptotic regulatory proteins. Our endemic multinodular goiter patients received a very high daily dose of iodine for a period of six months. We previously showed that organified iodine is stored inside thyroid follicle lumina and between follicles in these same cold nodules⁴ and that this organified iodine is probably linked to a thyroglobulin-like molecule¹². Apoptosis and necrosis of thyroid follicular cells may explain such a «thyroglobulin» accumulation in thyroid stroma – a high rate of apoptosis in a follicle leading to rapid death of many thyrocytes, and a thyroglobulin deposit between neighbouring follicles. Death of endothelial cells may also contribute to this accumulation since thyroglobulin cannot reach microvessel lumina and blood circulation because of microvessel alterations, leading to the decrease of serum thyroglobulin concentrations we evidenced in these same patients¹². Consequently, thyroid mass decreases, and iodine is stored in thyroid connective tissue, representing a storage compartment available for a delayed release when needed for hormone synthesis. This could explain why iodine treatment of goiters offers the further benefit of a sustained effect after therapy cessation, contrary to L-thyroxin therapy^{13,14}. But goiter shrinkage is probably due not only to apoptosis and necrosis of thyroid follicular and endothelial cells but also to connective tissue reduction.

Thyroid follicular cells apoptosis contributes to autoimmune thyroid diseases^{15,16} and hyperthyroidism¹⁷, both occurring in case of iodine consumption troubles, and in thyroid cancer¹⁸. In these pathologies, along with numerous proteins, Bcl-2 family usually is concerned in terms of bcl-2 under expression. In our study, endothelial cell death is related to iodine overload, which may be a possible way of angiogenesis inhibition in other diseases as cancer^{19,20}, considering that new cancer therapy protocols are testing association of chemotherapeutic and anti angiogenic agents.

ACKNOWLEDGMENT

We are very grateful to all technical assistance we benefited, particularly from Mrs R. Ghozzi, S. Cherni and R. Snene.

REFERENCES

- 1– **MV. El May, A. Kraiem, T. Messaoud, S. Fattoum, M. Kammoun, H. Zouaghi et al.** (1994). Puzzling biochemical thyroid profile in patients with multinodular goitre originating from a mild iodine deficient area in Tunisia. *Thyroidol. Clin. Exp.*, **6**, 61-67.
- 2– **JF. Mutaku, JF. Poma, MC. Many, JF. Denef and MF. Van Den Hove** (2002). Cell necrosis and apoptosis are differentially regulated during goitre development and iodine-induced involution. *J. Endocrinol.*, **172**, 375-386.
- 3– **VA. Patel, DJ. Hill, MC. Sheppard, JF. Wang, A. Logan and MC. Eggo** (2000). Apoptosis during goitre involution – the role of Bcl-2. *J. Endocrinol.*, **164**, 323-330.
- 4– **MV. El May, J. Jeusset, A. El May, S. Mtimet and P. Fragu** (1996). Evidence of iodine storage within stroma after iodine treatment : imaging by ion mass spectrometry (SIMS) microscopy in goitrous tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 2370-75.
- 5– **L. Fina, HV. Molgaard, D. Robertson, NJ. Bradley, P. Managham, D. Delia et al.** (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, **75**, 2417-2426.
- 6– **P. Bossi, G. Viale, AKC. Lee, RM. Alfano, G. Coggi and S. Bosari** (1995). Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Canc. Res.*, **55**, 5049-5053.
- 7– **M. Koga, Y. Hiromastu, A. Jimi, S. Toda, N. Koike and K. Nonaka** (1999). Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax and bak expression in thyroid glands from patients with subacute thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 2221-5.
- 8– **M. Andrikoula, G. Vartholomatos, GT. Tsangaris, M. Bafa, F. Tzortzatou, A. Stathopoulou and T. Satsoulis** (2001). Fas and bcl-2 protein expression in thyrocytes of patients with nodular goiter. *Eur. J. Endocrinol.*, **145**, 403-407.
- 9– **C. Riou, H. Tonoli, F. Bernier-Valentin, R. Rabilloud, P. Fonlupt and B. Rousset** (1999). Susceptibility of differentiated thyrocytes in primary culture to undergo apoptosis after exposure to hydrogen peroxide : relation with the level of expression of apoptosis regulatory proteins, bcl-2 and bax. *Endocrinology*, **140**, 1990-7.
- 10– **T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li et al** (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, **275**, 9642-9647.
- 11– **VA. Patel, DJ. Hill, MC. Eggo, MC. Sheppard, GP. Becks and A. Logan** (1996). Changes in the immunohistochemical localisation of fibroblast growth factor-2, transforming growth factor-beta-1 and thrombospondin-1 are associated with early angiogenic events in the hyperplastic rat thyroid. *J. Endocrinol.*, **148**, 485-499.
- 12– **MV. El May, A. El May, H. Zouaghi, A. Kammoun, P. Fragu and S. Mtimet** (1997). Thyroglobulin-like immunoreactivity within goitrous thyroid stroma after iodine overload. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 3518-3520.
- 13– **G. Hintze, D. Emrich and J. Köbberling** (1989). Treatment of endemic goiter due to iodine deficiency with iodine, levothyroxine or both : results of a multicentric trial. *Eur. J. Clin. Invest.*, **19**, 527-534.
- 14– **D. Einkenkel, KH. Bauch and G. Benkar** (1992). Treatment of juvenile goiter with levothyroxine, iodine or combination of both : the value of ultrasound grey-scale analysis. *Acta Endocrinologica*, **127**, 301-306.
- 15– **PL. Arscott and JR. Baker** (1998). Apoptosis and thyroiditis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **87**, 207-217.
- 16– **LJ. Hammond, MW. Lowdell, PG. Cerrano, AW. Goode, GF. Bottazzo and R. Mirakian** (1997). Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *J. Pathol.*, **182**, 138-144.
- 17– **M. Ludgate and B. Jasani** (1997). Apoptosis in autoimmune and non autoimmune thyroid disease. *J. Pathol.*, **182**, 123-124.
- 18– **S. Pilotti, P. Collini, F. Rilke, G. Catorretti, R. B. Del and MA. Pierotti** (1994). Bcl-2 protein expression in carcinomas originating from the epithelium of the thyroid gland. *J. Pathol.*, **172**, 337-342.
- 19– **HJ. Lenz** (2005). Antiangiogenic agents in cancer therapy. *Oncology*, **19**, 17-25.
- 20– **HM. Verheul, and HM. Pinedo** (2005). Inhibition of angiogenesis in cancer patients. *Exper. Opin. Emerg. Drugs.*, **10**, 403-412.

LEAD AND CADMIUM CONCENTRATIONS IN SEAWATER AND ALGAE OF THE TUNISIAN COAST

M. EL ATI-HELLAL¹, A.HEDHILI², F. HELLAL³, K. BOUJLEL¹, M. DACHRAOUT¹,
M. BOUSNINA², H. GHORBEL² AND M. NDHIF⁴

¹ Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Tunis, Tunisia.

² Laboratory of Toxicology, Unity of Toxicology Research and Environment 99/UR/070, Tunis, Tunisia.

³ National Institute of applied Sciences and Technology, Department of chemistry, Tunis, Tunisia.

⁴ Direction of Hygiene and Environmental Protection, Tunis, Tunisia.

* Corresponding author

E-mail: mfb22002@yaboo.fr

RESUME

Le plomb et le cadmium sont des métaux traces toxiques, même à de très faibles concentrations. L'objectif de ce travail était d'estimer la pollution par le plomb et le cadmium de divers sites du littoral tunisien, et de vérifier la possibilité de modification du pouvoir bioaccumulateur des algues selon les conditions physico-chimiques de l'eau. Notre étude a concerné 99 échantillons d'algues et 99 échantillons d'eau de mer, prélevés à divers sites du littoral tunisien. L'analyse a été réalisée par spectrométrie d'absorption atomique (four graphite). Concernant les algues, la station de Sfax a présenté les concentrations les plus élevées en plomb, les plus faibles teneurs ont été enregistrées aux sites de Sousse. Pour l'eau de mer, les taux les plus hauts de plomb ont été observés aux sites de Bizerte, Mahdia et Sfax, et ceux de cadmium, aux côtes de Bizerte et Médénine.

La côte de Bizerte semble la zone la plus exposée à la pollution. En fait, l'intensification du trafic maritime pourrait prendre place dans cette pollution car les hydrocarbures provenant du pétrole contiennent du plomb tétraéthylique caractérisé par sa grande toxicité. La région de Sousse est la moins polluée ; ceci est peut-être dû à un développement du tourisme et à une stricte régulation de la pollution dans ce district.

Mots clefs : Plomb, cadmium, algues, eau de mer, côte Tunisienne

ABSTRACT

Both lead and cadmium are toxic trace metals, even in very weak concentrations. The aim of this study was to estimate lead and cadmium pollution in various sites of the Tunisian coast and to verify the possibility of modification of the algae bioconcentration power according to water physico-chemical conditions. Our study concerned 99 samples of algae and 99 samples of seawater, taken in different sites of the Tunisian littoral. The analysis was realized by atomic absorption spectrophotometry (oven graphite). In algae, Sfax site presented the highest concentrations of lead when Sousse site showed the lowest ones. In seawater, the most amounts of lead were observed in Bizerte, Mahdia and Sfax sites, and those of cadmium in Bizerte and Medenine coasts.

Bizerte's coast seems to be the most exposed zone to pollution. Indeed, the intensification of sea traffic may take place on this pollution because hydrocarbons derived from petroleum contain some tetraethyl lead characterised by its great toxicity. Sousse's region is the least polluted zone; it might be due to the development of tourism and a strict regulation of pollution in this district.

Key words: Toxic metals, algae, seawater, pollution, Tunisian coast.

INTRODUCTION

Lead, as cadmium has never been identified as an essential element nutritionally or physiologically in either humans or other organisms¹. Both are toxic, bioaccumulative, and like all other metals, they are persistent^{2, 3, 4, 5}. However, in recent times, as a result of high population growth accompanied by intensive urbanisation and increase in industrial activities, there has been a steady increase in the quantity and diversity of discharges that generated the contamination of aquatic environment particularly by these heavy metals. Indeed, they intervene in various industrial processes such as use of paints, pesticides, plastic material and electro-plating industries, etc^{6, 7}.

Problems associated to the toxic effects of these environmental pollutants, were at first developed in the industrially advanced countries, because of their more important industrial draining and especially after a mercury and cadmium pollution generating accidents in Sweden and Japan^{8, 9, 10}. In less developed regions as Africa, there is an increasing awareness of a necessary adequate waste collection, treatment and disposal facilities to reduce the toxicity of urban and industrial pollution in the environment^{6, 8}.

A follow-up of lead and cadmium concentrations in the marine environment is then evident to prevent overtaking of tolerated limits.

In the present work, we tried to estimate the Tunisian coast state of pollution by lead and cadmium using algae as biological indicators. In this case, we took water samples in which we analysed the two heavy metals to have an idea about the bioconcentration extent in these marine organisms.

The specific objectives of the study are: **i**) to estimate pollution impact on the heavy metals (lead and cadmium) concentrations in algae; **ii**) to verify the possibility of modification of the algae bioconcentration power according to water physico-chemical conditions; **iii**) to look if there is a correlation between water and algae metal amounts.

MATERIALS AND METHODS

SAMPLING

99 algae and 99 seawater samples were cut off in seven points of the Tunisian coast, inside Bizerte, Ariana, Ben Arous, Sousse, Mahdia, Sfax and Medenine districts (table1).

Table 1: Locations and sampling points of algae and seawater in the Tunisian coast

DISTRICT	SECTOR	SAMPLING POINT
BIZERTE	Bizerte Nord	Sidi Salem
	Channel	Channel of Bizerte
	Hechana	Sidi Hechani
	Menzel Bourguiba	Socomina
ARIANA	Ras Jabel	Bni Atta beach
	Raoued II	Chotrana
	Gammarth	In front of Sable d'or hotel
BEN AROUS	Gammarth	In front of police station
	Rades	In front of civil Protection
	Ezzahra	In front of la Siesta
	Hammam- Lif	M'hamed Ali Snoussi street
SOUSSE	Hammam-Chatt	In front of the Higher Institute of youth Bir El Bey
	Hergla	Graap Saad 1
	Souyah	Asdrubal hotel
	Sousse Medina	Salam hotel - Fourrie beach
MAHDIA	Souassi	Gaied beach
	Tourist zone	Thapsus hotel beach
	Tourist zone	Cap Serail hotel beach
	Tourist zone	Mahdia center beach
SFAX	Rejjich	Comiche Rejjich hotel beach
	Kerkennah	Farhat
	Mahares	In front of Ancient Casino Chaffar
	Mahares	In front of house of young Chaffar
	Sfax city	Swimming Club
	Sakiet Daier	In front of Sidi mansour market
MEDENINE	Aguereb	In front of gargour station
	Sidi makhlouf	El Grine
	Djerba	Guellala
		Ulysse hotel beach
		Aghir
		Sangho hotel beach
	Zarzis	Zarzis harbour

In order to obtain more reliable results, samples were collected in each station from several points within area of approximately 15 m diameter. They were then homogenized to form representative samples of the sampling stations.

The sampling was realized in three levels of depth: surface, middle - depth and 20 cm above the seabed.

In fact, chemical composition, light, temperature and tides vary according to the marine depth, and consequently the variety of alga and its heavy metals accumulation power are influenced^{11, 12}.

SEAWATER SAMPLING CONDITIONS

Sampling deep water was made by means of polyethylene or polypropylene-sampling bottles, with a screw corking, that were came down in the required depth and closed at distance. These bottles were preserved in iceboxes and transported until the laboratory.

Samples were filtered boorishly with a filter paper of which pores diameter varied from 50 to 200 μm , and then they were acidified to master the adsorption of certain elements on internal walls of the sampling flasks. Neutralization was made by addition of concentrated hydrochloric acid to lower the pH from 8,5 to 2. Maximum of information was noted in every station or site of sampling; it was about general observations or data directly linked to the sampling as temperature, bottling and possible pre-treatment of samples.

ALGAE SAMPLING CONDITIONS

Algae samples were placed in plastic bags, preserved at a temperature of +4°C and forwarded the same day of sampling to the laboratory, where they were stored at a temperature of -20 °C (to avoid dehydration), waiting for the heavy metals analysis.

ALGAE SPECIES

Table II presents the various sorts of algae taken along the Tunisian coast.

Six sorts of green algae were used: *Enteromorpha*, *Ulva lactuca*, *Codium bursa*, *Cladophora*, *Codium fragile* and *Chaetomorpha*. Only one sort of brown alga, *Fucus vesiculosus*, was collected on the coasts of the Centre and the South of the country (Mahdia, Sfax and Medenine districts).

HEAVY METALS ANALYSIS

Algae heavy metals analysis was preceded by a mineralization to destroy organic matter and keep heavy metals in their most oxide ionic state. Ten millilitres of 70% analar grade HNO_3 were added to the dried

Table II : Sorts of algae collected from the coasts of Tunisia

Sampling sites	Algae species			
	NAME	CLASS	ORDER	FAMILY
Bizerte	<i>Enteromorpha</i>	Chlorophyceæ	Ulval	Ulvaceæ
	<i>Codium Bursa</i>	Chlorophyceæ	Codial	Codiaceae
	<i>Ulva lactuca</i>	Chlorophyceæ	Ulval	Ulvaceæ
Ariana	<i>Codium Fragile</i>	Chlorophyceæ	Codial	Codiaceae
	<i>Cladophora</i>	Chlorophyceæ	Cladophoral	Cladophoraceae
Ben Arous	<i>Ulva lactuca</i>	Chlorophyceæ	Ulval	Ulvaceæ
	<i>Codium Bursa</i>	Chlorophyceæ	Codial	Codiaceae
	<i>Cladophora</i>	Chlorophyceæ	Cladophoral	Cladophoraceae
	<i>Codium Fragile</i>	Chlorophyceæ	Codial	Codiaceae
	<i>Chaetomorpha</i>	Chlorophyceæ	Cladophoral	Cladophoraceae
Sousse	<i>Chaetomorpha</i>	Chlorophyceæ	Cladophoral	Cladophoraceae
	<i>Enteromorpha</i>	Chlorophyceæ	Ulval	Ulvaceæ
	<i>Codium Bursa</i>	Chlorophyceæ	Codial	Codiaceae
	<i>Ulva lactuca</i>	Chlorophyceæ	Ulval	Ulvaceæ
Mahdia	<i>Fucus vesiculosus</i>	Pheophyceæ	Fucal	Fucaceæ
Sfax	<i>Enteromorpha</i>	Chlorophyceæ	Ulval	Ulvaceæ
	<i>Fucus vesiculosus</i>	Pheophyceæ	Fucal	Fucaceæ
	<i>Cladophora</i>	Chlorophyceæ	Cladophoral	Cladophoraceae
	<i>Ulva lactuca</i>	Chlorophyceæ	Ulval	Ulvaceæ
	<i>Codium Bursa</i>	Chlorophyceæ	Ulval	Ulvaceæ
Medenine	<i>Fucus vesiculosus</i>	Pheophyceæ	Fucal	Fucaceæ
	<i>Ulva lactuca</i>	Chlorophyceæ	Ulval	Ulvaceæ
	<i>Enteromorpha</i>	Chlorophyceæ	Ulval	Ulvaceæ

samples and the mixture was left all the night. After drying the ashes by heating, 3 to 5 ml of oxygenic water were added until the solution began uncoloured. The solution was dried once again and the residue was extracted three times with 3 ml of 5% analAR grade HNO₃. The extract was raised to 10 ml and put in polystyrene tube.

The two studied metals were quantitatively extracted from seawater, by association of ammonium pyrrolidone dithiocarbamate complexant and organic solvent methylisobutylketone (APDC-MIBK) at pH 3.5. Their determination was made by Atomic Absorption Spectrophotometry with oven graphite directly on the obtained solution.

Table III : Lead and cadmium concentrations in algae and seawater of various sampling sites

Region		Lead		Cadmium	
		Algae (µg/g dry weight)	Seawater (µg/ml)	Algae (µg/g dry weight)	Seawater (µg/ml)
Bizerte	Mean	0.0044	0.1165	0.3440	0.0051
	Standard Deviation	0.0016	0.0160	0.1811	0.0025
	Min	0.0001	0.0842	0.1150	0.0018
	Max	0.0544	0.1403	0.7090	0.0090
	Number	15	15	15	15
Ariana	Mean	0.0020	0.0842	0.3462	0.0023
	Standard Deviation	0.0008	0.0175	0.0716	0.0014
	Min	0.0011	0.0468	0.2491	0.00018
	Max	0.0032	0.1029	0.4730	0.0042
	Number	9	9	9	9
Ben Arous	Mean	0.0013	0.0542	0.7320	0.0027
	Standard Deviation	0.0007	0.0188	0.2256	0.0017
	Min	0.0002	0.0281	0.3294	0.0006
	Max	0.0022	0.0774	1.0952	0.0063
	Number	12	12	12	12
Sousse	Mean	0.0010	0.0898	0.2097	0.0011
	Standard Deviation	0.0005	0.0147	0.0642	0.0006
	Min	0.0006	0.0655	0.1158	0.0004
	Max	0.0022	0.1123	0.3171	0.0024
	Number	15	15	15	15
Mahdia	Mean	0.0020	0.1286	0.9750	0.0021
	Standard Deviation	0.0008	0.0317	0.2661	0.0011
	Min	0.0011	0.0936	0.3531	0.0009
	Max	0.0034	0.1778	1.2506	0.0049
	Number	12	12	12	12
Sfax	Mean	0.0085	0.1182	4.6889	0.0038
	Standard Deviation	0.0045	0.0229	3.8054	0.0032
	Min	0.0013	0.0842	0.3851	0.0004
	Max	0.0181	0.1590	12.5470	0.0107
	Number	18	18	18	18
Medenine	Mean	0.0015	0.0918	1.5340	0.0023
	Standard Deviation	0.0008	0.0028	1.0881	0.0014
	Min	0.0003	0.0468	0.3125	0.0011
	Max	0.0035	0.1403	4.2761	0.0081
	Number	18	18	18	18

The detection limits obtained were 0.05 µg/l for Cd and 0.1 µg/l for Pb.

RESULTS

The two tested heavy metals did not follow the same accumulation pattern in algae and water: for all sampling sites, levels of lead were significantly more elevated in seawater (Mann-Whitney test, $p < 0.001$) while those of cadmium were significantly higher in algae (Mann-Whitney test, $p < 0.001$). The average mean concentrations of lead and cadmium were 0.003 ± 0.004 and 1.454 ± 2.300 µg/g dry weight, respectively in algae and 0.099 ± 0.031 and 0.0029 ± 0.0023 µg/ml respectively in seawater.

Details of results relative to lead and cadmium concentrations in algae and seawater, taken in various sites of the seven studied districts are presented in table III.

Concerning the algae analysis, Sfax site presented the highest concentrations of lead and cadmium (0.009 ± 0.005 and 4.689 ± 3.805 µg/g dry weight, respectively) when Sousse site showed the lowest ones (0.001 ± 0.0005 and 0.201 ± 0.064 µg/g dry weight, respectively) whatever the water depth might be. The range of trace metal concentrations in algae and seawater collected from the Sfax littoral, respectively were as follows: lead, $0.001 - 0.018$ and $0.084 - 0.159$ µg/g dry weight; $0.385 - 12.547$ and $0.001 - 0.011$ µg/g dry weight. Algae showed differential bioaccumulation of lead in Bizerte site: the channel of Bizerte presented the most elevated concentration (0.054 µg/g dry weight) observed in the Tunisian coast whereas Sidi Hachemi presented the lowest one (0.0001 µg/g dry weight).

Along Tunisian coast, cadmium was the more accumulated (12.547 µg/g dry weight) in ex-swimming club (Sfax site).

For the seawater analysis, it was observed that the most elevated lead concentrations were found in the regions of Bizerte, Mahdia and Sfax and those of Bizerte, Medenine and Sfax showed the most raised cadmium concentrations. Seawaters of Ben Arous and Sousse presented the lowest lead and cadmium mean concentrations, respectively.

The concentration of metals was not significantly affected by the algae species (figures 1 and 2) and physico-chemical characteristics of sea (figures 3 and 4). In fact, comparisons of metal concentrations among sampling depth showed no significant differences for both algae and seawater analysis.

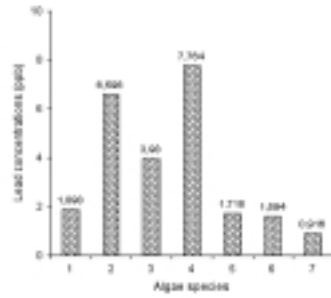


Figure 1. Variations of lead concentrations (µg/dr weight) among algae species.

- 1 = *Fucus vesiculosus* ; 2 = *Enteromorpha* ;
- 3 = *Ulva lactuca* ; 4 = *Codium bursa* ; 5 = *Cladophora* ;
- 6 = *Codium Fragile* ; 7 = *Chaetomorpha*

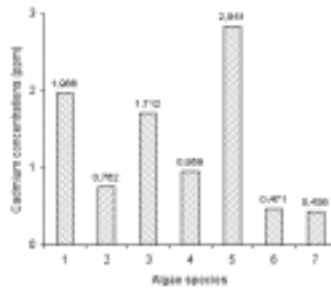


Figure 2. Variations of cadmium concentrations (µg/g dry weight) among algae species

- 1 = *Fucus vesiculosus* ; 2 = *Enteromorpha* ;
- 3 = *Ulva lactuca* ; 4 = *Codium bursa* ; 5 = *Cladophora* ;
- 6 = *Codium Fragile* ; 7 = *Chaetomorpha*

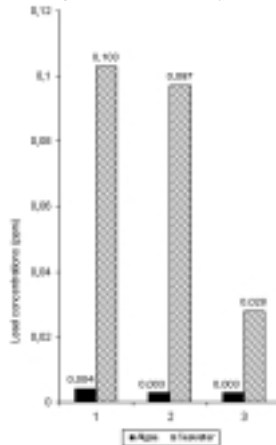


Figure 3. Concentrations of lead in algae (µg/g dry weight) and seawater (µg/ml) according to the depth.

- 1: 20 cm above seabed; 2: middle-depth; 3: surface

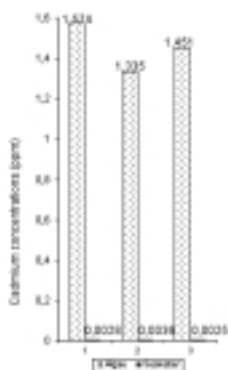


Figure 4. Concentrations of cadmium in algae ($\mu\text{g/g}$ dry weight) and seawater ($\mu\text{g/ml}$) according to the depth.

1: 20 cm above seabed; 2: middle-depth; 3: surface

The metals concentration was below the maximum allowed limit by the Tunisian legislation in seawater (0.5 and 0.005 $\mu\text{g/ml}$ respectively for lead and cadmium)¹³.

DISCUSSION

Levels of concentration of lead and cadmium in both algae and seawater are not in the same proportions. This suggests that the amounts of accumulation of the two studied metals in algae do not follow the same pattern. Algae seem to have more affinity for accumulation of cadmium than for that of lead. Nevertheless, in comparison with other heavy metals such as zinc and copper, accumulation of cadmium by algae is not very important. It might be due to the fact that zinc and copper are necessary for the growth and well-being of living creatures¹⁴, so they could be absorbed until a very great level of concentration (i.e. 104 times the level in seawater¹⁵, whereas cadmium is not indispensable to metabolic activities and manifests toxic properties¹⁶).

Concerning the algae analysis, Sfax site presented the highest concentrations of lead and cadmium, it might be due to the development of a great number of industrial firms in this region: more than twenty five firms have been developed in Sfax district and many enterprises manufacture plastic packings, paints and enamels, fertilizers, etc. The plastic industries use cadmium mixtures as heat stabilizers to retard degradation due to elevated temperatures; certain cadmium compounds are also used as colouring agents in a variety of products, chiefly in plastics, paints, enamels, etc. In addition, cadmium is used in certain pesticides in agricultural applications¹⁷. As a result,

agricultural soils are sometimes found to contain rather high cadmium levels, Furthermore, runoff and seepage from such fields may contaminate water supplies. For example Horvath et al.¹⁸

found dissolved cadmium concentrations to be seven times higher in canal water adjacent to agricultural fields in South Florida than in canal water draining undeveloped land in the same region. The high lead contents could be explained by the use of lead in paints as a pigment and an anthropogenic input in seawaters. An other source of elevated lead amounts in Sfax district is the intensification of sea traffic: hydrocarbons derived from petroleum contain some tetraethyl lead used as an antiknock additive and characterised by its great toxicity towards algae¹⁹. Algae analysis showed that Sousse site presented the lowest metal concentrations. This would be the consequence of the development of tourism and a strict regulation in this region.

The highest concentration of lead in algae was observed in the channel of Bizerte (Bizerte site), it may be the result of the development of a great number of plastic and iron industries in this site and the most elevated amount of cadmium was observed in an ex-swimming club (Sfax site).

Concerning seawater analysis, the most raised amounts of lead were observed in Bizerte, Mahdia and Sfax sites, it might be due to the intensification of sea traffic in these districts, and those of cadmium in Bizerte and Medenine coasts where some industries may discharge their wastes in seawater.

Analysis of metal amounts in algae and seawater showed that Bizerte's coast seems to be the most exposed zone to pollution. Strong concentrations observed in the two tested samples can be attributed to local sources of industrial waste. In addition, algae showed differential bioaccumulation of lead in Bizerte site: there is a variability inter-sectors that is not observed with the same intensity in algae as in seawater. This result suggests the necessity of a reduction in the use of lead.

Relating to the algae analysis, no limited threshold of tolerance was established yet in Tunisia. Only few works were realized without establishing standards.

Algae metal concentrations observed in the Tunisian coast are much weaker than those found in certain regions of Africa and America^{20, 21}. Indeed, cadmium

concentrations can reach 20 ppm in some brown algae collected in Canada²² and lead concentrations attain 8.5 ppm in seawaters of Ghana in Africa²³.

The concentration of metals was not significantly affected by the level of depth and the algae species: the physico-chemical characteristics of the seawater seems not to influence the metal bioaccumulation in algae.

CONCLUSION

Tunisian coasts could be polluted by extensive urbanization and industrialization, if a strict rule of waste draining and a continuous control of pollution's level are not set up. Indeed, the contamination of food chain by lead and cadmium damages human health and causes many illnesses such as anaemia, kidney damage, etc.

Particular attention should be drawn to the increasing contamination of Bizerte's region; that begins to be worrying.

On the other hand, algae seem to accumulate much more cadmium than lead. Nevertheless, in comparison with other essential heavy metals, accumulation of cadmium by algae is not very important. It might be due to the toxic properties of this metal towards the aquatic plant¹⁶.

As a consequence, it would be preferable to use more indicators of pollution concerning the two metals, such as sediments or bivalves, to have a better idea about the degree of contamination of the studied regions.

REFERENCES

- 1- **M.M Storelli, A. Storelli, G.O. Marcotrigiano** (2001). Heavy metals in the aquatic environment of the Southern Adriatic Sea, Italy. Macroalgae, sediments and benthic species. *Environ. Int.* **26**, 505-509.
- 2- **M. Waldichuk** (1980). Lead in the Marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* **11**, 241-251.
- 3- **U. Förstner and G.T.W. Wittmann** (1981). Environmental pollution. In Metal pollution in the aquatic environment (Edited by Springer Verlag), pp.1-480. Berlin.
- 4- **W.J. Langston** (1990). Toxic effects of metals and the incidence of metal pollution in marine ecosystem. In Heavy metals in the marine environment (Edited by Furness R.W., Rainbow P.S.), pp 22-101. Boca Raton, FL: CRC Press.
- 5- **D.Claissie, C. Alzieu** (1993). Copper contamination as result of antifouling paint regulations. *Mar. Pollut. Bull.*, **26**, 7-395.
- 6- **FAO** (1991). African fisheries and the environment ,pp. 6-18. Regional Office for Africa, Accra.
- 7- **D. Calamari and H. Neave** (1994). Revue de la pollution dans l'environnement aquatique Africain. FAO / *Document Technique du CPCA*, **25**, 1-135.
- 8- **L.T Kurland., S.W. Faro and H. Siedler** (1960). Minamata disease: the outbreak of a neurological disorder in Minamata, Japan, and its relation to ingestion of seafood containing mercury compounds. *World Neurol.*, **1**, 370-395.
- 9- **T. Nitta** (1972). Marine pollution in Japan. In Marine pollution and Sea Life (Edited by Ruivo, M.), pp. 77-81. Fishing News (Books). West Byfleet, Surrey.
- 10- **E.D. Goldberg** (1979). La santé des océans, pp.1-188. Paris, Unesco.
- 11- **R.Capelli, V. Contardi and G. Zenicchi** (1976). Ecology and biology of the ports (bearings) of the sea Ligurienne and high Tyrrhenienne. IIIES a days etud. Pollutions, Split, C.I.E.S.M, pp. 83-88.
- 12- **G .Lozano, A. Hardisson, A.J.Gutiérrez, M.A. Lafuente** (2003). Lead and cadmium levels in coastal benthic algae (seaweeds) of Tenerife, Canary Islands. *Environ. Int.*, **28**, 627-631.
- 13- **INNORPI** (National Institute of Normalisation and Industrial Protection) (1988). Protection de l'environnement. Décharge d'effluents dans l'environnement hydrique. NT 106.002.
- 14- **W. Ciusa and M. Giaccio** (1984). In Il problema degli oligoelementi nelle specie ittiche dei mari italiani (Edited by Cacucci F.). *Bari, Italy*, pp. 1-227.
- 15- **R. Brooks and M.G. Rumsby** (1965). Biochemistry of trace element uptake by some New Zealand bivalves. *Limnol. Oceanogr.* **10**, 521-527.
- 16- **C. Veron** (1990). The mechanisms of contamination of the food chain with cadmium principally the trophic chain Air-Soil-Plants-Animals-Man. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **83**, 180-202.

- 17- **NRCC** (National Research Council Canada) (1979). Effets du cadmium sur l'environnement Canadien. (Edited by Associate Comitee on Scientific Criteria for Environmental Quality, Service of Publications), pp. 1-150. Ottawa, Ontario.
- 18- **G.Horvath, R.C. Harris & H.C. Mattraw** (1972). Land development and trace metal distribution in the Florida Everglades. *Mar. Pollut. Bull.*, **3**, 175-183.
- 19- **B.A. Silverberg** (1977). Effects of tetramethyl lead on freshwater green algae. *Arch. About. Contam. Toxicol.*, **5**, 305-313.
- 20- **K.M. El-Moselhy, M.N. Gabal** (2004). Trace metals in water, sediments and marine organisms from the northern part of the Gulf of Suez, Red Sea. *J.Mar. Sys.*, **46**, 39- 46.
- 21- **M.E. Conti, G. Cecchetti** (2003). A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. *Env. Res.*, **93**, 99-112.
- 22- **R.D. Stenner, and G. Nickless** (1974). Disribution of some heavy metals in organisms in Hardangerfjord and Shjerstadsfjord, *Norway. Water Air Soil Pollut.*, **3**, 279-291.
- 23- **EMA** (Environmental Management Associates) (1989). Environmental study of Accra Metropolitan Area. UNDP, pp. 220-236. Accra.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Les archives de l'Institut Pasteur de Tunis publient, après acceptation par le Comité de Rédaction, des travaux de sciences biologiques fondamentales ou appliquées concernant le Maghreb et plus particulièrement la Tunisie. Les publications peuvent paraître sous les rubriques suivantes :

I- TRAVAUX ORIGINAUX

A- ARTICLES ORIGINAUX

Articles couvrant tous les domaines de la biologie et plus particulièrement les recherches fondamentales et appliquées relevant des disciplines Pastoriennes. Les articles seront évalués sur leurs qualités scientifiques et leur apport à une meilleure connaissance des systèmes biologiques. Ils ne doivent pas excéder 20 pages dactylographiées.

B- LETTRE À L'ÉDITEUR

Correspondance critique relative à une publication antérieure des Archives de l'Institut Pasteur de Tunis et faisant éventuellement part de l'expérience personnelle du correspondant. Elle ne doit pas dépasser deux pages dactylographiées.

C- COMMUNICATION BRÈVE

Note destinée à rapporter un résultat original saillant. Elle ne doit pas dépasser 5 pages dactylographiées.

D- NOTE TECHNIQUE

Actualisation (amélioration, perfectionnement, simplification) d'une technique à la lumière de l'expérience personnelle des auteurs. Elle ne doit pas dépasser deux pages dactylographiées.

II- AUTRES PUBLICATIONS

Mises au point sollicitées par le Comité de Rédaction des Archives de l'Institut Pasteur de Tunis et apparaissant sous les rubriques suivantes :

A- EDITORIAL

Prise de position sur un sujet d'actualité et d'importance particulière ne dépassant pas deux pages dactylographiées.

B-REVUE GÉNÉRALE

Revue faisant le point de l'état des connaissances sur un thème proposé par le Comité de Rédaction. Elle ne doit pas dépasser 15 pages dactylographiées.

III- FORUM

A- NOUVELLES SCIENTIFIQUES

Faits scientifiques saillants apparus dans la littérature et / ou manifestations scientifiques récentes.

B- FAITS

Rapports, compte-rendus... de séminaires et manifestations scientifiques ayant trait particulièrement à la vie Pastorienne.

IV- PRESENTATION GENERALE DES ARTICLES

A- MANUSCRIT

- Le texte rédigé en Anglais ou en Français sera dactylographié en double interligne recto sur format A4.
- La page **Une** comportera obligatoirement :
 - Le titre en Français et en Anglais.
 - Un titre abrégé (running title) de 3-4 mots.
 - Les affiliations.
 - L'indication de l'auteur correspondant.
 - Les mots clés en Français et en Anglais.
- La page **Deux** comportera le résumé en Français et en Anglais; ceux-ci ne dépassant pas chacun 15 lignes dactylographiées.
- La page **Trois et Suivantes** comporteront le texte avec les chapitres suivants dans l'ordre :
 - Introduction.
 - Matériel et Méthodes.
 - Résultats.
 - Discussion.
 - Remerciements.
 - Références.

B- ILLUSTRATIONS

Les tableaux seront numérotés en chiffres romain et les figures en chiffres arabes suivant l'ordre de passage dans le texte.

Pour les figures, le sens (haut, bas, droite, gauche) sera indiqué au verso. Seuls les originaux en 3 exemplaires seront acceptés.

C- RÉFÉRENCES

Dans le texte, chaque citation sera suivie d'un numéro en exposant, correspondant à celui de la référence citée par ordre d'apparition dans le texte. Les références figureront sur des pages séparées du reste du manuscrit. et selon le modèle ci-dessous, en indiquant :

- Le nom des auteurs suivi de la ou des initiales de leur prénom.
- L'année de parution (entre parenthèses).
- Le titre de l'article, le nom de la revue (utilisant les abréviations couramment admises dans Current Contents), du tome en gras, du numéro ainsi que de la première et de la dernière page de l'article.

EXEMPLES

- 1- J.L. Guénet, H. Jakobo, J.F. Nicolas et F.Jacob** (1974). Tératocarcinome de la souris : étude cytogénétique des cellules à potentialité multiple . *Ann. Microbio. Ins. Pasteur*, **125** A, 135-151

Les Références concernant les ouvrages (monographies, traités, compte-rendus de congrès...) doivent être présentées selon l'exemple suivant :

- 2- A.T. Stone and J.J.Morgan** (1990). Kinetics of chemical transformations in the environment. In *Aquatic chemical kinetics* (Edited by Stumm W.) , Chp.1, pp.1-42. Wiley- Interscience, New York.

V- REMARQUES GENERALES

Les manuscrits doivent être adressés en trois exemplaires : 1 exemplaire original et 2 copies d'excellente qualité, et sur disquette ou CD-Rom avec une lettre d'accompagnement au Rédacteur en Chef des Archives de l' Institut Pasteur de Tunis. 13, Place Pasteur, B.P. 74, 1002 Tunis-Belvédère- Tunisie.

La lettre d'accompagnement devra être signée par l'auteur principal indiquant que tous les co-auteurs ont pris connaissance du contenu de l'article, approuvent sa soumission aux Archives de l'Institut Pasteur de Tunis et attestent que le contenu de l'article n'est pas et ne sera pas soumis à une autre revue.

Les articles incomplets et ne respectant pas les recommandations sus-indiquées ne seront pas pris en considération. Les articles soumis ne sont pas retournés. Le Comité de Rédaction se réserve le droit de refuser les textes qui lui seront soumis. Les opinions émises dans les publications n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs.

BULLETIN D'ABONNEMENT AUX ARCHIVES DE L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

OUI, JE DÉSIRE M'ABONNER AUX "ARCHIVES DE L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS"

NOM :

PRÉNOM :

ADRESSE :

CODE POSTAL : **VILLE :** **PAYS :**

TÉLÉPHONE : **FAX :**

ADRESSE E-MAIL :

-
- Merci de préciser votre spécialité

SPÉCIALITÉ :

LIEU D'EXERCICE :

FONCTION :

-
- Souscrire un abonnement aux Archives de l'Institut Pasteur de Tunis pour un an (un volume)

TUNISIE : 20 DT

ETRANGER : 25\$ US

- Joindre le payement

CHÈQUE À L'ORDRE DE L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS.

SOUHAITE RECEVOIR UNE FACTURE ACQUITTÉE.

-
- A retourner à l'Institut Pasteur de Tunis: 13, Place Pasteur, BP 74,
1002 Tunis-Belvédère, Tunisie
Tél.71 783 022 - Fax : 71 791 833
-

