



**UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU**

-----  
**Unité de formation et de Recherche  
en Sciences de la Santé  
( UFR/SDS )**  
-----

**LISTE DES RESPONSABLES ADMINISTRATIFS**

Directeur	Pr. Amadou SANOU
Directeur Adjoint	Pr . Ag. Y. Joseph DRABO
Coordonateur de la Section Pharmacie	Pr. Ag. Mamadou SAWADOGO
Coordonateur des Stages de la Section Médecine	Pr. Ag. Y. Joseph DRABO
Coordonateur des Stages de la Section de Pharmacie	Dr Jean-Baptiste NIKIEMA
Coordonnateur C.E.S. de Chirurgie	Pr. Amadou SANOU
Coordonnateur Section Techniciens Supérieurs de Santé	Pr Blaise KOUDOGBO
Secrétaire Principal	M. TRAORE Fakouo
Chef de Service Administratif et Financier (CSAF)	Mme Christine NARE
Responsable de la Bibliothèque	M. Salif YADA
Chef de la Scolarité	Mme Kadi ZERBO
Secrétaire du Directeur	Mlle Michèle K. ILBOUDO
Secrétaire du Directeur Adjoint	Mme KABRE Hakiéta

## LISTE DES ENSEIGNANTS DE L'UFR/SDS

### ENSEIGNANTS PERMANENTS

#### Professeurs titulaires

Rambré Moumouni OUIMINGA	Anatomie organogénèse et chirurgie
Hilaire TIENDREBEOGO (in memoriam)	Sémiologie et Pathologies médicales
Tinga Robert GUIGUEMDE	Parasitologie
Bobilwindé Robert SOUDRE	Anatomie-Pathologie
Amadou SANOU	Chirurgie Générale et Digestive
Innocent Pierre GUISSOU	Pharmacologie & Toxicologie
Bibiane KONE	Gynécologie - Obstétrique
Alphonse SAWADOGO	Pédiatrie

#### Professeurs associés

Blaise KOUDOGBO	Toxicologie
-----------------	-------------

#### Maîtres de Conférences

Julien YILBOUDO	Orthopédie -Traumatologie
Kongoré Raphaël OUEDRAOGO	Chirurgie -Traumatologie
François René TALL	Pédiatrie
Jean KABORE	Neurologie
Joseph Y. DRABO	Médecine Interne/Endocrinologie
Blaise SONDO	Santé Publique
Jean LANKOANDE	Gynécologie-Obstétrique
Issa SANOU	Pédiatrie
Ludovic KAM	Pédiatrie

Adama LENGANI

Néphrologie

Oumar TRAORE N°1

Orthopédie-Traumatologie

Kampadilemba OUOBA

Oto Rhino Laryngologie

Piga Daniel ILBOUDO

Gastro-entérologie

Albert WANDAOGO

Chirurgie Pédiatrique

Adama TRAORE

Dermatologie Vénérologie

Mamadou SAWADOGO

Biochimie

Arouna OUEDRAOGO

Psychiatrie

Joachim SANOU

Anesthésie-Réanimation

Théophile L. TAPSOBA

Biophysique - Médecine Nucléaire

#### Maîtres-Assistants

Lady Kadidiatou TRAORE

Parasitologie

Si Simon TRAORE

Chirurgie

Abdoulaye TRAORE

Santé Publique

Daman SANO

Chirurgie Générale

Patrice ZABSONRE

Cardiologie

Jean Gabriel OUANGO

Psychiatrie

Georges KI-ZERBO

Maladies Infectieuses

Rabiou CISSE

Radiologie

Blami DAO

Gynécologie Obstétrique

Alain BOUGOUMA

Gastro-Entérologie

Boubakar TOURE

Gynéco-Obstétrique

Michel AKOTIONGA

Gynécologie-Obstétrique

Rasmata OUEDRAOGO/TRAORE	Bactério-Virologie
Alain ZOUBGA	Pneumologie
Boubacar NACRO	Pédiatrie
Abel KABRE	Neuro-Chirurgie
Maimouna DAO / OUATTARA	ORL
Nicole Marie KYELEM / ZABRE	Maladies Infectieuses
Antoinette TRAORE / BELEM	Pédiatrie
Kapouné KARFO	Psychiatrie
Timothée KAMBOU	Chirurgie
Jean Baptiste NIKIEMA	Pharmacognosie
Ali NIAKARA	Cardiologie
André K. SAMANDOULOGOU	Cardiologie
Pingwendé BONKOUNGOU	Pédiatrie
Nonfounikoun Dieudonné MEDA	Ophtalmologie
Athanase MILLOGO	Neurologie
Nazinigouba OUEDRAOGO	Réanimation
Diarra YE / OUATTARA	Pédiatrie
Laurent OUEDRAOGO	Santé Publique
Lassina SANGARE	Bactério-Virologie
<b><u>Assistants</u></b>	
T.Christian SANOU (in memoriam)	Oto Rhino Laryngologie
Doro SERME (in memoriam)	Cardiologie
Hamadé OUEDRAOGO	Anesthésie-Réanimation physiologie

Alexis ROUAMBA	Anesthésie-Réanimation physiologie
M. Théophile COMPAORE	Chirurgie
Y. Abel BAMOUNI	Radiologie
Rigobert THIOMBIANO	Maladies Infectieuses
Raphaël DAKOURE	Anatomie-Chirurgie
Robert O. ZOUNGRANA	Physiologie
Bobliwendé SAKANDE	Anatomie-Pathologie
Raphaël SANOU (in memoriam)	Pneumo-phtisiologie
Oumar TRAORE N°2 (in memoriam)	Radiologie
Arsène M. D. DABOUE	Ophtalmologie
Vincent OUEDRAOGO	Médecine du Travail
S. Christophe DA	Chirurgie
Aurélien Jean SANON	Chirurgie
Claudine LOUGUE / SORGHO	Radiologie
Barnabé ZANGO	Chirurgie
L. Valerie Adélaïde NEBIE	Cardiologie
Blandine THIEBA	Gynécologie-Obstétrique
Abdel Karim SERME	Gastro-Entérologie
Moussa BAMBARA	Gynécologie-Obstétrique
Fatou BARRO	Dermatologie
Olga LOMPO	Anatomie Pathologique
Appolinaire SAWADOGO	Gastro-Entérologie

Martial OUEDRAOGO

Moussa KERE

Innocent NACOULMA

P. Antoine NIAMPA

Françoise Danielle MILLOGO/TRAORE

Z. Théodore OUEDRAOGO

P. André KOALAGA

Emile BANDRE

Syranyan SEKOULE

Dieudonné OUEDRAOGO

Moussa OUEDRAOGO

**Assistants Biologistes des Hôpitaux**

Idrissa SANOU

Harouna SANON

Issa SOME

Rasmané SEMDE

Jean SAKANDE

Pneumo-Phtisiologie

Santé Publique

Orthopédie-Traumatologie

Dermatologie

Gynécologie-Obstétrique

Santé Publique

Gynécologie-Obstétrique

Chirurgie générale et digestive

Psychiatrie

Chirurgie maxilo-faciale

Pharmacologie

Bactério-Virologie

Hématologie/Immunologie

Chimie Analytique

Galénique

Biochimie

**ENSEIGNANTS NON PERMANENTS**

**UFR des Sciences de la vie et de la terre  
(UFR/SVT)**

et

**UFR des Sciences exactes et Appliquées (UFR/  
SEA)**

**Professeurs Titulaires**

Akry COULIBALY	Mathématiques
Sita GUINKO	Botanique-Biologie Végétale
Guy V. OUEDRAOGO	Chimie Minérale
Laya SAWADOGO	Physiologie-Biologie Cellulaire
Laou Bernard KAM ( in memorian )	Chimie
Patoïn Albert OUEDRAOGO	Zoologie

**Maîtres de Conférences**

Boukary LEGMA	Chimie-Physique Générale
Gustave KABRE	Biologie Générale
François ZOUGMORE	Physique
Adama SABA	Chimie Organique
Philippe SANKARA	Cryptogamie-Phytopharmacie

**Maîtres-Assistants**

Makido B. OUEDRAOGO	Génétique
Raymond BELEMTOUGOURI	T.P. Biologie Cellulaire
Drissa SANOU	Biologie Cellulaire

### Assistants

Apolinaire BAYALA (in memoriam) Physiologie

### Institut du Développement Rural ( IDR )

#### Maîtres de Conférences

Didier ZONGO Génétique

Georges Annicet OUEDRAOGO Biochimie

### UFR des Sciences Economiques et de Gestion (UFR/SEG)

#### Maître-Assistant

Tibo Hervé KABORE Economie-Gestion

### UFR des Sciences Juridiques Politiques (UFR/SJP)

#### Assistants

Jean Claude TAITA Droit

### ENSEIGNANTS VACATAIRES

M. DAHOU ( in mémoriam) Hydrologie

Dr Annette OUEDRAOGO Stomatologie

Dr Adama THIOMBIANO Législation Pharmaceutique

Dr Sidiki TRAORE Galénique

Mr Mamadou DIALLO Anglais

Dr Badioré OUATTARA Galénique

Dr Alassane SICKO Anatomie

Dr Aline TIENDREBEOGO Chimie Analytique et contrôle  
médic.

Dr Noël ZAGRE Nutrition

Dr Maminata TRAORE / COULIBALY Biochimie

Dr Seydou SOURABIE

Pharmacognosie

Dr Félix KINI

Chimie

Dr Lamine OUEDRAOGO

Biologie Cellulaire

Dr Marie Françoise OUEDRAOGO

Mathématiques

Mme Cecile OUEDRAOGO

Anglais

### **ENSEIGNANTS MISSIONNAIRES**

#### **A.U.P.E.L.F.**

Pr. Lamine DIAKHATE

Hématologie (Dakar)

Pr. Abibou SAMB

Bactério-Virologie (Dakar)

Pr. Mbayang NDIAYE-NIANG

Physiologie (Dakar)

Pr. Emmanuel BASSENE

Pharmacognosie (Dakar)

Pr Mamadou BADIANE

Chimie Thérapeutique (Dakar)

Pr Babacar FAYE

Pharmacologie (Dakar)

#### **Mission de l'Université Libre de Bruxelles (ULB)**

Pr. Jean NEVE

Chimie Thérapeutique

#### **Mission avec les autres universités**

Pr André BIGOT (UAC)

Immunologie

# DEDICACES



***A Papa et Maman,***

***Ainsi que***

***mes grands frères et sœurs :***

Dieudonné, Paul, Monique, Odette, Victor et Apollinaire.

Pour votre perpétuel soutien et votre confiance.

# REMERCIEMENTS

oooooooooooooooooooooooooooo

✚ A la Coopération française pour le soutien financier à la réalisation de ce travail.

✚ Au professeur A Küpffer du laboratoire de pharmacologie de l'Université de Bernes(SUISSE) pour le soutien matériel et les conseils.

✚ Au professeur GUIGUEMDE T. Robert : merci pour votre soutien et vos conseils.

✚ A la société CIT International et à tout son personnel. Pour le soutien matériel.

✚ Au Docteur SOME Noya de l'IRSN(MEPHATRA).

✚ Au Docteur Jean-Baptiste NIKIEMA (UFR/SDS).

✚ Aux Docteurs Nicolas NAGOT et Halidou TINTO (Centre MURAZ).

✚ Au personnel de l'UERO(Centre Muraz): Paulin PODA, Alexis DARGA, Nouhoum

✚ A tout le personnel du Centre MURAZ, en particulier Oumar SANOU, Diane VALEA, Adama GUIGUEMDE : Pour votre collaboration et votre aide.

✚ A tous les enseignants de l'UFR/SDS, en particulier mes enseignants de la 1<sup>ère</sup> à la 6<sup>ème</sup> Année.

✚ A tous mes maîtres de stages de 1<sup>ère</sup> à la 6<sup>ème</sup> Année :

- Docteur Abdoul Salam KABORE : Pharmacie du progrès
- Dr Jean-Baptiste YAMEOGO : Pharmacie Carrefour
- Dr Paul OUEDRAOGO : Pharmacie de la Cathédrale
- Dr TAMINI et Dr BAKO : ex responsables de COPHADIS
- Dr Wendemi OUEDRAOGO : MCD hôpital de Pô
- Dr Rasmata OUEDRAOGO : responsable des stages hospitaliers

✚ A mes chers amis :

Luc Meyer TAHI, Abdoulaye NIKIEMA, Serge Roland SANOU, Hervé HIEN, Aicha NAKANABO, Virginie KOUDOGBO, Kharine CARVALHO, Ryme Nousra ADAM, Théophile, Ruth, Cheriffa KANKARTI, Didier, Hermann, Evelyne,...

✚ A tous mes camarades de promotion...

**Que tous trouvent ici, l'expression de ma profonde gratitude.**



✚ *A notre maître et Président de jury*

**Le Professeur Mbayang N'DIAYE NIANG.**

Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos enseignements théoriques en physiologie au cours de notre formation. Nous avons été fascinés par la qualité de vos enseignements et par votre amabilité.

C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance et de nos respectueux hommages.

✚ *A notre maître et juge :*

**Le Professeur Y. Joseph DRABO.**

Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos enseignements en sémiologie médicale. Votre simplicité et votre disponibilité resteront pour nous un modèle. Nous sommes très honorés de votre présence dans le jury de cette thèse. Permettez-nous de vous remercier pour avoir accepté de siéger dans ce jury.

✚ *A notre maître et juge :*

**Le Professeur Gustave KABRE.**

C'est un honneur pour nous que vous ayez accepté de siéger dans le jury de cette thèse. Vous avez bien voulu nous apporter votre soutien, en acceptant de lire et de corriger ce travail malgré vos multiples occupations. Nous voulons vous dire merci pour l'intérêt que vous avez porté ainsi à cette thèse.

✦ *A notre maître et Directeur de thèse :*

### **Le Professeur Blaise KOUDOGBO.**

Vous avez accepté avec plaisir de diriger ce travail. C'est un grand honneur pour nous de vous avoir comme Directeur de thèse. Vos qualités humaines, et le souci du travail bien fait sont des vertus que nous retiendrons toujours. Vous avez été toujours disponible et très ouvert envers nous. Vous nous avez traités avec beaucoup d'égard pendant la réalisation de ce travail. Vos enseignements ainsi que vos conseils ont été très utiles au cours de la réalisation de ce travail et le seront davantage dans notre future carrière. C'est l'occasion ici de vous témoigner notre sincère reconnaissance.

Soyez assuré de notre estime et de notre profonde gratitude.

✦ *A notre maître et codirecteur de thèse :*

### **Le Docteur Hubert BARENES**

Vous avez été à l'origine de ce travail et vous nous avez guidés pas à pas dans sa réalisation. Avec vous, nous aurons ainsi fait nos premiers pas dans le domaine de la recherche biomédicale. Merci pour la confiance que vous nous avez accordé au cours de la réalisation de ce travail. Votre gratitude et votre constante disponibilité nous ont émerveillés. Vos qualités humaines et scientifiques resteront pour nous un modèle. Nous espérons que ce travail répond à vos attentes.

Soyez assuré de notre sincère gratitude et de notre profonde estime.

## LISTE DES ABREVIATIONS

ATP	Adenosine Triphosphate
BM	Bleu de Méthylène
CIRDES	Centre International de Recherche et Développement de l'élevage en zone Subhumide
CO <sub>2</sub>	Molécule de Dioxyde de Carbone
CoA	Coenzyme A
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
DCIR	Dénomination Commune Internationale Reconnue
DE <sub>50</sub>	Dose Efficace 50%
DJA	Dose Journalière Admissible
DL <sub>100</sub>	Dose Létale 100%
DL <sub>50</sub>	Dose Létale 50%
DMT	Dose Maximale Tolérée
EAF	Encéphalopathie Aiguë Fatale
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
H <sub>2</sub> O	Molécule d'eau
HGA	Hypoglycine A
HGB	Hypoglycine B
HPLC	Chromatographie Liquide Haute performance
IP	Intra Péritonéale
IV	Intra Veineuse
MCPA	Méthylèncyclopropyl Acétate
MCPA-CoA	Méthylèncyclopropylacetyl-Coenzyme A
MM	Masse Moléculaire
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
ND	Non Détectable
OCCGE	Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies
PO	Per Os
R	Configuration Rectus (isomérisation optique)
S	Configuration Sinister (isomérisation optique)
SGOT	Sérum Glutamo Oxalo-acétique transaminases
SGPT	Sérum Glutamo pyruvique transaminases
SIDS	Sudden Infantile Deaf Syndrome
SNC	Système nerveux Central
TR	Température Rectale
UCL	Université Catholique de Louvain
VLDL	Lipoprotéines de très faible densité (very low density lipoproteins)

## TABLES DES ILLUSTRATIONS

### TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : Valeur nutritive pour 100g d'arilles frais .....	6
<u>Tableau II</u> : Teneur en hypoglycine A dans les différentes parties du fruit à différents stades de maturité.....	12
<u>Tableau III</u> : Répartition géographique des 29 cas d'EAF observés entre janvier et mai 1998, dans la région Sud-Ouest du Burkina.....	15
<u>Tableau IV</u> : Concentrations d'acides dicarboxyliques dans les urines de 2 cas d'encéphalopathie aiguë fatale et 3 témoins appariés / sud-ouest du Burkina Faso, janvier - mai 1998.....	30
<u>Tableau V</u> : Doses d'extrait de fisan administré aux différents lots d'essai...	38
<u>Tableau VI</u> : Doses de bleu de méthylène administré par groupe d'essai.....	39
<u>Tableau VII</u> : Délais d'administration du BM après administration du toxique... ..	41
<u>Tableau VIII</u> : Traitement administré à 2 lots de 24 souris (lot BM + Glucose et lot BM seul).....	42
<u>Tableau IX</u> : Mortalité cumulée des animaux 72h après intoxication, selon la dose de toxique administrée.....	43
<u>Tableau X</u> : Mortalité cumulée 72h après intoxication, selon la dose de Bleu de Méthylène (BM) administrée.....	46
<u>Tableau XI</u> : Température rectale moyenne des souris par groupe d'essai en fonction du temps .....	48
<u>Tableau XII</u> : Mortalité cumulée à J <sub>3</sub> et J <sub>14</sub> en fonction du délai d'administration du BM.....	52

### PLANCHES

<u>PLANCHE 1</u> : Images des fruits non mûrs du fisanier.....	7
<u>PLANCHE 2</u> : Images des fruits mûrs du fisanier.....	8

## FIGURES

<b>Figure 1</b> - Formules chimiques de l'hypoglycine A (HGA) et l'hypoglycine B (HGB).....	11
<b>Figure 2</b> : Relation entre hypoglycine A (ppm) dans les arilles du fisanier et stade de maturation du fruit.....	13
<b>Figure 3</b> - Isomère (1R) du MCPA-CoA.....	17
<b>Figure 4</b> : Les quatre réactions constituant un tour de spire de la $\beta$ -oxydation des acides gras dans la mitochondrie.....	19
<b>Figure 5</b> : Voies d'inactivation des acyl-CoA déshydrogénases par le MCPA-CoA.....	21
<b>Figure 6</b> - Formule chimique du Bleu de Méthylène.....	34
<b>Figure 7</b> : Courbe dose-effet : mortalité des souris en fonction de la dose de toxique (ajustement logarithmique).....	45
<b>Figure 8</b> : Signes cliniques observés en fonction de la dose de toxique administrée.....	46
<b>Figure 9</b> : Mortalité cumulée des souris à J <sub>3</sub> et J <sub>14</sub> après intoxication selon la dose BM administrée.....	48
<b>Figure 10</b> : Temps de survie total par groupe d'essai (selon la dose de BM).....	48
<b>Figure 11</b> : variation de la température rectale en fonction du temps : souris traitées par le BM et souris non traitées.....	50
<b>Figure 12</b> : Variations de la glycémie dans le lot témoin à T <sub>0</sub> , T <sub>3</sub> et T <sub>6</sub> .....	51
<b>Figure 13</b> : Variations de la glycémie dans le lot test (BM 8 mg.kg <sup>-1</sup> ) à T <sub>0</sub> , T <sub>3</sub> et T <sub>6</sub> .....	51
<b>Figure 14</b> : Evolution du poids des souris par lot durant la période de surveillance (J <sub>1</sub> à J <sub>14</sub> ) chez les souris survivantes.....	52
<b>Figure 15</b> : Temps de survie des souris par lot (selon le délai d'administration du BM).....	53
<b>Figure 16</b> : Effectif mortalité cumulée à J <sub>3</sub> et J <sub>14</sub> en fonction du traitement : BM + Glucose ou BM seul.....	54
<b>Figure 17</b> : Mécanisme d'action du bleu de méthylène dans le traitement des méthémoglobinémies toxiques.....	63

## SOMMAIRE

I - INTRODUCTION - ENONCE DU PROBLEME.....	1
II - OBJECTIFS.....	3
III - GENERALITES.....	4
3.1 - LE FISANIER: <i>Blighia sapida</i> ( <i>Sapindaceae</i> ).....	4
3.1.1 - Origine et distribution.....	4
3.1.2 - Description.....	4
3.1.3 - Usages.....	9
3.1.3.1 - Usage alimentaire.....	9
3.1.3.2 - Usage en médecine traditionnelle.....	9
3.1.3.3 - Autres usages.....	10
3.1.4 - Toxicité des fruits du fisanier.....	11
3.1.4.1 - L'HGA, substance à l'origine de la toxicité du fisanier.....	11
3.1.4.2 - Paramètres de toxicité de l'hypoglycine.....	13
3.2 - L'INTOXICATION AIGUE PAR LES ARILLES DU FISANIER.....	14
3.2.1 - Données épidémiologiques.....	14
3.2.1.1 - Au Burkina Faso.....	14
3.2.1.2 - Dans les autres pays de l'Afrique de l'Ouest.....	15
3.2.1.3 - En Jamaïque.....	16
3.2.2 - Mécanismes d'action de l'hypoglycine.....	17
3.2.2.1 - Rappels sur le cycle de la $\beta$ -oxydation des acides gras.....	17
3.2.2.2 - Les implications biochimiques de la $\beta$ -oxydation des acides gras.....	19
3.2.2.3 - Le processus d'inactivation de la $\beta$ -oxydation des acides gras par l'hypoglycine.....	20
3.2.3 - Conséquences biologiques induites par l'inactivation des acyl-CoA déshydrogénases.....	22
3.2.4 - Hypothèses thérapeutiques.....	23
3.2.4.1 - La Carnitine.....	24
3.2.4.2 - La glycine.....	24
3.2.4.3 - Le clofibrate.....	25

3.2.5 - L'encéphalopathie aiguë fatale due à l'hypoglycine.....	25
3.2.5.1 - <i>Manifestations cliniques</i> .....	25
3.2.5.2 - <i>Manifestations biologiques</i> .....	26
3.2.5.3 - <i>Éléments de diagnostic biologique</i> .....	27
3.2.5.4 - <i>Analyse toxicologique</i> .....	28
3.2.6 - Prise en charge médicale de l'intoxication.....	29
3.2.6.1 - <i>Premiers gestes sur les lieux de l'intoxication</i> .....	29
3.2.6.2 - <i>En milieu hospitalier</i> .....	30
<b>3.3 - INTOXICATION CHRONIQUE PAR LE FISANIER.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4 - LE BLEU DE METHYLENE.....</b>	<b>32</b>
3.4.1 - Bases physiologiques de l'utilisation du bleu de méthylène dans l'intoxication par le fisan.....	32
3.4.2 - Données pharmacologiques et utilisation du BM en toxicologie.....	33
3.4.3 - Mécanisme d'action antidotique du bleu de méthylène dans l'intoxication par l'hypoglycine.....	35
<b>IV - MATERIEL ET METHODES D'ETUDE.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 - MATERIEL .....</b>	<b>36</b>
4.1.1 - Cadre d'étude: le Centre MURAZ.....	36
4.1.2 - Matériel d'étude.....	36
<b>4.2 - METHODES D'ETUDE .....</b>	<b>38</b>
4.2.1 - Détermination des doses létales de l'extrait d'arilles chez la souris.....	38
4.2.2 - Etude de l'efficacité du BM : détermination de la DE <sub>50</sub> .....	39
4.2.3 - Détermination du délai d'intervention .....	41
4.2.3 - Intérêt d'une administration précoce de glucose. ....	42
4.2.4 - Analyse des données .....	43
<b>V - RESULTATS .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1 - TOXICITE AIGUE DE L'EXTRAIT D'ARILLES DU FISANIER. ....</b>	<b>44</b>
<b>5.2 - EFFICACITE DU BLEU DE METHYLENE.....</b>	<b>47</b>
5.2.1 - Effet sur la mortalité et le temps de survie des animaux.....	47
5.2.2 - Dose efficace 50 du Bleu de méthylène.....	49
5.2.3 - Effet sur la température rectale .....	49
5.2.4 - Effet sur la glycémie.....	50
5.2.5 - Effets sur le poids des animaux .....	52

5.3 - DELAI D'EFFICACITE DU BM .....	53
5.4 - INTERET DE L'ADMINISTRATION PRECOCE DE GLUCOSE .....	54
<b>VI - DISCUSSIONS .....</b>	<b>56</b>
6.1 - LE MATERIEL ET LA METHODE. ....	56
6.1.1 - Le modèle animal. ....	56
6.1.2 - Les méthodes d'étude. ....	56
6.2 - LES RESULTATS.....	58
6.2.1 - Toxicité aiguë de l'extrait d'arilles du fisanier chez la souris.....	58
6.2.2 - Efficacité du BM sur l'intoxication aiguë expérimentale chez la souris.....	59
6.2.3 - Le mécanisme d'action antidotique du bleu de méthylène .....	61
<b>VII - CONCLUSION.....</b>	<b>66</b>
<b>RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>69</b>

## **I - INTRODUCTION - ENONCE DU PROBLEME**

La consommation des arilles du fruit non mûr du fisanier (*Blighia sapida*, *Sapindaceae*) provoque une intoxication aiguë mortelle. De type saisonnier et récurrent, cette intoxication se manifeste le plus souvent sous forme d'épidémies d'encéphalopathie aiguë fatale (EAF) sans cause apparente. Les enfants d'âge préscolaire en sont les principales victimes. La létalité observée varie de 80 à 100% [46, 59].

Cette intoxication est due à l'hypoglycine A (HGA) [29, 71], phytotoxine présente dans le fruit immature à des concentrations cent fois plus élevées que dans le fruit mûr [13, 8].

L'HGA est un puissant agent hypoglycémiant. Il agit au niveau du cycle de la néoglucogénèse, mais ne fait pas intervenir l'insuline [49].

En 1998, une épidémie d'EAF due à la consommation du fisanier a été observée en zone rurale dans la région sud-ouest du Burkina Faso. Vingt neuf (29) cas ont été formellement identifiés entre janvier et mai 1998 chez les enfants en âge préscolaire [46]. Plusieurs cas d'intoxication fortement suspects ont été également signalés en Côte d'Ivoire, au Bénin et au Togo [59].

L'intoxication par le fisanier est bien connu en Jamaïque et aux Etats Unis, sous le nom de « Jamaïcan Vomiting Sickness (Maladie Vomitive du Jamaïque) » ou encore « Toxic Hypoglycemic Syndrom (Syndrome d'hypoglycémie Toxique) » [26, 1, 54].

Les cas d'intoxications semblent beaucoup plus répandus qu'on ne le croit et seraient responsables d'un nombre substantiel de décès inexpliqués, surtout dans la population pédiatrique [46].

Le danger de l'intoxication au fisanier paraît insuffisamment connu dans les régions d'Afrique où l'arbre en cause est rencontré. Des campagnes d'information, ainsi que d'éducation des enfants, les principales victimes ont donc été proposées afin de réduire au maximum le risque d'accident [46].

Toutefois, le caractère fatal de cette intoxication exige d'associer aux mesures de prévention, une prise en charge thérapeutique adéquate des cas afin de réduire la létalité, voire d'éliminer totalement le risque vital.

Cependant, il n'existe pas encore de traitement antidotique connu. Le traitement actuel n'est que palliatif et ne permet pas toujours d'éviter l'évolution fatale.

L'usage du bleu de méthylène (BM) a été proposé, à partir de certaines observations [39] :

- le BM est efficace pour prévenir et traiter l'encéphalopathie provoquée par l'ifosfamide (substance utilisée en chimiothérapie anticancéreuse) [37, 18].
- il existe de très proches similitudes entre le mécanisme d'action des métabolites de l'hypoglycine A (substance toxique du fisanier) et celui des métabolites de l'ifosfamide [39].

Le BM pourrait donc être efficace pour traiter l'intoxication due à l'hypoglycine A.

Le but de ce travail est de fournir une base expérimentale à cette hypothèse, et donc de tester l'efficacité du BM en tant qu'antidote lors de l'intoxication par les fruits immatures du fisanier chez la souris.

## II - OBJECTIFS

### 2.1 - OBJECTIF GENERAL

Etudier l'effet du BM chez la souris, après intoxication expérimentale par un extrait hydroalcoolique de fruits non mûrs du fisanier.

### 2.2 - OBJECTIFS SPECIFIQUES

1. Déterminer les doses létales 50 et 100 (DL<sub>50</sub> et DL<sub>100</sub>) de l'extrait de fruits non mûrs du fisanier.
2. Décrire les principaux signes cliniques et biologiques de l'intoxication aiguë chez la souris.
3. Déterminer la dose efficace 50 (DE<sub>50</sub>) de BM chez la souris.
4. Déterminer le délai minimum d'intervention et l'intérêt de mesures thérapeutiques associées (adjonction de glucose).

### III - GENERALITES

#### 3.1 - LE FISANIER: *Blighia sapida* (Sapindaceae)

##### 3.1.1 - Origine et distribution

*Blighia sapida* est un arbre originaire d'Afrique, commun aux régions de savane. On le rencontre dans la plupart des pays d'Afrique de l'ouest, ainsi que dans quelques pays d'Afrique Centrale [28]. Il est couramment appelé « fisanier » en français, « ackee apple » en anglais.

Au Burkina Faso, on le rencontre surtout dans la région sud-ouest (Bobo-dioulasso / Banfora) où il est très répandu, mais également dans la région centrale. Selon les régions d'implantation, il est connu sous différents noms vernaculaires (Annexe 1).

L'arbre fut introduit aux Antilles (Jamaïque) en 1778 par un marin anglais du nom de William Bligh à l'époque du commerce triangulaire. Il a été rapidement adopté et est depuis lors couramment cultivé dans les jardins et le long des artères. De la Jamaïque, le fisanier a été répandu à d'autres îles des Antilles (Haïti, Trinidad et Bahamas). Par la suite, l'arbre a été introduit en Amérique du sud (Surinam, Venezuela, Colombie, Ecuador et Brésil) puis aux Etats unis (Floride) et en Angleterre [53].

##### 3.1.2 - Description

Le fisanier appartient à la famille des Sapindaceae. La description de l'arbre et de ses fruits a été rappelée par Guevart et collaborateurs [28].

« Il s'agit d'un arbre au port de hêtre, pouvant atteindre une hauteur de 25 à 30 mètres, avec des racines proéminentes à la base du tronc. Son feuillage est massif, avec une couronne dense de branches étalées et portées par un tronc robuste. Celui-ci peut atteindre 1,5 à 2 m de diamètre. Les branches inférieures s'inclinent vers le sol.

L'écorce est blanche ou sombre et rude, recouvrant un bois dont la sève est blanche ou légèrement gris-brun. Le cœur du bois est de couleur rouge-brun, demi-dur et fibreux, très résistant aux insectes.

Les feuilles sont longues d'une quinzaine de centimètres. Elles sont composées, paripennées portant 3 à 5 paires de folioles veloutées en dessous. Elles sont de forme ovale, terminées en pointe; de couleur vert-foncé et brillantes à la base supérieure.

Les fleurs sont petites, de couleur verdâtre ou blanche. Elles mesurent moins de un centimètre, et sont disposées en grappes axillaires.

Les fruits, de la grosseur d'une petite poire sont de couleur rose à rouge, de forme ovale, marqués par trois côtes saillantes de cinq à six centimètres de long, parfois plus. Ils contiennent un à trois noyaux de la grosseur d'une noix de muscade, de couleur noire et brillants. Ces noyaux sont surmontés d'une masse de chair couleur ivoire, blanc ou crème, qui possède un goût de noisette ou d'avocat. La graine noire est d'un goût détestable ».

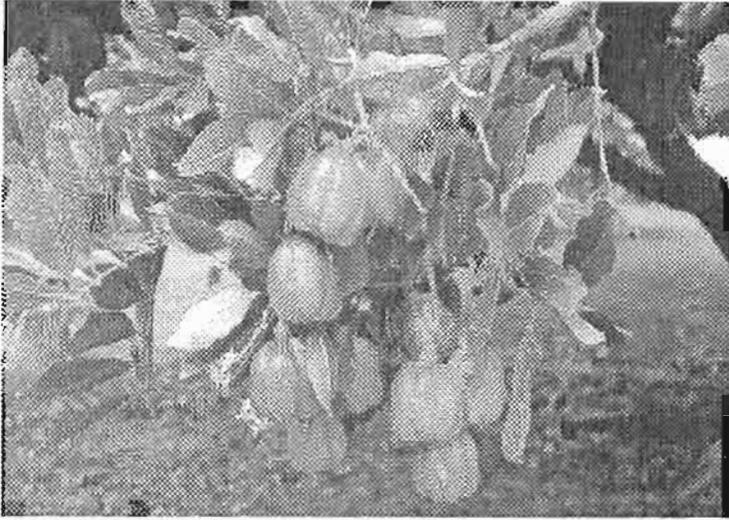
Le fisanier est spontané dans les régions de forêt. En Afrique de l'Ouest, il est habituellement planté dans les vergers ou en bordure des champs. Son feuillage est très ombrageux, de sorte qu'il ne s'intègre dans les champs qu'avec de larges écartements. La reproduction se fait par les graines essentiellement. La culture se fait par semis en place ou en pépinière. Les premières fructifications ont lieu quatre à cinq ans après le semis. La récolte se fait par ramassage successif, lorsque les fruits mûrs tombent au sol, sans dommage pour la partie comestible [28].

La valeur énergétique des arilles du fisanier a été estimée à environ 151 Kcal pour 100g d'arilles frais. Divers nutriments y ont été identifiés et dosés (Tableau 1).

**Tableau I** : Valeur nutritive pour 100g d'arilles frais [53].

Nutriments	Teneur (en gramme)
- Protéines	8,75
- Graisses	18,78
- Fibres	3,45
- Carbohydrates	9,55
- Phosphores	0,098
- Calcium	0,083
- Fer	0,006
- Thiamine	0,001
- Riboflavine	0,002
- Niacine	0,04
- Acide ascorbique	0,065
- Humidité	57,6

---



A



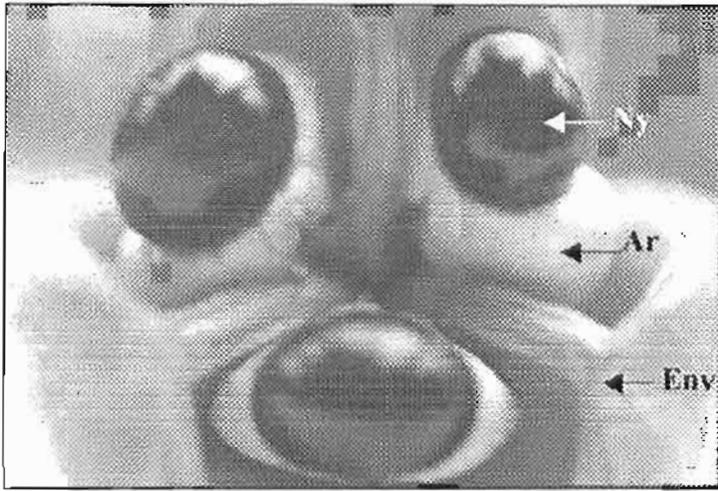
B

PLANCHE 1 : Images des fruits non mûrs du fisanier.

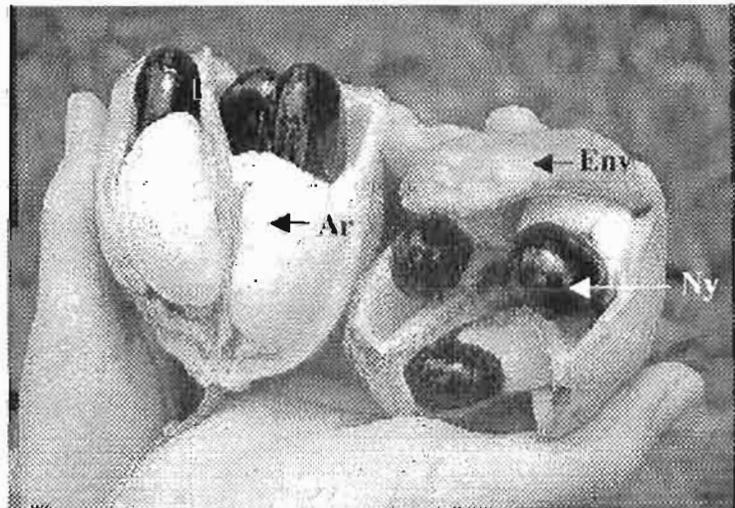
A et B : fruits non mûrs du fisanier, de couleur orange ou rouge et de forme ovale.

Source : A. <http://www.albion.edu/plants/bligsapg.htm>

B. <http://www.brevardrarefruit.org/photos/akee.html>



A



B

**PLANCHE 2 : Images des fruits mûrs du fisancier**

A. et B. fruits mûrs du fisancier s'ouvrant suivant trois lobes et laissant apparaître les noyaux et les arilles. Ny. Noyau ; Ar. Arilles ; Env. Enveloppe.

Source : A. <http://www.albion.edu/plants/bligsapg.htm>

B. <http://www.brevardrarefruit.org/photos/akee.html>

### 3.1.3 - Usages

Le fisanier est utilisé pour divers usages, selon les régions d'implantation. En plus de la consommation des arilles mûrs, on note une utilisation en médecine traditionnelle, ainsi que pour certains usages domestiques. Les différentes parties de la plante (écorces, feuilles, fruits mûrs et immatures, racines...) sont utilisées.

#### 3.1.3.1 - Usage alimentaire

C'est la partie charnue du fruit (surmontant les noyaux) qui est consommée, cuite ou encore crue. Elle est communément appelée arille.

Au Burkina Faso, les arilles sont surtout utilisés comme légumes pour la préparation des sauces, principalement dans la région sud-ouest. Par contre, en Côte d'Ivoire et au Ghana, ils sont très peu consommés.

En Amérique latine et aux Antilles, la consommation des arilles est assez répandue, surtout en Jamaïque où le fruit est connu sous le nom de « fruit national de la Jamaïque ». Les arilles sont très prisés dans cette région et ils y sont même mis en boîtes de conserve. Ce qui donne lieu à un commerce industriel.

#### 3.1.3.2 - Usage en médecine traditionnelle [53].

- En Côte d'Ivoire, une mixture d'écorce, mélangée à du piment est utilisée en pommade pour traiter les douleurs. Les jeunes feuilles écrasées sont appliquées sur le front, pour soigner les migraines sévères. Ecrasées avec du sel, les feuilles sont utilisées en cataplasme dans les cas d'ulcères. Le filtrat des feuilles écrasées est employé comme collyre dans le traitement des conjonctivites et autres ophtalmies.
- Au Brésil, de petites doses répétées d'un extrait aqueux de noyaux sont utilisées comme antiparasitaire. Le traitement est suivi par un purgatif salin ou huileux.
- Les Cubains utilisent une mixture d'arilles mûrs, de sucre et de cannelles comme fébrifuge, ainsi que dans le traitement des dysenteries.

- En Colombie, les feuilles et l'écorce sont considérés comme stomachique. Diverses préparations sont également utilisées dans le traitement de l'épilepsie et de la fièvre jaune.

### **3.1.3.3 - Autres usages [53].**

#### Le fruit:

En Afrique de l'Ouest, les fruits verts (qui produisent de la mousse dans l'eau) sont quelques fois utilisés pour la lessive.

Les fruits écrasés sont employés comme toxique pour pêcher les poissons. Les noyaux, riches en huile et l'enveloppe riche en potasse sont utilisés dans la fabrication de savon.

#### Les fleurs:

A Cuba, les extraits de fleurs sont beaucoup appréciés pour leurs senteurs et sont utilisés comme eau de cologne.

#### L'écorce:

Au Ghana, la mixture chaude des écorces pulvérisées et de poivre moulu est utilisée pour ses propriétés stimulantes, en application sur le corps.

#### Le bois:

En raison de sa solidité, le bois est utilisé pour la construction des cases et a même été recommandé pour les traverses de chemin de fer. Il est aussi utilisé pour la confection de pagaies.

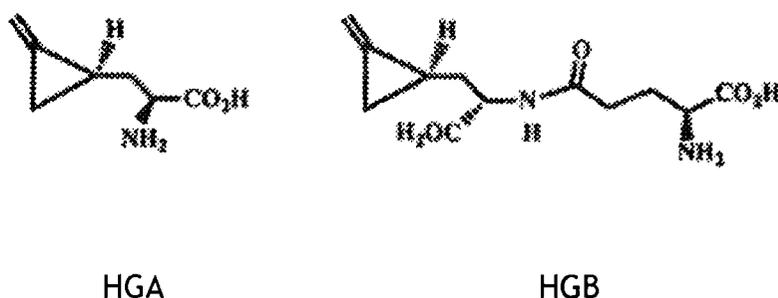
### 3.1.4 - Toxicité des fruits du fisanier

La toxicité des fruits du fisanier a été pendant longtemps mal appréhendée. On pensait au départ qu'elle résidait dans la membrane qui attache les arilles à l'enveloppe ou seulement dans les fruits trop mûrs ou alors en décomposition.

Les fruits immatures contiennent une substance très toxique appelée Hypoglycine A (HGA). Celle-ci comporte un dérivé gamma-glutamylé, l'Hypoglycine B (HGB) qui interviendrait également dans le processus toxique ; son rôle pathogénique n'est cependant pas encore totalement précisé [29, 21, 71, 8].

#### 3.1.4.1 - L'hypoglycine A, substance à l'origine de la toxicité du fisanier

L'HGA est un acide aminé non usuel, l'acide 2-amino-3-méthylencyclopropylpropionique. Il a été isolé (ainsi que son dérivé gamma-glutamylé, l'HGB) pour la première fois en 1955 par Hassal et Reyle [29].



**Figure 1** - Formules chimiques de l'hypoglycine A (HGA) et l'hypoglycine B (HGB).

L'HGA est un composé hydrosoluble et thermostable, donc non dénaturé par la cuisson. L'eau de cuisson des fruits toxiques serait plus toxique que les fruits eux-mêmes.

L'HGA a été détectée dans le fruit du fisanier. Pour déterminer la source de la contamination, la quantité d'HGA dans les différentes parties du fruit (arilles, noyaux, enveloppes) a été évaluée à divers stades de maturité par une méthode utilisant un analyseur d'acides aminés. Pour ce faire, le processus de maturation des fruits a été subdivisé en 10 stades (Annexes 2) [8].

Jusqu'aux stades 6 et 7 (correspondant à une ouverture légère des enveloppes), les fruits sont considérés comme étant immatures, donc impropres à la consommation, en raison du taux élevé en HGA. Ils ne sont matures et alors comestibles qu'à partir du stade 8, lorsque les enveloppes laissent totalement apparaître les arilles.

En effet, la teneur en hypoglycine A dans le fruit baisse au fur et à mesure qu'il mûrit. On note une forte décroissance de cette teneur à partir des stades 5 et 6, pour atteindre pratiquement zéro au stade 8 (Figure 2).

La teneur en hypoglycine A est différente selon les parties du fruit (noyaux, arilles et enveloppes). Elle est la suivante pour 100g de matière : 939 mg dans les noyaux, 41,6 mg dans les enveloppes et 711 mg dans les arilles, pour ce qui concerne les fruits non mûrs. Pour les fruits mûrs, elle est de 269 mg dans les noyaux, 43,3 mg dans les enveloppes et non détectable dans les arilles (Tableau II).

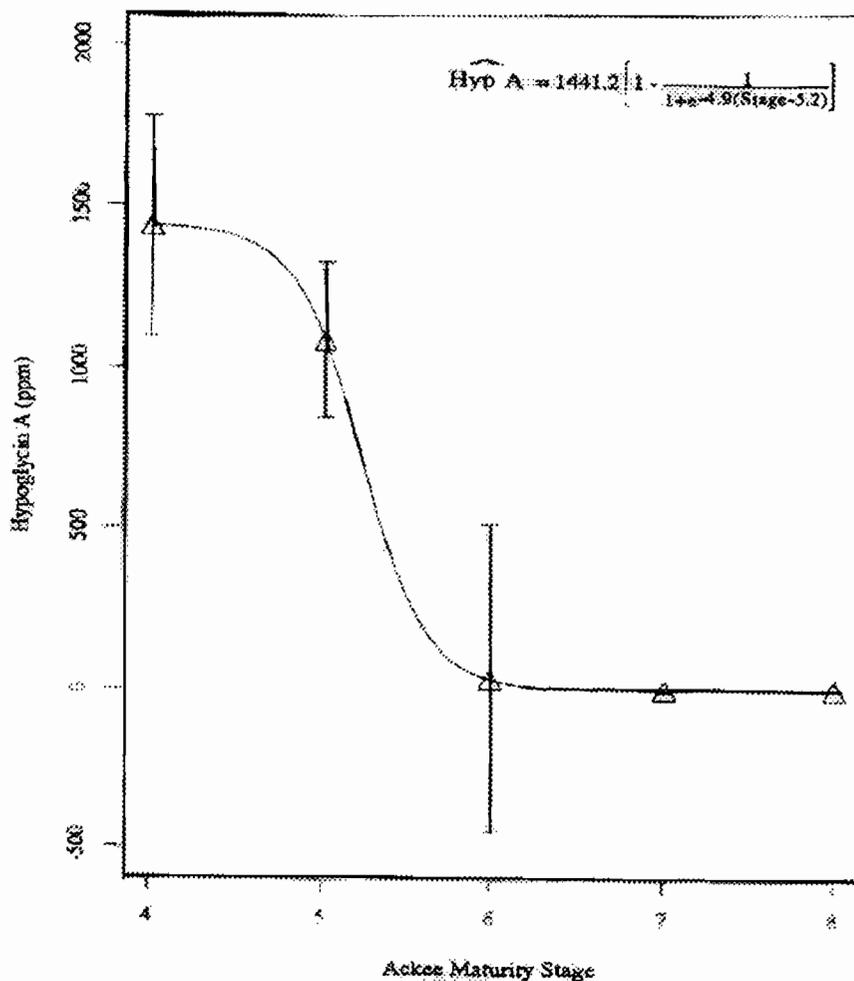
Cependant, la relation entre les modifications physiques du fruit et le catabolisme de l'hypoglycine A durant la maturation du fruit reste inconnue, et nécessite d'être élucidée.

**Tableau II** : Teneur en hypoglycine A dans les différentes parties du fruit à différents stades de maturité [13].

	Hypoglycine A, mg/100g		
	Enveloppes	Arilles	Noyaux
Fruits mûrs	43,3 ± 2,9	ND	269 ± 145
Fruits non mûrs	41,6 ± 10,4	711 ± 44,0	939 ± 117
Fruit vert	53,2 ± 8,2	NC	NC

ND = < au seuil de détection de 1,21 mg/100 g.

NC = Non constitué



**Figure 2** - Relation entre hypoglycine A (ppm) dans les arilles du fisnier et stade de maturation du fruit [8].

### 3.1.4.2 - Paramètres de toxicité de l'hypoglycine.

La dose maximale tolérée (DMT) d'un lyophilisât d'extrait d'arilles (déterminée chez la souris) est de  $1,87 \text{ g.kg}^{-1}$  [20].

La  $DL_{50}$  est estimée chez le rat à  $90 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour l'HGA pure et à  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour l'HGB pure. Ces données permettent de classer l'HGA et l'HGB parmi les substances très toxique (indice de toxicité 4) selon l'échelle de toxicité de Gosselin, Smith et Hodge.

Le jeûne ou l'état de dénutrition semble augmenter la sensibilité de l'organisme à l'hypoglycine.

### **3.2 - L'INTOXICATION AIGUE PAR LES ARILLES DU FISANIER**

L'intoxication aiguë par le fisanier survient en général sous forme d'intoxication collective, intéressant plusieurs enfants d'un même village, voire d'une même famille. Elle survient surtout à la faveur des périodes de disette, lorsque les récoltes sont mauvaises [46].

#### **3.2.1 - Données épidémiologiques**

##### ***3.2.1.1 - Au Burkina Faso***

Des cas d'intoxication par le fisanier ont été rapportés en 1999 lors d'une étude menée par le Centre MURAZ. Cette investigation a permis d'identifier formellement 29 cas d'EAF chez les enfants (de 2 à 6 ans). Les taux d'attaque spécifiques variaient de 31 à 847 pour 100 000 enfants, selon la zone géographique (Tableau III) [46].

Tous ces cas ont été observés au cours de la saison sèche (du mois de janvier au mois de mai), et pour la majorité dans le mois de mars. Il s'agit des premiers cas d'intoxications par le fisan à avoir été rapportés lors d'une étude au Burkina Faso. Cependant, les informations recueillies dans les registres des formations sanitaires au cours de cette étude ont indiqué qu'une douzaine de cas avaient été observés entre 1990 et 1997, pour la plupart dans la région de Toussiana (Sud Ouest du Burkina Faso) et toujours en saison sèche [46].

**Tableau III** - Répartition géographique des 29 cas d'EAF observés entre janvier et mai 1998, dans la région Sud-ouest du Burkina Faso [46].

zone géographique (Département)	Population totale	Nombre de cas	Taux d'attaque brut	Taux d'attaque spécifique (2 - 6 ans)*
Tousiana	13885	20	144,0	847
Beregadougou	12383	3	24,2	142
Peni	19130	3	15,6	92
Kourignon	10409	2	19,0	113
Banfora	18701	1	5,3	31
Total	74508	29	39	229

\* Pour 100000 habitants

### 3.2.1.2 - Dans les autres pays de l'Afrique de l'Ouest.

Plusieurs cas fortement suspects d'intoxication par le fruit du fisanier ont été récemment colligés:

Au Bénin, 10 à 15 cas d'EAF imputés à une intoxication par ces fruits ont été observés chaque année depuis 1986, à l'hôpital de Tanguiéta (Nord Bénin) [59].

En 1997, 40 cas ont été identifiés dans le district de Wansoukou, toujours au Bénin (Taux d'attaque spécifique = 889 pour 100000 hts/an) [59].

En 1996, 24 cas ont été identifiés en deux ans, dans la Commune de Botiakou (7056 habitants), adjacente à la précédente, avec un taux d'attaque brut de 170 pour 100 000 habitants/an [59].

En 1984, le décès d'une quarantaine d'enfants à Katiola (centre de la Côte d'Ivoire) entre mai et juin, a été attribué à l'ingestion d'arilles immatures de *Blighia sapida* [10].

### **3.2.1.3 - En Jamaïque**

L'association entre intoxication au fisanier et le syndrome toxique hypoglycémique a été notifiée depuis 1875 et publiée pour la première fois en 1904.

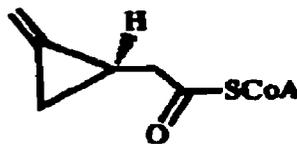
La consommation permanente du fisanier dans cette région depuis l'importation de l'arbre a conféré un caractère endémique à l'intoxication associée. Actuellement, la production des arilles y fait l'objet d'un commerce industriel.

L'incidence des cas d'intoxication par le fisanier a été estimée à un cas pour 100 000 personne/an. La majorité des cas apparaît entre janvier et mars. 74% des victimes sont âgés de moins de 15 ans, avec un taux d'attaque spécifique de 2 pour 100 000 personne/an [6].

De l'analyse des données disponibles, il ressort que l'on ignore l'ampleur exacte de cette intoxication dans l'ensemble des régions d'implantation de l'arbre. L'incidence réelle à travers le monde reste inconnue, mais semble être en générale sous estimée.

### 3.2.2 - Mécanismes d'action de l'hypoglycine A.

Les mécanismes biochimiques de la toxicité de l'hypoglycine A ne sont pas encore totalement élucidés. Cependant, il est démontré que l'hypoglycine A, après absorption par la voie digestive est métabolisé au niveau hépatique en méthylèncyclopropylacétyl-CoenzymeA (MCPA-CoA), métabolite responsable de la plupart des effets toxiques. Le MCPA-CoA est un inhibiteur irréversible de la  $\beta$ -oxydation des acides gras [17, 34, 35, 1, 22, 32, 51, 52].



**Figure 3** - Isomère (1R) du MCPA-CoA.

Le principal mécanisme d'action toxique de l'HGA consiste au blocage de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans la mitochondrie. Ce blocage provoque secondairement un certain nombre de réactions adverses (hypoglycémie, hypothermie, acidose métabolique...). Un rappel sur la  $\beta$ -oxydation et les implications biochimiques permet de mieux cerner ce mécanisme.

#### 3.2.2.1 - Rappels sur le cycle de la $\beta$ -oxydation des acides gras.

La  $\beta$ -oxydation est la voie de dégradation des acides gras dans la mitochondrie, conduisant à la formation du Nicotinamide Adenine Dinucléotide (NADH) et de la Flavine Adenine Dinucléotide (FADH<sub>2</sub>) ainsi que de l'acétyl-CoenzymeA (acétyl-CoA) [77].

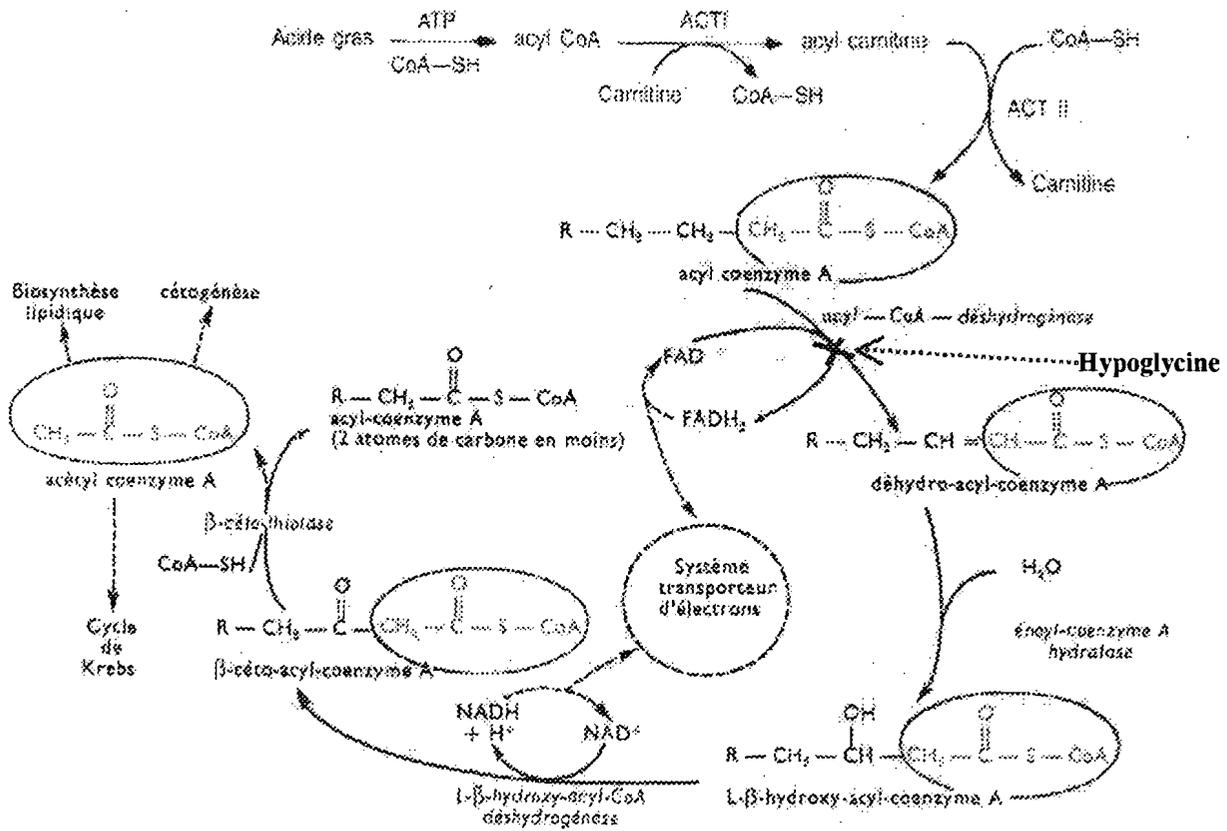
L'acétyl-CoA ainsi produit pourra être utilisé dans la néoglucogénèse ou dans la phosphorylation oxydative et le cycle de Krebs pour générer de l'énergie sous forme d'ATP. La  $\beta$ -oxydation constitue ainsi une source importante de production d'énergie pour l'organisme.

De façon synthétique, l'oxydation complète des acides gras se déroule en quatre grandes étapes :

1. Activation des acides gras en acyl-CoA (dans le cytosol de la cellule)
2. Passage des acyl-CoA à travers la membrane interne mitochondriale
3. Dégradation des acides gras saturés en acétyl-CoA : hélice de lynch
4. Oxydation complète de l'acétyl-CoA en CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O par le cycle de Krebs, conduisant à la formation d'une quantité importante d'énergie sous forme d'ATP à travers la réduction du NAD<sup>+</sup> et du FAD.

Dans l'hélice de lynch ou  $\beta$ -oxydation proprement dite des acides, il intervient quatre types de réactions :

- 1- Une réaction d'oxydoréduction à FAD : Conversion de l'acyl-CoA en trans- $\Delta^2$ -enoyl-CoA par l'*acétyl-CoA-déshydrogénase*.
- 2- Une réaction d'addition (hydratation) : formation du L- $\beta$ -hydroxyacyl-CoA par l'enoyl-CoA hydratase.
- 3- Une réaction d'oxydoréduction à NAD<sup>+</sup> : synthèse du  $\beta$ -cétoacyl-CoA par la  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase.
- 4- Une réaction de thiolyse, analogue à la réaction d'hydrolyse, libération d'acétyl-CoA et d'acyl-CoA raccourci de deux carbones (Figure 4).



**Figure 4 :** Les quatre réactions constituant un tour de spire de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans la mitochondrie [77].

**3.2.2.2 - Les implications biochimiques de la  $\beta$ -oxydation des acides gras**

Il existe une très grande interrelation entre les différentes voies métaboliques de l'organisme : Les voies cataboliques, qui correspondent à la dégradation de macromolécules (protéines, sucres, lipides) en molécules de faible taille s'effectuent avec une libération d'énergie libre dont une partie est stockée sous forme d'ATP et de transporteurs d'électrons réduits ( $NADPH$  et  $FADH_2$ ). Les voies anaboliques (biosynthèses de macromolécules ou de leurs précurseurs) nécessitent un apport d'énergie libre fournie généralement par l'hydrolyse de l'ATP et/ou par le pouvoir réducteur du  $NADPH$  et du  $FADH_2$ .

La première source d'énergie directement mobilisable par l'organisme est le glucose, à travers la réaction de la glycolyse. Il s'agit d'une forme d'énergie peu abondante, en raison des capacités de stockage limitée de l'organisme en glucose.

Lorsque le taux de glucose baisse à la faveur d'une quelconque circonstance, le déficit énergétique suscité est compensé par une activation de la combustion des lipides par la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans la mitochondrie.

Les capacités de stockage de l'organisme en lipides étant très grandes comparées à celle du glucose, la voie de dégradation des acides gras joue donc un rôle essentiel dans les processus métaboliques par son apport énergétique important.

Le dysfonctionnement des acyl-CoA déshydrogénases est à l'origine de divers processus pathologiques. C'est le cas par exemple du SIDS (Sudden Infantile Deaf Syndrome) : en effet, 10% des enfants victimes de SIDS présente un déficit en acétyl-CoA déshydrogénase.

Une autre maladie liée à cet enzyme est celle qui nous intéresse présentement : le syndrome toxique hypoglycémique, secondaire à la consommation des fruits immatures du fisanier.

### ***3.2.2.3 - Le processus d'inactivation de la $\beta$ -oxydation des acides gras par l'hypoglycine A.***

Le site sur lequel se manifeste la toxicité de l'hypoglycine a été identifié comme étant les acyl-CoA déshydrogénases [1, 22, 51].

Les acyl-CoA déshydrogénases ont pour rôle de catalyser la première étape de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Elles convertissent les thioesters d'acides gras en leur dérivés  $\alpha,\beta$  enoyl-CoA correspondant [77].

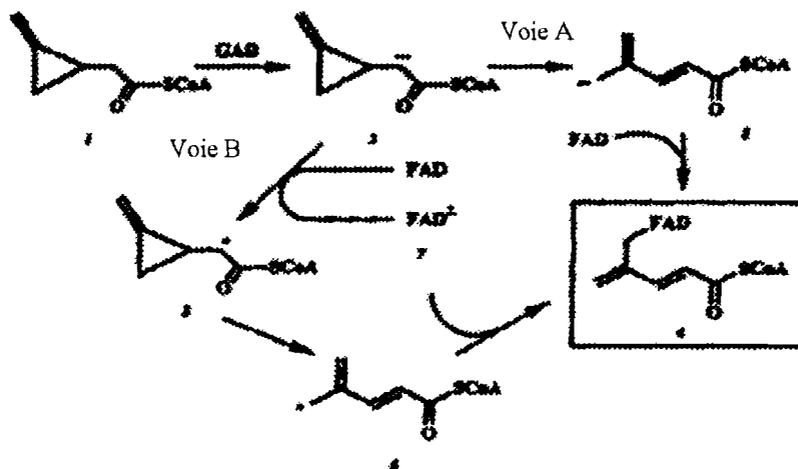
Le processus de l'inhibition des acyl-CoA déshydrogénases par le MCPA-CoA est initiée par une  $\alpha$ -déprotonation, suivie d'une rupture de liaison, conduisant à la formation d'un carbanion conjugué. Ce carbanion se fixe de façon covalente au coenzyme FAD, ce qui provoque l'inactivation enzymatique (Figure 5, Voie A). Ce procédé d'inactivation est non stéréospécifique, les isomères R et S du MCPA-CoA étant tous deux des inhibiteurs effectifs [51].

Il est aussi établi que le réarrangement d'un radical  $\alpha$ -cyclopropyl en radical alkyl linéaire est extrêmement rapide. L'inactivation non stéréospécifique des acyl-CoA déshydrogénases a donc également été envisagée comme une ouverture

spontanée du cycle. Processus induit par un radical  $\alpha$ -cyclopropyl intermédiaire. La modification du coenzyme FAD résulte alors de la recombinaison du radical acyclique avec le FAD (Figure 5, Voie B). Cette explication suppose une voie d'oxydation à un électron en opposition au mécanisme de clivage par anion induction [52].

Il existe ainsi deux hypothèses sur le mécanisme d'action probable de l'hypoglycine. Selon le mode de clivage envisagé (Figure 5, Voie A ou B), un carbanion conjugué ou un radical acyclique correspondant est généré, comme intermédiaire réactionnel qui, couplé au coenzyme FAD conduit à l'inactivation enzymatique.

Dans les deux cas, il semble que ce soit la modification covalente du coenzyme FAD au niveau du site actif des acyl-CoA déshydrogénases qui constitue le principal processus de cette inactivation. Cette modification étant déclenchée par la fragmentation du cycle du MCPA-CoA [52].



**Figure 5** - Voies d'inactivation des acyl-CoA déshydrogénases par le MCPA-CoA [52].

### 3.2.3 - Conséquences biologiques induites par l'inactivation des acyl-CoA déshydrogénases.

La toxicité de l'hypoglycine se manifeste au niveau d'un point sensible du système métabolique, la production énergétique. Il est donc tout à fait prévisible que tous les mécanismes biologiques nécessitant un apport d'énergie soient perturbés. Plusieurs répercussions biologiques peuvent ainsi être observés [69, 65, 25, 46] :

#### - Hypoglycémie.

Le blocage de la  $\beta$ -oxydation des acides gras provoque un important déficit énergétique. Ce déficit est compensé par une accélération intense du catabolisme des glucides. De plus, l'accumulation des acyl-CoA dans la mitochondrie provoque une inhibition de la pyruvate carboxylase (une enzyme de la néoglucogénèse), par compétition avec l'acétyl-CoA, stimulateur potentiel de cette enzyme. Cette inhibition indirecte de la néoglucogénèse, conjuguée à l'accélération du catabolisme des glucides explique comment l'hypoglycine A provoque l'hypoglycémie souvent sévère [49,35].

#### - Hyperammoniémie.

L'hyperammoniémie est une augmentation du taux d'ammoniaque dans le sang artériel au-dessus de 20  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ . L'ammoniaque est un produit toxique résultant de la dégradation des substances azotées dans l'organisme. Il est normalement éliminé dans les urines sous forme d'urée (Cycle de l'urée ou cycle de Krebs-Henseleit). Or la synthèse de l'urée par ce cycle nécessite un apport énergétique sous forme d'ATP, fournit en partie par le cycle d'oxydation des acides gras. L'inhibition de ce cycle qui provoque un déficit en ATP va donc entraîner une inhibition du cycle de l'urée, d'où une accumulation d'ammoniaque dans l'organisme [69].

**- Acidose métabolique.**

Il s'agit d'une acidose par accumulation d'acides « fixes » (c'est à dire ne pouvant s'éliminer sous la forme gazeuse du CO<sub>2</sub>). L'accumulation des acides dicarboxyliques, secondaire au blocage de l'oxydation des acides gras en est responsable [66].

**- Stéatoses micro vésiculaires**

Le mécanisme physiopathologique des stéatoses est un processus mécanique : Il s'agit d'une accumulation de triglycérides dans le cytoplasme cellulaire qui normalement n'en contient que des traces. Cette accumulation résulte de la surcharge liée à l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation.

Il apparaît alors des gouttelettes lipidiques intracellulaires dénuées de membrane propre et fusionnant facilement. Ce qui entraîne la constitution d'une vacuole graisseuse qui refoule à la périphérie tous les organites cellulaires et le noyau.

**3.2.4 - Hypothèses thérapeutiques**

Les hypothèses thérapeutiques ont pour but de rechercher une substance qui serait capable de neutraliser le toxique ou de s'opposer à ses effets dans l'organisme, par un mécanisme physique, chimique, biochimique ou pharmacologique. Il faut aussi qu'elle soit bien tolérée.

Les différentes hypothèses de thérapeutiques antidotiques qui sont proposées résultent du mécanisme d'action supposé du toxique, sur la base des connaissances actuelles. Il existe des bases théoriques sur l'utilité probable de la carnitine [42], de la glycine [63, 4], et du clofibrate [73, 74].

### **3.2.4.1 - La Carnitine**

La carnitine (acide  $\beta$ -hydroxy- $\gamma$ -triméthylaminobutyrique) est une molécule de faible masse moléculaire contenant une fonction ammonium quaternaire et une fonction hydroxyle qui lui permet de s'estérifier avec de nombreux acides carboxyliques, parmi lesquels figurent les acides gras, pour former des acylcarnitines. Ces acylcarnitines seront éliminés par les urines [60].

La carnitine acylée peut ainsi jouer un rôle détoxificateur lorsqu'elle est acylée avec des acyl-CoAs provenant du métabolisme de xénobiotiques (valproyl-CoA, salicylyl-CoA, benzoyl-CoA, pivaloyl-CoA) ou avec des acyl-CoA s'accumulant dans certaines situations pathologiques (propionyl-CoA, isovaléryl-CoA, octanoyl-CoA) [42].

Cependant, les expérimentations effectués chez le rat n'ont pas donné des résultats satisfaisants. L'administration de L-carnitine à des souris intoxiquées par l'hypoglycine n'a pas permis de réduire l'hypoglycémie et l'hypothermie [43].

### **3.2.4.2 - La glycine**

La glycine est un acide aminé glucoformateur qui intervient dans la synthèse du glutathion, de la créatine, des porphyrines et purines ainsi que dans la composition des acides biliaires. Elle participe aux processus de détoxication au niveau du foie.

Les esters d'acyl-CoA peuvent être conjugués dans le foie et les reins en acylglycine, conjuguées atoxiques. Réaction catalysée par la glycine-N-acétyltransférase. Cependant, la formation de ces conjugués atoxiques de la glycine avec les esters d'acyl-CoA dépend de la concentration de l'organisme en glycine.

En effet, une étude expérimentale effectuée chez le rat a montré des résultats concluants : L'administration de fortes doses de glycine à des rats ayant reçu une injection d'hypoglycine a permis de prévenir la mortalité, l'hypoglycémie et l'hypothermie, et de réduire fortement l'accroissement des concentrations plasmatiques d'isovalérate, de méthyl-2-butyrate, du butyrate et du

méthylène-cyclopropyl-acétate (MCPA), produit terminal du métabolisme de l'hypoglycine A [63].

### **3.2.4.3 - Le clofibrate**

Le clofibrate est un hypolipémiant, utilisé dans le traitement symptomatique des hypertriglycéridémies et des hypercholestérolémies. Il agit par une réduction du pool tissulaire de cholestérol, par inhibition de la biosynthèse du cholestérol et par la diminution du taux plasmatique des lipoprotéines (VLDL) et des triglycérides. Il s'oppose à la libération hépatique de triglycérides.

L'utilisation du clofibrate a permis de prévenir les effets toxiques de l'hypoglycine chez le rat. Une supplémentation quotidienne de 0,5% de clofibrate pendant une période de un à deux mois induit un effet protecteur et permet d'éviter l'hypothermie et l'hypoglycémie provoquées par une injection d'hypoglycine. Les atteintes hépatiques (modifications ultrastructurales) sont également évitées [73].

### **3.2.5 - L'encéphalopathie aiguë fatale due à l'hypoglycine**

On retrouve des similitudes dans les manifestations cliniques et biologiques des cas d'encéphalopathies aiguës fatales observés au Burkina Faso et ceux observés en Jamaïque [69, 26, 46].

#### **3.2.5.1 - Manifestations cliniques**

Selon l'importance de l'intoxication, le délai d'apparition des symptômes peut être retardé de plusieurs heures. Une fois initiée, la progression des symptômes est assez rapide. Les signes cliniques observés sont divers et parfois inconstants. Il y a souvent une accalmie trompeuse avant l'évolution fatale. La mort survient en moyenne en 12 à 24 heures après le début des signes.

On peut classer les signes cliniques observés en trois grandes catégories, signes généraux, manifestations gastro-intestinales et signes neurologiques :

### **Signes généraux :**

On observe une atteinte de l'état général avec faiblesse, hypotonie, pâleur et souvent, une soif intense est observée.

L'hypothermie est de règles: la température corporelle peut augmenter légèrement dans la phase initiale, mais la plupart des patients présentent une température subnormale (35 à 36°C) ou normale.

Tachycardie et tachypnée sont également observées dans certains cas.

### **Manifestations gastro-intestinales :**

Des nausées et vomissements persistants sont fréquemment observés. Ils constituent les premiers symptômes alarmants de l'intoxication. Ils peuvent être suivis d'une période de quiétude trompeuse. On n'observe pas de crampes ou de douleurs abdominales, ni de diarrhées.

### **Manifestations neurologiques :**

Elles sont parfois initiées par des céphalées. On observe surtout des convulsions généralisées, parfois précédées par des spasmes cloniques ou des contractions localisées des membres. Puis survient le coma.

#### ***3.2.5.2 - Manifestations biologiques***

- La manifestation biologique la plus apparente de l'intoxication au fisanier est l'hypoglycémie. Elle survient en général quelques temps après le début des symptômes. Souvent très sévère, elle peut atteindre des valeurs inférieures à 0,2 g/l.
- L'accumulation des acides dicarboxyliques va entraîner une acidose métabolique.
- On peut observer un déséquilibre hydro-électrolytique, conséquence des vomissements intenses. En particulier, hypokaliémie et déshydratation.
- L'accumulation de lipides suite à l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation dans les cellules hépatiques va provoquer une hépatotoxicité, se manifestant par :

- une augmentation de la bilirubine totale et conjuguée,
- une augmentation des phosphatases alcalines
- une augmentation des transaminases hépatiques
- L'élimination excessive d'acides dicarboxyliques dans les urines constitue un signe pathognomonique de l'intoxication au fisan. En particulier les acides éthylmalonique, glutarique et adipique. Leur détection et dosage permettent d'établir le diagnostic de certitude.
- Quelques biopsies hépatiques effectuées en post-mortem ont révélé des stéatoses micro vésiculaires massives, entourée par une stéatose macro vésiculaire touchant plus de 90% des hépatocytes, sans nécroses ni lésions inflammatoires associées. Ces lésions sont compatibles avec le syndrome de Reye [54, 46].

#### ***3.2.5.3 - Eléments de diagnostic biologique.***

- La détermination rapide de la glycémie dès l'admission dans le service de santé, permet d'évaluer l'importance de l'hypoglycémie, qui constitue un élément important d'orientation diagnostique.
- Le dosage des transaminases sériques SGOT et SGPT va permettre d'évaluer le niveau d'atteinte hépatique.
- Le taux sérique d'ammonium : l'hyperammoniémie est un élément caractéristique de l'intoxication au fisan, en dehors de toute autre cause probable (déficit enzymatique du cycle de l'uréogénèse).
- La détermination du pH artériel permet d'évaluer l'acidose.
- L'ionogramme sanguin, en particulier le dosage du sodium, du potassium, des chlorures et du CO<sub>2</sub> peut être effectué afin d'évaluer le statut électrolytique.

- **Autres examens** : La goutte épaisse négative et la ponction lombaire à liquide clair associés à l'état non fébrile du patient et l'absence de signes méningés doivent permettre d'écartier les hypothèses de paludisme grave ou de méningites, surtout en cas de convulsions.

#### **3.2.5.4 - Analyse toxicologique**

L'analyse toxicologique consiste à identifier et doser les acides dicarboxyliques dans les urines. En particulier les acides adipiques, glutarique et éthylmalonique. Ces acides dicarboxyliques sont des métabolites que l'on retrouve normalement dans l'organisme en faible quantité. Chez les jeunes enfants intoxiqués par le fruit immature du fisanier, on a observé une augmentation très importante des concentrations de ces acides dicarboxyliques (plus de cent fois supérieure à la normale)

Le dosage se fait sur un prélèvement d'urines, à l'aide d'un Chromatographe en phase gazeuse (CPG), couplé à un détecteur à ionisation de flamme. L'échantillon est préalablement dérivatisé par une réaction de silylation qui permet d'obtenir des dérivés plus faciles à analyser par chromatographie (les acides dicarboxyliques sont des composés très polaires difficilement analysables directement).

Les acides éthylmalonique, glutarique et adipique sont identifiés et dosés par la détermination des temps de rétention et l'intégration des pics obtenus. Le tableau IV présente un exemple de dosage effectué lors de l'épidémie d'EAF survenue au Burkina Faso en 1998.

**Tableau IV** : Concentrations d'acides dicarboxyliques dans les urines de 2 cas d'encéphalopathie aiguë fatale et 3 témoins appariés / sud-ouest du Burkina Faso, janvier - mai 1998 [46].

Sujets	Acides		
	ethylmalonique* (mg/g créatinine)	Acide glutarique* (mg/g créatinine)	Acide adipique* (mg/g créatinine)
<b>Cas</b>			
K.S. (garçon, 4 ans)	107	121	1193
T.L. (garçon, 3 ans)	655	2468	774
<b>Témoins</b>			
D.Y. (garçon, 4 ans)	24	ND*	ND
O.M. (garçon, 3 ans)	3	ND	ND
C.S. (garçon, 4 ans)	13	ND	ND

\* ND = Non détectable

### 3.2.6 - Prise en charge médicale de l'intoxication.

La prise en charge thérapeutique actuellement proposée au Burkina Faso consiste à mettre en place un traitement symptomatique, selon les manifestations cliniques et biologiques observées. En l'absence d'un traitement antidotique efficace avéré, cette démarche peut permettre d'éviter le risque vital, lorsqu'elle est mise en place assez rapidement. Cette démarche est également d'actualité en Jamaïque, où l'intoxication est bien connue. Une fiche de traitement a été élaborée par l'équipe du centre MURAZ en vue d'aider le personnel soignant des centres médicaux pour cette prise en charge. Elle a été diffusée dans toutes les zones à risque.

#### 3.2.6.1 - *Premiers gestes sur les lieux de l'intoxication*

Si l'intoxication est récente et l'intoxiqué conscient, il convient de le faire vomir immédiatement. Ce geste peut permettre de réduire l'absorption digestive du toxique et donc de limiter ses effets.

Puis, transférer le malade en milieu hospitalier en position de décubitus latéral gauche, surtout pour ce qui concerne les malades obnubilés, afin de protéger les voies respiratoires.

Les circonstances de découvertes sont très importantes pour la prise en charge de l'intoxication. C'est pourquoi il est utile de noter tous les éléments pouvant être en rapport avec l'intoxication, en particulier la notion d'ingestion de fisan non mûr ou la présence de fisan non mûr dans la concession familiale ou à proximité.

### **3.2.6.2 - En milieu hospitalier**

Un traitement symptomatique doit être mis en place dès l'admission à l'hôpital. Il consiste à prendre en charge l'hypoglycémie, les convulsions, les déséquilibres hydro-électrolytiques éventuels :

#### ***L'Hypoglycémie :***

La correction de l'hypoglycémie constitue la première urgence de cette thérapeutique. Elle se fait par perfusion de sérum glucosé.

#### ***Les convulsions :***

On peut arriver à faire céder les convulsions par administration intraveineuse ou intrarectale de Diazépam à la dose de  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , à répéter éventuellement au bout d'une demi-heure si les crises ne cèdent pas.

#### ***Lavage gastrique :***

Le lavage gastrique est un traitement évacuateur visant à réduire l'absorption digestive du toxique. L'état de l'intoxiqué, vigile ou comateux ainsi que le délai écoulé depuis l'ingestion constituent les critères de décision. Dans tous les cas, les défaillances vitales doivent être corrigées avant la pratique du lavage gastrique. La précocité et l'efficacité du traitement symptomatique initial sont plus importantes que l'éventuelle réalisation du lavage gastrique.

### **3.3 - INTOXICATION CHRONIQUE PAR LE FISANIER**

Il existe très peu de données ayant trait à la toxicité chronique des arilles du fisanier. La seule description que nous avons rencontrée dans la littérature concerne un cas d'ictère choléstatique, observé suite à la consommation répétée du fisanier. Ce cas était cliniquement caractérisé par un prurit, des diarrhées intermittentes, et une douleur abdominale localisée au niveau de la région hépatique. Les tests hépatiques ont montré une augmentation du taux de la bilirubine totale, des phosphatases alcalines, et des transaminases hépatiques. A la biopsie hépatique, une nécrose centrolobulaire a été observée [40].

### 3.4 - LE BLEU DE METHYLENE

#### 3.4.1 - Bases physiologiques de l'utilisation du bleu de méthylène dans l'intoxication par le fisan.

C'est à partir de certaines observations que Küpfer *et al.* ont proposé l'utilisation du BM dans l'intoxication par le fisanier : Il existe de proches équivalences entre le mécanisme, la clinique et la biologie de l'intoxication au fisan et certaines pathologies (l'encéphalopathie à l'ifosfamide et l'acidurie glutarique congénitale type II). Les bases thérapeutiques de celles-ci ont donc été exploitées [39].

##### L'Encéphalopathie à l'ifosfamide :

L'ifosfamide est un isomère structural du cyclophosphamide. C'est un agent alkylant, possédant un large spectre antinéoplasique. Il est utilisé en chimiothérapie anticancéreuse, aussi bien en intraveineuse que par voie orale pour le traitement du carcinome cervical, des tumeurs osseuses, des sarcomes des tissus mous, des tumeurs des cellules germinales... etc. Il s'agit en fait d'une prodrogue, qui est métabolisé dans le foie en présence du cytochrome P450, en isofosforamide, métabolite actif. Son utilisation a été limitée à cause de sa néphrotoxicité occasionnelle (effet secondaire), néphrotoxicité atténuée ou évitée par l'administration concomitante de Mesna (agent uro-protecteur) [38].

Cependant, une encéphalopathie a été observée chez 10 à 20% des patients, après l'administration de l'ifosfamide.

Pendant des années, le mécanisme de cette toxicité est resté inconnu, jusqu'à ce que Küpfer et ses collaborateurs observent une excrétion urinaire excessive d'acide glutarique et de sarcosine chez un patient ayant reçu une dose excessive d'ifosfamide. [37]. Ceci leur a permis de proposer qu'un déséquilibre de l'oxydation des acides gras au niveau mitochondriale soit la cause sous jacente de la toxicité, tout comme dans l'acidurie glutarique type II.

L'administration de BM est efficace dans le traitement de l'acidurie glutarique type II. Küpfer *et al.* ont alors émis l'hypothèse que le blocage mitochondrial résultant de l'administration d'ifosfamide est comparable à

l'acidurie glutarique type II et donc similairement traitable par l'administration de BM. L'efficacité du BM dans le traitement de l'encéphalopathie provoquée par l'ifosfamide a été confirmée [37, 18, 3].

#### **L'intoxication à l'hypoglycine :**

Le mécanisme toxique de l'hypoglycine est comparable au modèle d'acidurie organique type II et au modèle d'acidurie provoqué par l'intoxication à l'ifosfamide. En effet, l'hypoglycémie induite est secondaire à une inhibition de l'oxydation des acides gras au stade des acyl-CoA déshydrogénases. Les déshydrogénases des acyl-CoA à chaînes courtes et moyennes ainsi que l'isovaleryl-CoA déshydrogénase sont inactivés irréversiblement par le MCPA-CoA [32, 71, 39].

Ces observations ont conduits à l'hypothèse selon laquelle le BM pourrait être efficace pour traiter l'encéphalopathie provoquée par le fisanier [39].

### **3.4.2 - Données pharmacologiques et utilisation du BM en toxicologie**

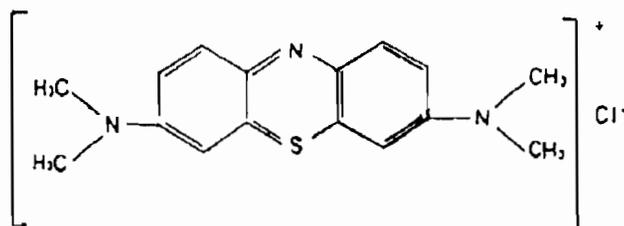
- **Propriétés pharmacologiques du BM**

Le BM est un oxydo-réducteur. Il est utilisé en thérapeutique pour ses propriétés antidotique, antiseptiques, de colorant et d'agent diagnostique (repérage des trajets fistuleux). Son temps de demie vie est d'environ 5 à 6 heures [3].

En toxicologie clinique, le BM est utilisée dans le traitement des intoxications aux cyanure, nitrites et nitrates, ainsi que le traitement de certaines intoxications médicamenteuses (dapson, valproate...), particulièrement pour la rémission de la méthémoglobinémie. Ces composés provoquent une oxydation du fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) en fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) dans la molécule d'hémoglobine. L'hème est oxydé en hématine (méthémoglobine), oxydation qui s'accompagne d'une perte de la propriété du groupement prosthétique de se combiner à l'oxygène.

La formation de méthémoglobine in vivo, soit à la suite d'une intoxication grave, soit à la suite d'une maladie métabolique rend impossible le transport de l'oxygène. Le déficit de l'organisme en oxygène va se traduire par une atteinte cardiovasculaire et une atteinte du SNC. La pathologie se manifeste par les signes

suivants : faiblesse, migraines, dyspnée, douleurs de la poitrine, confusions, altération du statut mental, délires, cyanoses, dysrhythmies cardiaque (à type de bradyrhythmie et dysrhythmie ventriculaire), ischémie cardiaque ou neurologique, acidose, convulsions et coma.



**Figure 6** - Formule chimique du Bleu de Méthylène.

**Nom chimique :** Bis-(Diméthylamino)-3,7 Phenazothionium chlorure.

**Classe Chimique :** Phenazothionium

**DCIR :** Chlorure de méthylthionium

- **Indications thérapeutiques du BM**

- **Indication principale et mode d'action :**

L'indication principale du BM est l'intoxication par les produits méthémoglobinisants, avec présence de signes cliniques de méthémoglobinémie (signes d'hypoxie) et/ou une méthémoglobinémie supérieure ou égale à 30%.

Le BM permet de convertir la méthémoglobine en hémoglobine par une réaction d'oxydo-réduction. Il induit une potentialisation de l'activité de la diaphorase II ou NADPH-dépendante méthémoglobine réductase.

- **Autres indications du BM :**

- Antiseptique urinaire (traitement des cystites).
- Lésions cornéennes.
- Repérage des trajets fistuleux.
- Antiseptique locale.
- Usage vétérinaire.

### **3.4.3 - Mécanisme d'action antidotique du bleu de méthylène dans l'intoxication par l'hypoglycine A.**

Le mécanisme d'action du BM dans l'intoxication par l'hypoglycine A n'est pas encore élucidé. Toutefois, il est possible d'émettre des hypothèses, sur la base d'études en rapport avec l'activité du BM sur le cycle de l'oxydation des acides gras.

Le BM stimule de façon sensible l'oxydation des acides gras dans la ...itochondrie. Dans une étude expérimentale, l'administration de BM à des rats a induit une forte accélération de l'oxydation des acides gras, très probablement par une modification de la perméabilité membranaire mitochondriale [75].

Nous pouvons ainsi supposer que le BM compenserait par ce mécanisme, le déficit énergétique induit par l'hypoglycine A. Il s'agirait alors d'un processus antidotique par antagonisme métabolique.

## **IV - MATERIEL ET METHODES D'ETUDE**

### **4.1 - MATERIEL**

#### **4.1.1 - Cadre d'étude: le Centre MURAZ**

Le Centre MURAZ est un centre de recherche de l'ex Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies (OCCGE). Il a été érigé en janvier 2000 en Etablissement Public à caractère Administratif (EPA).

Le Centre MURAZ intervient dans divers axes de la santé, principalement dans le domaine de la recherche. Les activités scientifiques y sont menées dans le cadre de trois grandes thématiques :

- la thématique Paludisme et autres maladies parasitaires.
- la thématique VIH et Maladies associées
- la thématique Vaccinologie et épidémiologie d'intervention.

Le Centre Muraz comporte un plateau technique élaboré, avec un laboratoire de biologie moléculaire et un laboratoire d'analyse biomédicale.

Notre travail à été réalisé dans le cadre des activités de l'Unité d'Epidémiologie et de Recherche Opérationnelle (UERO), dirigée par le Docteur Hubert BARRENES. Il s'intègre dans la suite de l'investigation menée en 1998 par l'équipe de chercheurs du Centre Muraz, par rapport à l'épidémie d'EAF. Ce travail à été réalisé avec l'appui matériel des laboratoires.

#### **4.1.2 - Matériel d'étude**

##### **- Matériel biologique.**

Les expérimentations sont effectuées sur des souris mâles (souche NMRI) de trois mois d'âge, pesant de 30 à 40 g. Elles sont fournies par le Centre International de Recherche - Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES). Les animaux sont acclimatés à l'animalerie du Centre MURAZ une semaine avant le début des expérimentations. Ils sont placés dans des cages en plastiques ou en bois à la température de  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , avec un éclairage jour - nuit de 12h - 12h.

Pendant cette période, les souris ont accès à la nourriture (alimentation standard) et à l'eau ad libitum. L'alimentation est suspendue durant les 24 heures précédant l'expérimentation. Les animaux ne sont re-alimentés que 3 heures après l'administration du toxique.

Des travaux de remise en état de l'animalerie ont été effectués avant le début des expérimentations.

**- Le Bleu de Méthylène**

Le BM utilisé pour les essais a été fourni par le Professeur A. Küpfer du Département de Pharmacologie Clinique de l'Université de Berne, en Suisse. Il est présenté en ampoule de 1ml à 2% (20mg/ml).

**- Extrait de fruits immatures de *Blighia sapida***

Nous avons utilisé dans nos essais, un extrait de fruits non mûrs de fisanier, préalablement dégraissé à l'éther de pétrole. L'extrait à été préparé par la méthode de la percolation. Les fruits ont été prélevés dans la ville de Bobo-dioulasso. Une prise d'essais d'environ 350g de drogue a été utilisée. Le percolat obtenue est soumis à une évaporation rotative au rotavapor afin d'obtenir un extrait sec.

L'extrait sec est utilisé pour l'intoxication des animaux, par suspension ou solubilisation dans de l'eau distillée.

## 4.2 - METHODES D'ETUDE

L'étude expérimentale est menée suivant trois grandes étapes :

- La première étape consiste à étudier la toxicité de l'extrait de fruits du fisanier : Il s'agit de déterminer la  $DL_{50}$ , mais surtout la  $DL_{100}$ . C'est cette dose qui est par la suite utilisée pour l'étude de l'efficacité du BM.
- La seconde étape consiste à étudier l'efficacité du BM sur la létalité des animaux préalablement intoxiqués (par administration orale d'une dose unique  $DL_{100}$  d'extrait de fruits du fisanier). Elle conduit à la détermination de la  $DE_{50}$  du BM.
- La dernière étape consiste à évaluer les délais d'efficacité du BM ainsi que l'intérêt d'une administration précoce de glucose aux souris intoxiquées.

### 4.2.1 - Détermination des doses létales de l'extrait d'arilles chez la souris

La  $DL_{50}$  est la quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % (la moitié) d'un groupe d'animaux d'essai [5]. C'est un paramètre qui permet de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'une matière [41].

La  $DL_{100}$  est la quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 100 % (la totalité) d'un groupe d'animaux d'essai [5].

On détermine les  $DL_{50}$  et  $DL_{100}$  de l'extrait d'arilles par administration de doses croissantes à plusieurs lots de souris, jusqu'à obtention d'une mortalité totale des souris dans le groupe d'essai.

Cinq lots de six souris chacun sont constitués, par un échantillonnage aléatoire. Dans chaque lot, les animaux reçoivent une dose précise d'extrait (Tableau V).

L'administration de l'extrait se fait par voie orale à l'aide d'une sonde gastrique, sous forme de solution dans de l'eau distillée (la préparation est extemporanée). Le volume administré reste le même quelle que soit la dose, soit 0,2 ml pour 10g de poids corporel.

On enregistre la mortalité cumulée des animaux dans chaque lot au bout d'une période de 72 heures (3 jours).

**Tableau V** : Doses d'extrait de fisan administré aux différents lots d'essai.

Groupes d'essai	Dose d'extrait administrée (g.kg <sup>-1</sup> )
Lot I	1,00
Lot II	1,50
Lot III	2,00
Lot IV	2,50
Lot V	3,00

#### 4.2.2 - Etude de l'efficacité du BM : détermination de la DE<sub>50</sub>

L'étude de l'efficacité du BM consiste à déterminer la DE<sub>50</sub> : C'est la quantité de BM qui permet la survie de 50 % (la moitié) d'un groupe d'animaux d'essai, après administration d'une dose toxique d'extrait. Elle consiste aussi à déterminer l'effet de l'administration du BM sur les signes cliniques de l'intoxication chez la souris.

Les critères suivants sont donc retenus :

- mortalité cumulée des animaux au bout de 72 heures (J<sub>3</sub>) et 14 jours ( J<sub>14</sub>).
- temps de survie total
- mesures pondérales quotidiennes.
- glycémie des animaux dans chaque lot, 24 heures après intoxication.
- température des animaux dans chaque lot 24 heures après intoxication.

L'essai de désintoxication par le BM est réalisé sur des groupes d'essai de six souris chacun. Dans chaque groupe, les souris reçoivent une dose toxique unique (DL<sub>100</sub>) d'extrait de fisan par voie orale, à l'aide d'une sonde gastrique. Puis une dose précise de BM en administration intra péritonéale (Tableau VI).

Le protocole suivant est adopté :

- Une dose immédiatement après l'intoxication,
- Une dose 6 heures après l'intoxication,
- Une dose 12 heures après l'intoxication.

Un lot témoin constitué également de six souris reçoit de l'eau physiologique à la place du BM (lot témoin fisan).

Un autre lot de six souris non intoxiquées par le fisan mais traitées par le BM en administration intrapéritonéale est également suivi (lot témoin BM).

La mortalité est enregistrée dans chaque lot au bout de 72 heures (Mortalité  $J_3$ ) puis à  $J_{14}$  (Mortalité  $J_{14}$ ). Le temps de survie (en jours) de chaque souris est également enregistré. Il permettra de calculer le temps de survie total par lot au cours de la période de surveillance.

**Tableau VI** : Doses de bleu de méthylène administré par groupe d'essai.

Groupes d'essai	Traitement administré
I(témoin fisan):	Extrait de fisan + Eau physiologique
II	Extrait de fisan + 2 mg.kg <sup>-1</sup>
III :	Extrait de fisan + 4 mg.kg <sup>-1</sup>
IV :	Extrait de fisan + 6 mg.kg <sup>-1</sup>
V :	Extrait de fisan + 8 mg.kg <sup>-1</sup>
VI :	Extrait de fisan + 10 mg.kg <sup>-1</sup>
VII :	Extrait de fisan + 12 mg.kg <sup>-1</sup>
VIII :	Extrait de fisan + 14 mg.kg <sup>-1</sup>
IX(témoin BM)	Eau + 14 mg.kg <sup>-1</sup>

### Modalités de surveillance et examens réalisés

Les animaux sont suivis pendant une période de 14 jours. Les observations cliniques sont effectuées par intervalle de 2 heures le premier jour du test, puis 2 fois par jours. Les examens suivants sont réalisés au cours de l'essai :

#### • Observations cliniques

Au cours de l'essai, les symptômes d'intoxication éventuels, leur délai d'apparition, leur intensité et leur durée sont notés, ainsi que les effets sur le comportement. La mortalité cumulée des animaux 72 heures après intoxication et à  $J_{14}$  est enregistrée dans chaque lot.

#### Evolution pondérale

On effectue des pesées quotidiennes tous les matins pendant la période de surveillance. Ces pesées sont réalisées à l'aide d'une balance électronique.

- **Mesures de la glycémie.**

Les mesures de la glycémie sont effectuées sur quatre prélèvements, aux temps  $T_0$ ,  $T_3$ ,  $T_6$  et  $T_{12}$  (en heures) le premier jour de l'essai. Les prélèvements sont réalisés au niveau de la queue, le plus près possible de son extrémité.

La glycémie est appréciée à l'aide de bandelettes réactives BM-Test-Glycémie 20-800 (laboratoire BOEHRINGER MANNHEIM).

On utilise une goutte de sang, que l'on dépose sur la partie réactive de la bandelette. On obtient une coloration dont l'intensité varie suivant la valeur de la glycémie. L'appréciation de la glycémie se fait alors de façon visuelle, par rapprochement de la cette couleur avec un panel de couleurs prédéfinis, correspondant à des doses précises (Annexes 5).

- **Mesures de la température rectale**

Les mesures de température sont effectuées à l'aide d'un thermomètre digitale de marque MT 1621-BMWC (SABILUC) (Annexe 3 ).

Les mesures sont effectuées aux temps  $T_0$ ,  $T_3$ ,  $T_6$  et  $T_{12}$  et  $T_{24}$  (en heures), le premier jour de l'essai.

**4.2.3 - Détermination du délai d'intervention**

Des lots de six souris chacun sont constitués. Dans chaque lot, les animaux reçoivent une dose unique ( $DL_{100}$ ) d'extrait de fisan par voie orale, puis une dose de BM (Dose entraînant une réduction significative de la mortalité) selon un temps (T) après administration du toxique (Tableau VII).

La mortalité cumulée dans chaque lot est enregistrée au bout de 72 heures après l'intoxication, puis à  $J_{14}$ .

**Tableau VII** : Délais d'administration du BM après administration du toxique.

Lots d'essai	Délais d'administration (T) du BM après intoxication
I	30 minutes
II	1 heure
III	2 heures
IV	3 heures
V	4 heures
VI	6 heures

#### 4.2.3 - Intérêt d'une administration précoce de glucose.

L'intoxication par l'hypoglycine A est toujours associée à une forte hypoglycémie. On peut supposer que cette hypoglycémie joue un rôle majeur dans le processus morbide.

Dans l'hypothèse qu'une administration précoce de glucose permettrait de maintenir la glycémie à un taux normal et donc pourrait être bénéfique pour réduire la mortalité, nous avons entrepris d'étudier l'intérêt d'une administration précoce de glucose.

Pour ce faire, deux lots de 25 souris chacun sont constitués.

- Le premier lot reçoit une administration de  $3 \text{ mg.kg}^{-1}$  de glucose (en intra péritonéale) à chaque heure, dès l'administration du toxique. Puis une dose de  $8 \text{ mg.kg}^{-1}$  de BM au temps (T) = 6 heures, 12 heures et 24 heures.
- Le second lot ne reçoit que le traitement par le BM, aux mêmes moments que le lot précédent (Tableau VIII).

La mortalité à  $J_3$  et la mortalité à  $J_{14}$  sont alors enregistrées dans les deux lots.

**Tableau VIII** : Traitement administré à 2 lots de 24 souris  
(lot BM + Glucose et lot BM seul).

Groupes d'essai	Temps(en heure)							
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>12</sub>	T <sub>18</sub>
<b>Lot I :</b> BM + Glucose	Glucose	Glucose	Glucose	Glucose	Glucose	BM +	BM +	BM +
						Glucose	Glucose	Glucose
<b>Lot II</b> BM seul						BM	BM	BM

#### 4.2.4 - Analyse des données

Les calculs statistiques sont effectués à l'aide de Logiciel EXCEL sous Windows et du module EPITABLE Calculator du Logiciel EPI INFO version 6.04bfr. La comparaison des proportions est effectuée par le test exact de Fisher, et les comparaisons de moyennes par une analyse de variances.

Le calcul des doses létales est obtenu par le logiciel *CIRAD-CA / URBI Montpellier Dose Létale 50 - Version 4.6*, tandis que le calcul de la Dose efficace 50 du BM est effectué par le logiciel *STATPHAR vers 2.6 / Laboratoire de Pharmacologie - Faculté de Médecine, Limoges - France*.

## V - RESULTATS

### 5.1 - TOXICITE AIGUE DE L'EXTRAIT D'ARILLES DU FISANIER.

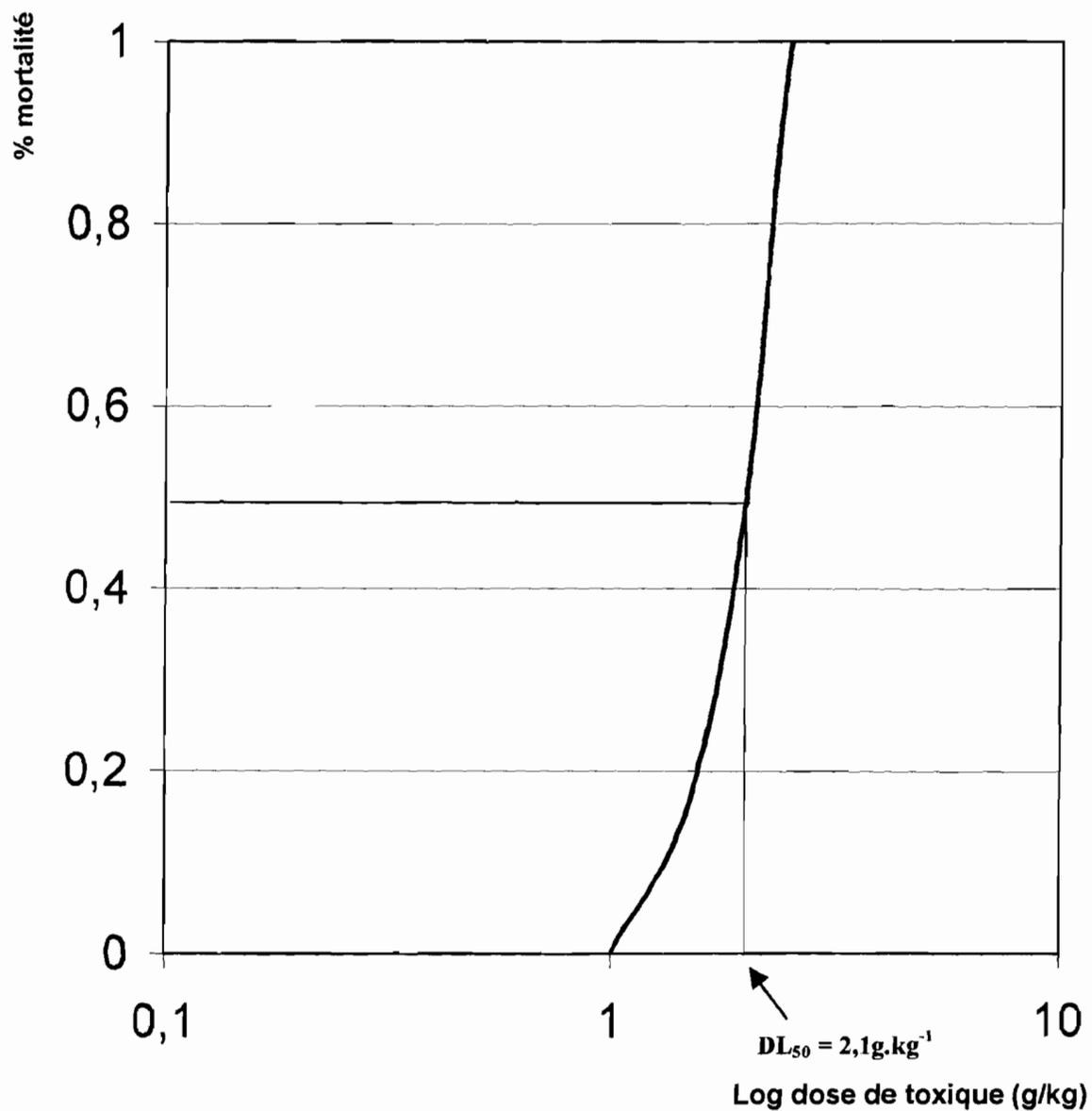
- Doses létales 50 et 100 de l'extrait d'arilles.

L'administration de doses uniques d'extrait du fisanier provoque une mortalité totale (100% des animaux) dans le groupe d'essai à partir de  $2,5 \text{ g.kg}^{-1}$  de poids corporel, tandis qu'à la dose de  $1,0 \text{ g.kg}^{-1}$ , on n'observe pas de létalité (Tableau IX). Les effets toxiques (signes d'intoxications) sont observables à partir de  $1,5 \text{ g.kg}^{-1}$  de toxique.

La  $DL_{50}$  estimée par la méthode de régression logarithmique est de  $2,1 \text{ g.kg}^{-1}$ . La  $DL_{100}$  observée est de  $2,5 \text{ g.kg}^{-1}$ .

**Tableau IX** : Mortalité cumulée des animaux 72h après intoxication, selon la dose de toxique administrée.

Dose de toxique ( $\text{g.kg}^{-1}$ )	Mortalité cumulée des animaux dans le groupe d'essai (n = 6)		
	Essais 1	Essais 2	Essais 3
1,0	0	0	0
1.5	1	2	0
2,0	3	4	2
2.5	6	6	6
3,0	6	6	6



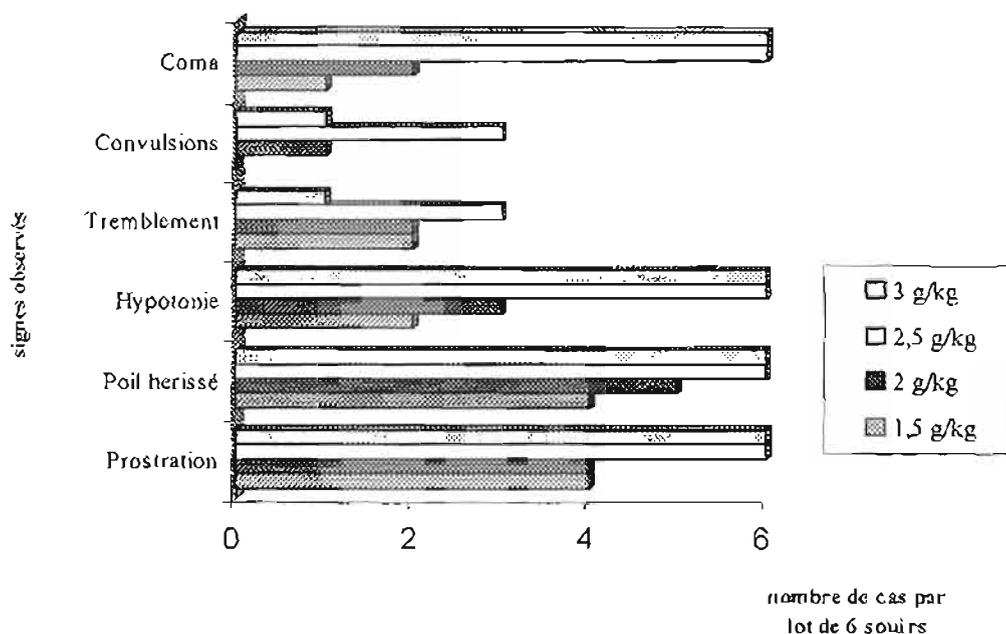
**Figure 7** : Courbe dose-effet : mortalité des souris en fonction de la dose de toxique (ajustement logarithmique).

• Signes cliniques de l'intoxication aiguë chez la souris.

On observe une prostration sévère des animaux, qui survient environ 2 heures après l'administration du toxique. La souris reste blottie dans un coin de la cage, et ne présente aucune réaction de fuite ou d'agressivité au touché, contrairement aux souris saines.

Le pelage est presque toujours hérissé, même lorsque la dose du toxique n'est pas suffisante pour provoquer la mort de la souris. Hypotonie, tremblements e parfois des convulsions sont également observés. La mort survient en moyenne 8 - 16 heures après l'administration de l'extrait, presque toujours dans un tableau de coma. On observe une mortalité plus rapide, lorsque la dose d'extrait est élevée.

De façon générale, on observe une intensification des signes ave l'augmentation des doses de toxique (Figure 8).



**Figure 8** - Signes cliniques observés en fonction de la dose de toxique administrée.

## 5.2 - EFFICACITE DU BLEU DE METHYLENE

### 5.2.1 - Effet sur la mortalité et le temps de survie des animaux.

La mortalité cumulée 72 heures après traitement (mortalité J<sub>3</sub>) diminue avec l'augmentation des doses de BM, pour atteindre une mortalité nulle à partir d'une administration minimale de 8 mg.kg<sup>-1</sup> de poids corporel (Tableau X). Cependant, la mortalité J<sub>14</sub> est encore plus élevée que celle à J<sub>3</sub>, même pour les doses de BM supérieures à 8 mg.kg<sup>-1</sup> (Figure 9).

Parallèlement, le temps de survie totale par lot augmente au fur et à mesure que les doses de BM administrées sont élevées. D'environ 10 jours pour le lot témoin (n'ayant pas reçu de BM), il atteint une valeur optimum d'environ 81 jours pour le lot de souris traité par 14 mg.kg<sup>-1</sup> de BM (Figure 10).

**Tableau X** : Mortalité cumulée 72h après intoxication, selon la dose de Bleu de Méthylène(BM) administrée.

Doses de BM administrée (mg.kg <sup>-1</sup> )	Mortalité J <sub>3</sub>	Mortalité J <sub>14</sub>
0	6	6
2	4	4
4	3	3
6	1	1
8	0	2
10	0	2
12	0	1
14	0	1

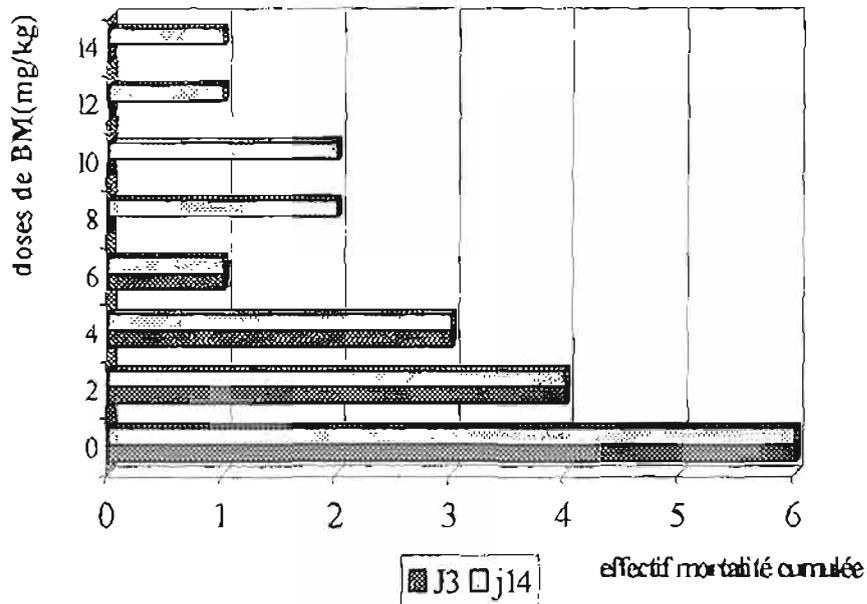


Figure 9 : Mortalité cumulée des souris à J<sub>3</sub> et J<sub>14</sub> après intoxication selon la dose BM administrée.

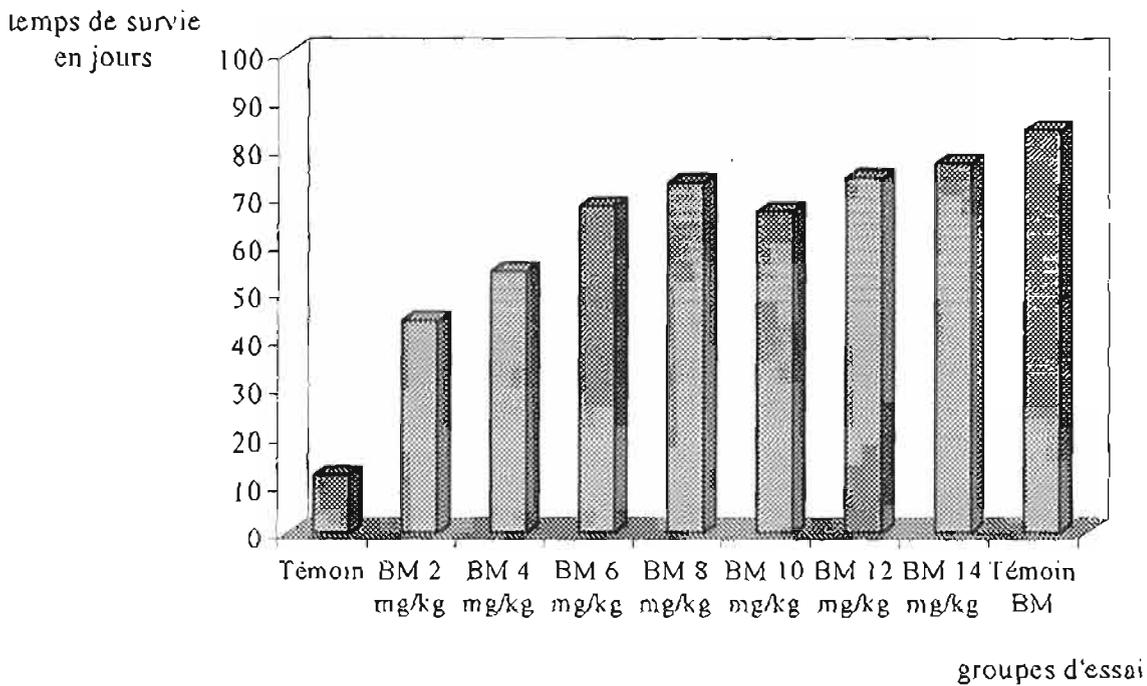


Figure 10 : Temps de survie total par groupe d'essai (selon la dose de BM).

**5.2.2 - Dose efficace 50 du Bleu de méthylène.**

Le traitement des souris par le BM induit une réduction de la mortalité. Cette réduction de mortalité semble corrélée à la dose de BM administrée : Plus la dose administrée est importante, plus la mortalité observée est faible (Tableau VIII).

Les résultats obtenus nous permettent de calculer la DE<sub>50</sub> du BM. Elle est ainsi estimée à 3,1 ± 1,78 mg.kg<sup>-1</sup>.

**5.2.3 - Effet sur la température rectale**

Le lot de souris saines présente une température rectale de 36,5 ± 1°C en moyenne. L'administration de l'extrait de fisan provoque une forte diminution de la température rectale dans le lot de souris témoin (lot non traité) : d'une valeur de 36,9 ± 1°C avant administration du toxique, la TR passe à 32,8 ± 1°C au bout de 24 heures (Tableau XII).

Dans le lot dont l'administration de l'extrait est suivie par le traitement au BM, la Température rectale diminue de façon moindre à la 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> heure. Elle remonte à partir de la 12<sup>ème</sup> heure et tend à se normaliser au bout de la 24<sup>ème</sup> heure (Figure 11).

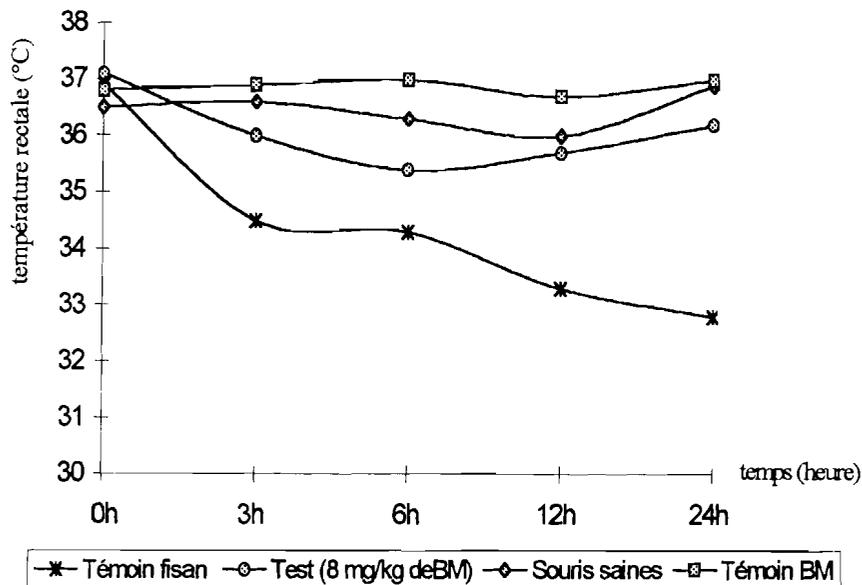
On n'observe aucune variation particulière aussi bien dans le lot de souris saines que dans le lot témoin BM (Tableau XII).

**Tableau XI** : Température rectale moyenne des souris par groupe d'essai en fonction du temps.

Groupes d'essai (n=6)	Température rectales (TR) en °C				
	TR avant intoxication	TR 3h après intoxication	TR 6h après intoxication	TR 12h après intoxication	TR 24h après intoxication
Souris saines	36,5 ± 0,68	36,6 ± 0,20	36,3 ± 0,78	36,0 ± 1,24	36,9 ± 0,87
Témoin fisan	36,9 ± 0,41	34,5 ± 1,13	34,3 ± 1,10	33,3 ± 0,70	32,8 ± 0,50 *
Test (8 mg/kg)	37,1 ± 0,65	36,0 ± 0,55	35,4 ± 0,81	35,7 ± 0,95	35,9 ± 0,42 **
Témoin BM	36,8 ± 0,43	36,9 ± 0,45	37,0 ± 0,36	35,7 ± 0,95	35,9 ± 0,42 **

\*différence significative au seuil de 5 % (p<0,05) avec le groupe de souris saines

\*\*différence non significative au seuil de 5% (P>0,05) avec le groupe de souris saines



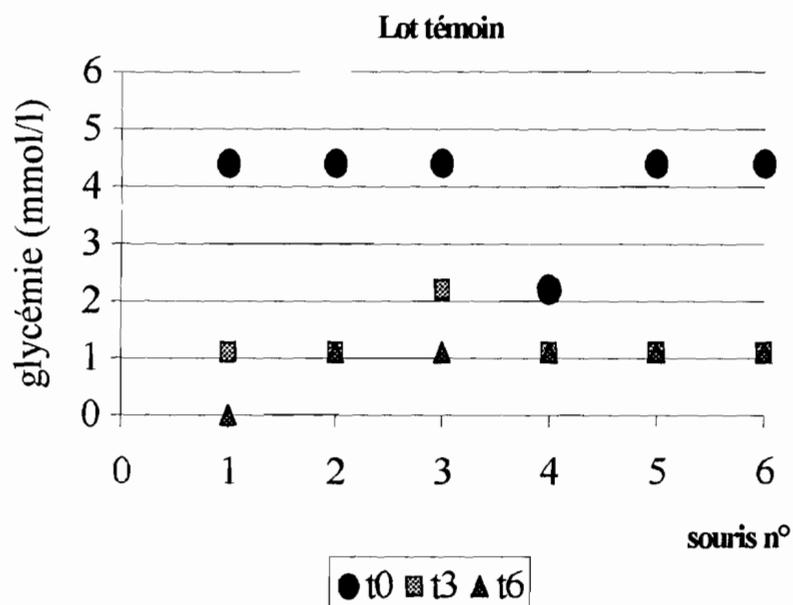
**Figure 11** : variation de la température rectale en fonction du temps : souris traitées par le BM et souris non traitées.

#### 5.2.4 - Effet sur la glycémie.

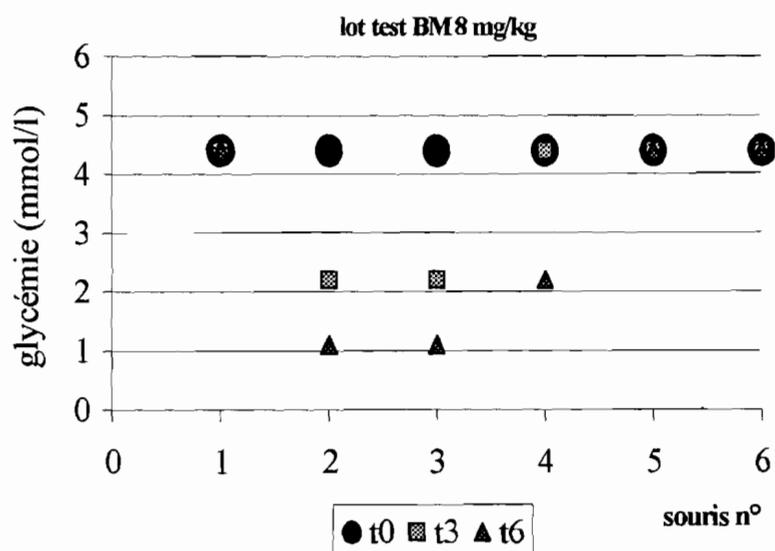
Les valeurs de la glycémie se situent entre 2 et 6 mmol.l<sup>-1</sup> pour le groupe des souris saines.

Dans le groupe témoin, l'administration de l'extrait de fisane provoque une forte diminution de la glycémie au bout de la 3<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> heure : les valeurs de la glycémie sont inférieures à 2 mmol.l<sup>-1</sup> pour la plupart des souris dans ce lot à la 6<sup>ème</sup> heure (Figure 12).

Dans le groupe traité par le BM par contre, la glycémie se situe dans les valeurs normales pour la plupart des sujets à la 6<sup>ème</sup> heure. Elle baisse légèrement pour 2 souris dans ce lot. La glycémie n'a subi aucune variation pour la moitié des animaux (3 souris) dans le lot (Figure 13).



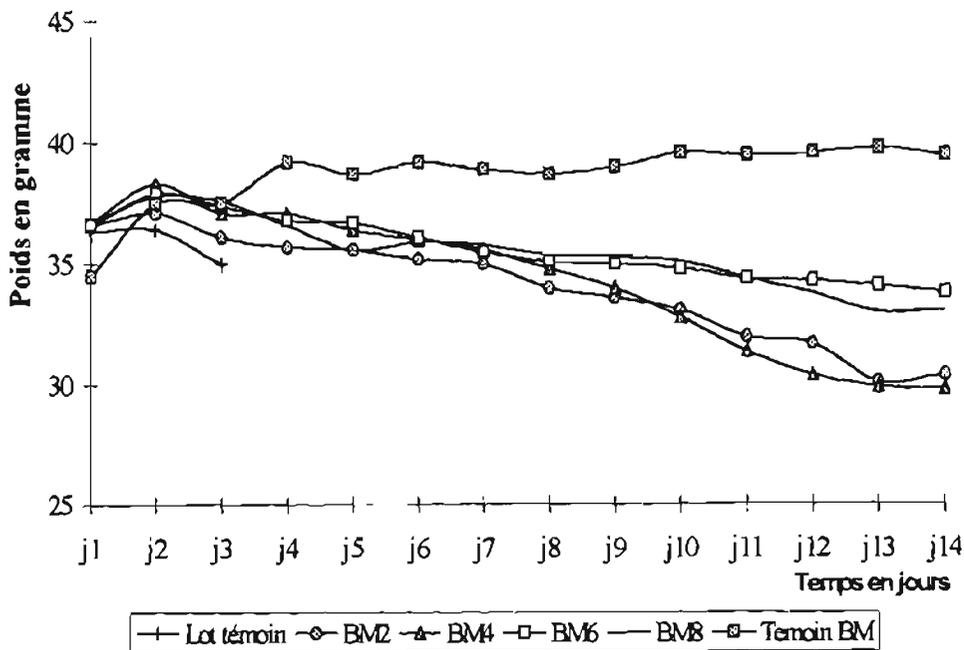
**Figure 12** : Variations de la glycémie dans le lot témoin à t0, t3 et t6.



**Figure 13** : Variations de la glycémie dans le lot test (BM 8 mg.kg<sup>-1</sup>) à t0, t3 et t6.

**5.2.5 - Effets sur le poids des animaux**

Le poids moyen des animaux en début d'expérimentation est de  $35 \pm 5g$ . L'administration de l'extrait de fisan provoque une baisse de poids chez les souris dans tous les groupes d'essai. Cette baisse de poids semble cependant plus marquée pour les lots ayant reçus les plus faibles doses de BM ( $2 \text{ mg.kg}^{-1}$  et  $4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). On observe un poids moyen de 30g approximativement au bout de la période de surveillance pour les animaux survivants. Ce qui correspond à une perte de poids de 15% environ par rapport au poids initial. La mortalité totale des individus dans le lot non-traité au bout de 72 heures ne permet pas de suivre l'évolution des poids. Le lot témoin BM ne présente aucune caractéristique particulière (Figure 14).



**Figure 14** : Evolution du poids des souris par lot durant la période de surveillance (J<sub>1</sub> à J<sub>14</sub>) chez les souris survivantes.

### 5.3 - DELAI D'INTERVENTION

La mortalité cumulée 72 heures après traitement varie en fonction du délai d'administration du BM : Plus le délai est court, plus la mortalité est faible. Lorsqu'on administre le BM 30 minutes à 2 heures après l'administration du toxique, la mortalité des animaux est très faible, voire nulle au bout de 72 heures. A partir d'un délai de 3 heures, on observe une plus forte mortalité (Tableau XIII).

Parallèlement, le temps total de survie des souris est assez élevé pour les plus faibles délais de traitement. Il diminue brutalement (presque de moitié), à partir d'un délai de 3 heures (Figure 15).

Tableau XII : Mortalité cumulée à J<sub>3</sub> et J<sub>14</sub> en fonction du délai d'administration du BM

Délais d'administration du BM	Mortalité à J <sub>3</sub>	Mortalité à J <sub>14</sub>
30 mn	0	0
1 h	0	0
2 h	1	2
3 h	3	4
4 h	3	4
6 h	4	6

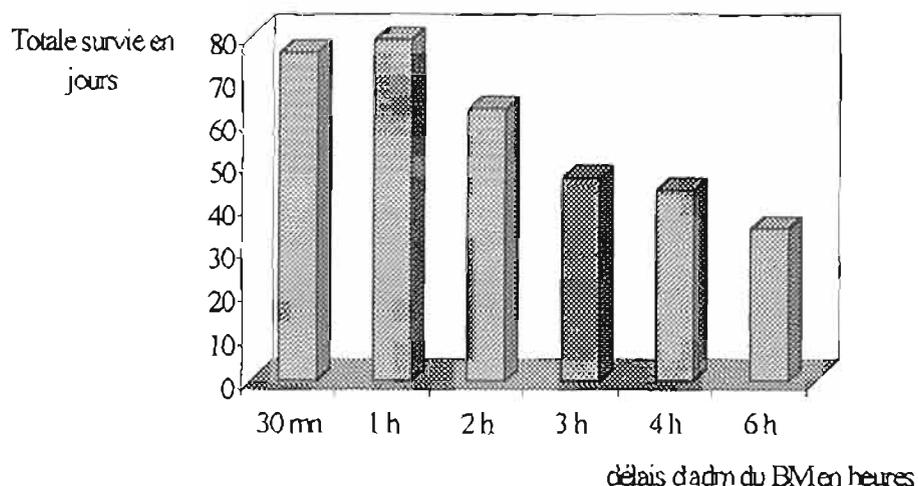


Figure 15 : Temps de survie des souris par lot (selon le délai d'administration du BM).

5.4 - INTERET DE L'ADMINISTRATION PRECOCE DE GLUCOSE .

La réduction de mortalité est plus importante dans le lot « BM + Glucose » par rapport au lot « BM seul ». Sur un échantillon initial de 25 souris par groupe d'essai, on observe une mortalité  $J_3$  de 3/25 pour le lot « BM + Glucose », et de 9/25 pour le lot « BM seul ». La mortalité  $J_{14}$  pour le groupe « BM + Glucose » est également très nettement inférieure à celle du groupe « BM seul ».

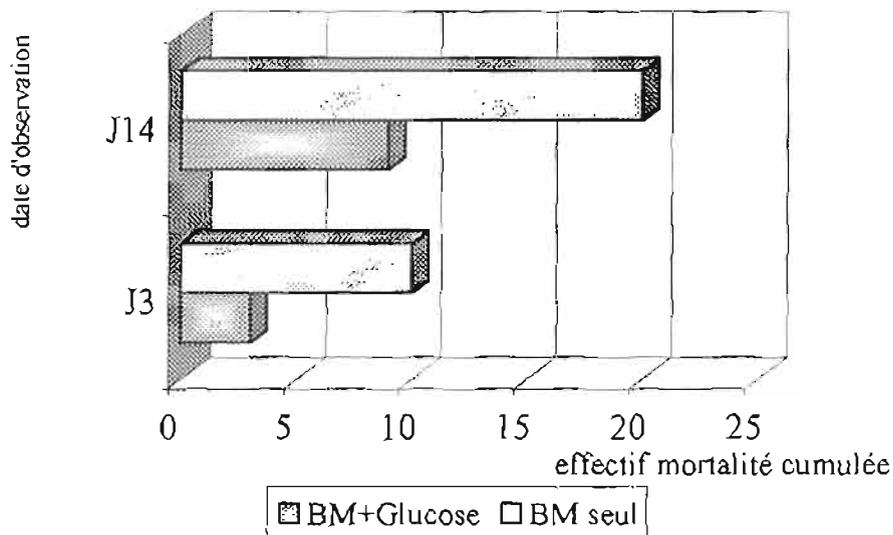


Figure 16 : Effectif mortalité cumulée à  $J_3$  et  $J_{14}$  en fonction du traitement : BM + Glucose ou BM seul.

## DISCUSSIONS

## **VI - DISCUSSIONS**

### **6.1 - LE MATERIEL ET LA METHODE.**

#### **6.1.1 - Le modèle animal.**

Nous avons utilisé dans nos expérimentations, des souris de souche NMRI. Ce sont des souris de type albinos généralement utilisées comme animal d'expérimentation dans diverses disciplines biomédicales, en particulier en pharmacologie et en toxicologie. C'est une souche qui présente des variations génétiques minimales ainsi qu'une faible variabilité dans les réactions biologiques.

Cependant, les prélèvements de sang pour examens biologiques sont d'application difficile avec ce type de modèle animal lorsqu'on utilise des méthodes macro-analytiques. La technique habituellement utilisée est la ponction cardiaque sur souris anesthésiée [19, 14]. Cette technique n'est cependant pas adaptée lors d'expériences chroniques. Pour ce type d'expériences, les échantillonnages à répétition imposent l'utilisation de très petites quantités de sang et donc l'emploi de méthodes micro-analytiques.

#### **6.1.2 - Les méthodes d'étude.**

Les paramètres que nous avons retenus pour cette étude sont les suivants:

- la mortalité cumulée après un délai de 72 heures,
- la glycémie,
- la température,
- l'évolution du poids des animaux au cours de l'expérimentation.

Ces paramètres ont également été utilisés lors de l'étude de l'antagonisme de l'hypoglycine par la glycine [4].

L'hypoglycémie, l'hypothermie et l'excrétion d'acides dicarboxyliques dans les urines sont les manifestations les plus observées dans les cas d'intoxications par le fisanier chez l'homme, en particulier les enfants [45, 69, 65, 26, 46].

Dans les études expérimentales chez les animaux, les troubles métaboliques observés comprennent également l'hypoglycémie sévère, l'hypothermie, l'acidémie isovalérique et une excrétion urinaire importante d'acides dicarboxyliques [4, 26, 20].

Les manifestations biologiques de l'intoxication par le fisanier sont donc en parti similaires chez les animaux d'expérimentation comme chez les enfants.

En plus de l'effet sur la mortalité des souris, la glycémie et l'hypothermie sont des paramètres biologiques qui nous paraissent donc essentiels pour apprécier l'efficacité du BM. L'étude de ces paramètres nécessite des techniques relativement simples à mettre en œuvre.

Cependant, une étude ultrastructurale et biochimique permettrait de mieux apprécier l'efficacité du BM : la mesure des modifications structurales au niveau des hépatocytes (fractions mitochondriales), ainsi que le dosage des métabolites de l'hypoglycine ou des substrats d'acyl-CoA dans le sang et dans les urines constituent de bons paramètres [11, 51,52, 66]. Ces techniques ont été utilisées pour l'étude de l'antagonisme de l'hypoglycine par la glycine [4].

Le dosage des enzymes de la  $\beta$ -oxydation est également utilisée dans diverses expérimentations. On dose en particulier les acyl-CoenzymeA déshydrogénases : palmitoyl-CoenzymeA déshydrogénase, butyryl-CoenzymeA déshydrogénase, isovaleryl-CoA déshydrogénase, malate déshydrogénase [22].

D'autres techniques sont aussi applicables, comme par exemple la mesure de l'activité enzymatique. Elle se fait par le dosage du  $\text{CO}_2$  produit par le cycle de la  $\beta$ -oxydation. On utilise des substrats marqués (acides gras marqués au  $^{14}\text{C}$ ), dont l'oxydation génère du  $^{14}\text{CO}_2$  que l'on dose par des méthodes de scintigraphies [4, 36, 51, 31, 75]. La mise en œuvre de toutes ces techniques nécessite du matériel spécialisé. Les dosages se font le plus souvent par des méthodes HPLC ou de CPG.

Dans notre étude, les contraintes relatives au modèle animal choisi et aux moyens techniques disponibles ont imposé l'utilisation de bandelettes réactives pour le dosage de la glycémie. Cette technique est d'une application simple chez la souris, le prélèvement étant effectué au niveau de l'extrémité de la queue de l'animal. De plus, elle rend possible le suivi chronologique de la glycémie chez la souris. C'est une technique peu précise puisqu'elle ne permet pas d'avoir une valeur chiffrée exacte de la glycémie. Cependant l'essentiel dans cette étude était de noter l'apparition d'une hypoglycémie, puis d'apprécier le caractère sévère ou modéré de celle-ci. Ce qui est réalisable avec les bandelettes.

La voie intra-péritonéale a été choisie comme voie de traitement par le BM en raison de sa facilité d'accès chez les rongeurs. Elle permet une inoculation rapide et quantifiable. Les substances introduites dans la cavité péritonéale sont rapidement absorbées dans la circulation [14].

## **6.2 - LES RESULTATS**

### **6.2.1 - Toxicité aiguë de l'extrait d'arilles du fisanier chez la souris**

La pathogénie de l'intoxication aiguë expérimentale par le fisanier chez la souris semble liée à la dose d'extrait administrée. Une forte dose non seulement provoque une plus forte morbidité et une plus grande mortalité, mais elle diminue également le temps de survie et provoque plus rapidement l'apparition des signes d'intoxication qui sont généralement plus intenses que chez les animaux ne recevant qu'une plus faible dose.

La  $DL_{50}$  de l'extrait de fisan est estimée selon la méthode de régression logarithmique à  $2,10 \text{ g.kg}^{-1}$ . Cette valeur semble assez élevée. Elle est cependant compatible à une étude antérieure réalisée en Côte D'ivoire [20]. En effet, la dose minimale toxique (DMT) d'un lyophilisat d'extrait de fisan déterminée chez la souris y était évaluée à  $1,87 \text{ g.kg}^{-1}$ , soit environ 81g d'arilles frais. Ce qui correspond à un peu plus de cinq arilles, un arille pesant environ 15 gramme [20].

Dans l'échelle de toxicité de Gosselin Smith et Hodge, de telles valeurs correspondent à l'indice de toxicité 3 (substances modérément toxiques). Rapporté à l'homme, l'ingestion de ces quantités est peu probable. C'est pourquoi certains auteurs ont attribué les intoxications à une sensibilité plus grande de l'organisme humain à l'hypoglycine A [20].

Si la consommation des arilles de fruits immatures relève le plus souvent de cas d'accidents (surtout chez les enfants), la consommation des arilles de fruits mûrs par contre est largement répandue dans certaines régions. Ces arilles mûrs sont réputés non toxiques (en administration unique) parce que contenant de très faibles quantités d'hypoglycine A [13].

Cependant, l'effet de l'ingestion répétée (consommation régulière sous forme de repas) n'est pas clairement établi. S'il est vrai que les fruits mûrs contiennent des doses très faibles d'hypoglycine A (<1,2 ppm) [8, 9], il reste impossible d'affirmer que leur consommation régulière ne peut pas entraîner un effet cumulatif et provoquer à la longue des intoxications mortelles. La dose journalière admissible d'hypoglycine (DJA) est actuellement inconnue.

La survenue d'un cas d'intoxication chronique décrit par Larson *et al* constitue une preuve que l'intoxication chronique est possible [40].

La responsabilité des arilles mûrs ne doit donc pas être négliger et mérite une plus grande investigation.

### **6.2.2 - Efficacité du BM sur l'intoxication aiguë expérimentale chez la souris**

Les résultats de nos expérimentations sur la souris montrent que le traitement par le BM permet de réduire la mortalité due à l'administration d'une dose toxique d'extrait de fisan. Cependant les doses de BM nécessaires pour obtenir une réduction de mortalité significative sont assez élevées (8 mg.kg<sup>-1</sup> au moins), et le traitement doit être effectué dans un délai assez court pour être efficace. Après un délai de 3 heures, on observe une faible action.

Ces observations indiquent que l'absorption de l'hypoglycine à travers la muqueuse intestinale est très rapide et que les troubles métaboliques induits apparaissent également assez vite. Ce qui confirme que l'intoxication aiguë par le fisan est une urgence et que l'intervention doit être très rapide. Dans les cas d'intoxication chez les enfants, la mort survient en moyenne 24 à 48 heures après l'intoxication [46].

Trois administrations de BM à intervalle de 6 heures ont été nécessaires pour obtenir ces résultats. La demi-vie du BM étant d'environ 5 heures, il est essentiel de maintenir une concentration plasmatique suffisante par une administration répétée. Dans le cas de l'intoxication à l'ifosfamide, ce sont souvent des perfusions de BM qui sont effectuées [15]. Il est donc probable qu'une administration répétée soit nécessaire si le BM est efficace pour traité l'intoxication au fisan chez l'homme.

La dose minimale de  $8\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  nécessaire pour obtenir des résultats significatifs chez la souris paraît élevée. Une telle dose n'est en effet pas applicable chez l'homme. Cependant la dose de toxique nécessaire pour provoquer l'effet toxique chez la souris est également élevée ( $2,5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Sans pouvoir chiffrer la quantité exacte de fisanier responsable des intoxications chez les enfants, il est certain qu'elle est largement inférieure à la dose toxique observée chez la souris. Rapporté à l'échelle des enfants, la consommation de telles quantités de fisanier est en effet très peu probable.

Si l'on suppose qu'il existe une corrélation entre la dose de toxique et la dose efficace de BM on peut estimer que la dose efficace dans les cas d'intoxication chez les enfants serait largement inférieure à celle observée chez la souris, et située dans la limite des doses tolérables par l'organisme humain, c'est à dire  $1,5$  à  $2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

L'administration du BM semble également réduire l'hypothermie induite par l'extrait de fisan. La baisse de la température est nettement plus faible dans le groupe de souris traitées par le BM, avec même une tendance à la normalisation au bout de 24 heures. Dans ce groupe, la différence entre la TR avant intoxication et celle au bout de 24 heures n'est pas significative au seuil de 5% ( $p>0,05$ ). La TR dans ce lot n'est pas différente de celle du lot de souris témoins. On note par contre une différence significative avec le lot qui n'a pas reçu de traitement.

La mesure de la température constitue ainsi non seulement un élément diagnostic important, mais peut permettre également de suivre l'évolution de l'état des malades dans les cas d'intoxication aiguë par le fisan.

L'administration du BM semble également réduire l'hyoglycémie. Sans pouvoir déterminer si la différence est significative ou non dans notre étude, il est cependant clair que le groupe de souris traité par le BM présente des glycémies qui se situent dans la fourchette des valeurs normales contrairement au groupe de souris non traitées.

L'administration de BM aux souris intoxiquées semble donc apporter une correction des troubles métaboliques provoqués par l'extrait de fisan (en particulier l'hypothermie et l'hypoglycémie) lorsqu'elle est faite dans un délai relativement court.

Nous avons pu également remarquer que le poids des animaux survivants diminue progressivement après l'intoxication. On observe une perte d'environ 15% du poids initial au bout de 14 jours de surveillance (J<sub>14</sub>). Cette baisse de poids paraît plus importante dans les groupes de souris traitées par les plus faibles doses de BM. La différence de poids à J<sub>14</sub> n'est cependant pas significative avec les groupes de souris recevant de fortes doses de BM.

L'amaigrissement progressif pourrait s'expliquer par la présence de lésions chroniques, localisées au niveau hépatique avec comme conséquence une altération des processus de synthèses. Il est connu que l'hypoglycine A provoque chez l'homme, des lésions hépatiques compatibles au syndrome de Reye (stéatoses micro-vésiculaires entourés par des stéatoses macro-vacuolaires). Ce type de lésions induit une altération du métabolisme hépatique [54, 30].

Au-delà de l'effet aigu, l'hypoglycine A est donc très probablement toxique à moyen et long terme même suite à l'ingestion de doses même très faibles.

Cependant, le caractère définitif ou réversible de ces séquelles n'est pas établi. C'est pourquoi une étude anatomo-pathologique est nécessaire à long terme pour préciser l'état du foie.

L'administration de glucose précoce a permis de réduire de façon plus sensible la mortalité des souris intoxiqués. Ceci, même avec un délai d'administration du BM relativement long (6 heures).

Ceci démontre que l'hypoglycémie constitue un facteur de mauvais pronostic et que le maintien de la glycémie à un taux normal est d'un intérêt certain. Cependant, d'autres phénomènes sont probablement impliqués dans le processus morbide, l'administration du glucose ne permettant pas d'annuler l'effectif de la mortalité.

### **6.2.3 - Le mécanisme d'action antidotique du bleu de méthylène**

L'inhibition initiale de l'hypoglycine A concerne les acyl-CoA déshydrogénases: butyryl-CoA déshydrogénases, isovaleryl-CoA déshydrogénases, 2-méthyl-CoA déshydrogénases. Cette inhibition s'effectue au niveau du coenzyme FAD de la molécule enzymatique, et c'est le MCPA-CoA (principal métabolite de

l'hypoglycine) qui en est responsable. Ceci conduit à l'accumulation de substrats enzymatiques dans la matrice mitochondriale.

Le blocage de la  $\beta$ -oxydation résultant de cette inhibition enzymatique provoque une accélération du catabolisme des glucides ainsi qu'une inhibition de la néoglycogénèse. Ce qui conduit à une hypoglycémie sévère. Le déficit énergétique qui en résulte conduit à divers troubles métaboliques qui à terme vont entraîner la mort dans un délai assez court (24 à 48 heures) [46].

Les mécanismes intimes de l'inhibition du coenzyme FAD des acyl-CoA déshydrogénases ne sont pas encore totalement connus. Deux hypothèses de mécanisme toxique ont été proposées :

- La première hypothèse consiste en une  $\alpha$ -déprotonation, suivie d'une rupture de liaison. Le carbanion conjugué, qui en résulte se fixe de façon covalente au coenzyme FAD, inactivant de ce fait l'enzyme.
- La seconde hypothèse consiste à une oxydation à un électron.

Ces deux mécanismes conduisent tous à une modification covalente du coenzyme FAD au niveau du site actif des acyl-CoA déshydrogénases. Cette modification constitue le principal processus de l'inactivation enzymatique.

L'action directe du BM sur l'hypoglycine A n'est pas connue. Il a été cependant démontré que le bleu de méthylène stimule de façon sensible la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans la mitochondrie [75]. Dans son état oxydé, le BM présente une affinité pour la mitochondrie, en raison du caractère cationique de la molécule. Il va s'accumuler dans la membrane mitochondriale. Cette accumulation va provoquer une altération de la perméabilité membranaire, favorisant ainsi le passage des acides gras, sans intervention du système de la carnitine. Ceci permet une augmentation du pool intramitochondrial d'acides gras, substrat nécessaire aux réactions de la  $\beta$ -oxydation.

Ces observations indiquent que théoriquement, le BM pourrait compenser l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation des acides gras par l'hypoglycine [75]. Les résultats de nos expérimentations semblent confirmer cette hypothèse.

D'autres mécanismes d'action sont également envisageables. Le BM est couramment utilisé en thérapeutique pour traiter les méthémoglobinémies toxiques résultant des intoxications par les produits oxydants. Il agit

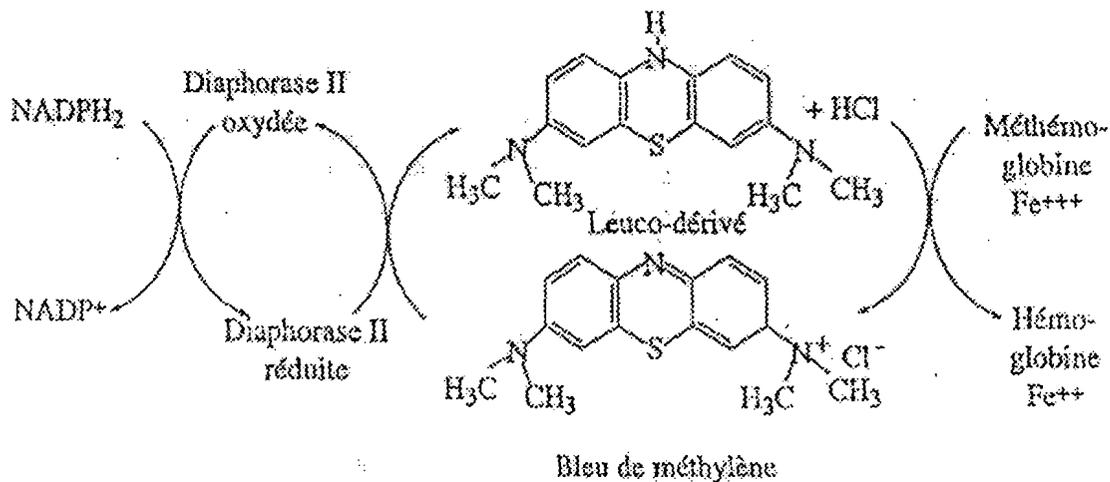
habituellement par un mécanisme d'oxydo-réduction par échange d'un électron. La méthémoglobine est réduite en hémoglobine tandis que le BM est oxydé en un leuco-dérivé. La régénération du BM dans son état réduit fait alors intervenir le système NADP/NADPH, par action de la NADPH réductase encore appelée Diaphorase II (Figure 17).

Un tel mécanisme d'action pourrait-il être envisager dans le cas de l'intoxication par l'hypoglycine ? En d'autres termes, le BM peut-il intervenir comme cofacteur dans la réaction de déshydrogénation des acyl-CoA (1<sup>ère</sup> étape du cycle de Lynen)?

Les données de la littérature à notre disposition ne nous permettent pas de discuter sur la question.

Toutefois, la configuration moléculaire du BM laisse entrevoir la possibilité d'une telle réaction. Le BM pourrait alors intervenir comme coenzyme, dans cette réaction d'oxydoréduction catalysée par l'acyl-CoA déshydrogénase, en substitution au coenzyme FAD inactivé par l'hypoglycine ; l'intervention du FAD dans la réaction de déshydrogénation se faisant également par une réaction d'oxydoréduction.

Des études plus approfondies permettraient de comprendre l'action spécifique du BM sur chacune des quatre étapes principales de la  $\beta$ -oxydation.



**Figure 17:** Mécanisme d'action du bleu de méthylène dans le traitement des méthémoglobinémies toxiques

Les troubles métaboliques observés lors de l'intoxication par l'hypoglycine sont en parti dus au déficit énergétique secondaire à l'inhibition de l'oxydation des acides gras. La réactivation de cette  $\beta$ -oxydation par le BM permet une régénération du capital énergétique. Ce qui pourrait expliquer la correction des troubles métaboliques observés.

Il est cependant utile de préciser que le BM est souvent toxique à des doses supérieures à  $7-8 \text{ mg.kg}^{-1}$  chez l'humain. Il est en effet responsable de méthémoglobinémie, surtout en présence d'un déficit enzymatique en Glucose-6-Phosphate déshydrogénase ( $G_6PD$ ) [44]. Il s'agit d'une anomalie congénitale récessive responsable d'une anémie hémolytique. Dans la variante  $GdA^-$  (variante négroïde) l'activité enzymatique est de l'ordre de 10 à 20%. Il n'y a pas d'hémolyse chronique, mais plutôt des crises d'hémolyse aiguë souvent déclenchées par la prise d'agents oxydants dont le BM.

Le traitement par le BM devrait donc se faire en surveillant la survenue éventuelle d'hémolyse.

Les doses de BM utilisés dans le traitement des méthémoglobinémies toxique et aussi dans l'intoxication à l'ifosfamide sont de l'ordre de  $1,5$  à  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$ . A ces doses, le BM est bien tolérée et ne présente pas d'effets adverses [79, 38].

Jusque là, aucune référence ne fait allusion à l'utilisation des autres molécules proposées pour traiter les cas d'intoxication chez l'homme. La glycine a permis de réduire la mortalité, l'hypoglycémie et l'hypothermie dans l'intoxication expérimentale chez le rat [4]. Le clofibrate a été également efficace en traitement préventif [74]. Ces molécules n'ont probablement pas été efficaces pour traiter les cas d'intoxication chez l'homme. Ce qui pourrait expliquer l'absence de référence à ce sujet.

Le BM pourrait être utilisée comme antidote. Mais il est nécessaire de mener une étude expérimentale avec un échantillon de plus grande taille, en utilisant des techniques d'étude encore plus précises (dosages des métabolites dans le sang et les urines, évaluation de l'activité enzymatique, études hépatohistopathologiques...). Une étude de phase II chez les enfants intoxiqués permettrait de confirmer son efficacité et de préciser un protocole de traitement.

## VII - CONCLUSION

L'intoxication par les fruits immatures du fisanier est une pathologie d'autant plus grave qu'il n'existe pas encore de traitement antidotique. De nombreux enfants en sont victimes, non seulement au Burkina Faso mais aussi dans les pays de la sous région Ouest-africaine. Si les campagnes d'information sont nécessaires pour réduire le risque d'accident dans les régions concernées par le problème, la recherche d'un antidotique est indispensable pour permettre une prise en charge thérapeutique adéquate des cas, afin d'éliminer le risque vital.

L'étude expérimentale effectuée chez la souris montre que le BM peut être efficace pour réduire la létalité de l'intoxication aiguë par le fisan.

L'administration de fortes doses de BM a permis de réduire la mortalité et dans une certaine mesure, l'hypothermie et l'hypoglycémie chez les animaux intoxiqués par une dose mortelle d'extrait de fisan. La  $DE_{50}$  du BM est de  $3,1\text{mg.kg}^{-1}$ . L'efficacité du BM est cependant réduite lorsque le délai d'administration est supérieur à 3 heures. L'administration de glucose précoce a également été très bénéfique. Elle permet en effet de réduire plus sensiblement la mortalité, même lorsque le délai d'administration du BM est retardé.

Le bleu de méthylène est relativement peu coûteux et bien toléré chez l'homme à des doses de 1 à  $2\text{mg.kg}^{-1}$ . Il est couramment utilisé en toxicologie pour traiter les méthémoglobinémies toxiques. Il est également utilisé dans le traitement de l'encéphalopathie à l'ifosfamide, pathologie dont les mécanismes physiopathologiques et les manifestations sont semblables à celles de l'intoxication par le fisan.

Si l'extrapolation des résultats obtenus chez la souris à l'homme reste pratiquement impossible, on peut cependant suggérer que le BM puisse être bénéfique pour traiter les cas d'intoxication par le fisan chez les enfants. En association bien sûr avec un traitement symptomatique approprié. Les résultats obtenus chez la souris constituent une base expérimentale à cette hypothèse.

Une étude expérimentale sur un échantillon de plus grande taille ainsi qu'un essai clinique de phase II pourrait permettre de confirmer l'activité du Bleu de méthylène.

En pays Lobi, les tradipraticiens utilisent une décoction de néré (*Parkia biglobosa*) dans le traitement des cas d'intoxication par le fisan clairement établis. Une étude expérimentale pourrait également être effectuée, qui permettrait d'en préciser l'efficacité. Il existe donc de bonnes perspectives mais il conviendrait de les explorer efficacement, afin de pouvoir trouver l'antidote de choix pour cette intoxication.

## RECOMMANDATIONS

### Aux autorités sanitaires

- Mener des campagnes d'informations de la population sur les dangers encourus par la consommation du fisanier.
- Sensibiliser et former le personnel de santé sur l'intoxication aiguë par les fruits non mûrs du fisan et sa prise en charge médicale.

### Aux équipes de chercheurs

- Etudier les risques liés à la consommation régulière sous forme de repas des fruits mûrs du fisan qui sont réputés non toxiques en raison de la faible dose d'hypoglycine (toxicité chronique).
- Mettre en œuvre une étude de phase II avec le BM à la dose de 1 à 2 mg.kg<sup>-1</sup> dans les cas d'intoxications aiguës chez l'enfant.
- Etudier l'efficacité des décoctions de néré (*Parkia biglobosa*) qui, utilisé par les tradipraticiens semble donner des résultats intéressants.

**BIBLIOGRAPHIE**

1. Addae J I, Melville G N. A re-examination of the mechanism of ackee-induced vomiting sickness. *West Indian Med J*. 1988;37(1):6-8.
2. Aeschlimann C, Schefer H, Cerny T. Inhibition of (mono)amine oxidase and prevention of ifosfamide encephalopathy by methylene blue. *Drug Metabolism and Disposition*. 1996;12:1336-1339.
3. Aeschlimann C, Küpfer A, Schefer H, Cerny T. Comparative pharmacokinetics of oral and intravenous ifosfamide/mesna/methylene blue therapy. *Drug Metabolism and Disposition*. 1998;26:883-90.
4. Al-Bassam S S, Sherrat H S A. The antagonism of the toxicity of hypoglycin by glycine. *Biochem. pharmacol*. 1981; 30(20): 2817-2824.
5. Anger F, Anger J, Guillon L P, Sado A, Papillon A. Toxicités orales subaiguës et subchroniques chez le rat. *Journal de toxicologie clinique et expérimentale*. 1991; 11:421-436.
6. Anonymous. Toxic hypoglycaemic syndrome-Jamaica, 1989-1991. *Morbid and Mortal Weekly Report*. 1992;41(4):53-55.
7. Bressler R. The unripe ackee - forbidden fruit. *New-England-Journal of Medicine*. 1976;295(9):500-501.
8. Brown M, Bates R P, McGowan C, Cornell J A. Influence of fruit maturity on the hypoglycin A level in Ackee (*Blighia sapida*). *Journal of food safety*. 1992;12(2):167-177.
9. Brown M. Hypoglycin A: Levels in maturing fruit of Ackee tree(*Blighia sapida*) and efforts towards its minimization in the canned product. University of florida; 1989.
10. Brun T. Pesticide toxicity or hypoglycin poisoning (Ivory Coast 1984)?. *Lancet*. 1988;i:934.
11. Chase G W Jr, Landen W O Jr, Soliman A M. Liquid chromatographic resolution of hypoglycin A from leucine. *Journal of Chromatography*. 1988;456(2):431-4.
12. Chase G W Jr, Landen W O Jr, Gelbaum L T, Soliman A G. Ion-exchange chromatographic determination of hypoglycin A in canned ackee fruit. *J Assoc Off Anal Chem*. 1989;72(2):374-7.

13. Chase G W Jr, Landen W O Jr, Soliman A G. Hypoglycin A content in the aril, seeds, and husks of ackee fruit at various stages of ripeness. *J Assoc Off Anal Chem.* 1990;73:318-319
14. CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX. 1980. Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation, Vol. I, CCPA, Ottawa, Ont.
15. Dautel D, Eichler F, Koffel J. Recherche d'un protocole de traitement des encéphalopathies à ifosfamide par le bleu de méthylène. *Journal de pharmacie clinique.* 1999;1(1):25-27.
16. Descotes E J. La DL50 en 1984. *Lyon pharmaceutique.* 1985;36(4):189-191.
17. Entman M, Bressler R. The mechanism of action of hypoglycin on long-chain fatty acid oxidation. *Mol pharmacol.* 1967;3:333-340.
18. Ferrero J, Eftekari P, Largillier R, Dreyfus G, Namer M. Traitement d'une encéphalopathie à l'ifosfamide par le bleu de méthylène. *Bull. cancer (Paris).* 1995;82:598-599.
19. Foster H L, Small J D, Fox J G. (eds.). 1983. The Mouse in Biomedical Research, Vol. III, Normative Biology, Immunology and Husbandry. Academic Press, New York, NY.
20. Fougbe S, Naho Y, Declume C. Experimental study of the toxicity of arils from *Blighia sapida* (Sapindaceae) in relation to the poisoning of children of Katiola (Ivory Coast). *Ann Pharm Fr.* 1986;44(6):509-15.
21. Garg H, Mitra C. *Blighia sapida*. Constituents of the fresh fruit. *Planta Med.* 1967;15(1):74-80.
22. Ghisla S, Melde K, Zeller H D, Boschert W. Mechanisms of enzyme inhibition by hypoglycin, methylenecyclopropylglycine and their metabolites. *Prog Clin Biol Res.* 1990;321:185-92.
23. Ghulam S, Herbert G B. Reversed phase liquid chromatographic determination of hypoglycin A (HG-A) in canned ackee fruit samples. *Journal of AOAC international.* 1994;77(5):1175-1179.
24. Glasgow A, Chase H. Production of features of Reye's syndrome in rats with 4-pentenoic acid. *Pediatr. Res.* 1975;9(3):133-138.
25. Golden K, Kean E. The biogenesis of dicarboxylic acids in rats given hypoglycin. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1984;794(1):83-88.

26. Golden K, Kean E. Jamaïcan vomiting sickness: a study of two adult cases. *Clin. Chim. Acta.* 1984;142(3):293-298.
27. Goodman S, Valle D. defective imino acid metabolism in hypoglycin-treated rats. *Biochemical medicine.* 1984;31(1):97-103.
28. Guevart E, Lawson-Body-Houkportie A, Tchedre G, Les Soeurs Augustines. Toxicité du fruit de l'ackee: un danger à connaître. *Afrique médicale.* 1990;29:116-118.
29. Hassall C, Reyle K. Hypoglycin A and B, two biologically active polypeptides from *Blighia sapida*. *Biochem.* 1955;60:334-338.
30. Hautekeete M L, Degott C, Benhamou J P. Micro vesicular steatosis of the liver. *Acta Clin.Belgica.* 1990;45(5):311-326.
31. Hue L, Sherratt H S A. Inhibition of gluconeogenesis by hypoglycin in the rat. Evidence for inhibition of glucose-6-phosphate in vivo. *Biochem J.* 1986;240:765-769.
32. Ikeda Y, Tanaka K. Selective inactivation of various acyl-CoA dehydrogenases by (methylenecyclopropyl) acetyl-CoA. *Biochem Biophys Acta.* 1990;1038:216-21.
33. Kean E A. Improved method for isolation of hypoglycine A and B from fruit of *Blighia sapida*. *J Pharm Pharmacol.* 1974;26(8):639-40.
34. Kean E A. Selective inhibition of acyl-CoA dehydrogenases by a metabolite of hypoglycin. *Biochem Biophys Acta.* 1976;422:8-14.
35. Kean E A. Commentary on a review on the mechanism of ackee-induced vomiting sickness. *West Indian Med J.* 1988;37(3):139-42.
36. Kler R S, Sherratt H SA, Turnbull D M. The measurement of mitochondrial beta-oxidation by release of  $^3\text{H}_2\text{O}$  from [9,10- $^3\text{H}$ ]hexadecanoate: application to skeletal muscle and the use of inhibitors as models of metabolic disease. *Biochem Med Metad Biol,.* 1992;47(2):145-56.
37. Küpfer A, Aeschliman C, Wermut B, Cerny T. Prophylaxis and reversal of ifosfamide encephalopathy and methylene-blue. *Lancet.* 1994;343:763-64.
38. Küpfer A, Aeschliman C, Cerny T. Methylene blue and the neurotoxic mechanisms of ifosfamide encephalopathy. *Eur J Clin Pharmacol.* 1996;50:249-252.

39. Küpfer A, Jeffrey R I. Methylene blue and fatal encephalopathy from ackee poisoning[letter commentary]. *Lancet*. 1999;354(9164):1622-1623.
40. Larson J, Vender R, Camuto P. Cholestatic jaundice due to ackee fruit poisoning. *American Journal of Gastroenterology*. 1994;89(9):1577-8.
41. Lichtfield C J T, Wilcoxon F A. A simplified method of evaluation of doses effects experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1949;95:99-113.
42. Lieu Y K, Hsu B Y, Price W A, Corkey B E, Stanley C A. Carnitine effects on coenzyme A profiles in rat liver with hypoglycin inhibition of multiple dehydrogenises. *Am J Physiol*. 1997;272(3):359-66.
43. Marley J, Sherratt H S A. The apparent failure of L-carnitine to prevent the hypoglycaemia and hypothermia caused by hypoglycin or by pent-4-enoic acid in mice. *Biochem Pharmacol*. 1973;22:281-284.
44. Marrs T, Bright J, Inns R. Met haemoglobin production and reduction by methylene blue and the interaction of methylene blue with sodium nitrile in vivo. *Human toxicology*. 1989;8:359-364.
45. McIntoch R, Andrews J. *Blighia sapida*. Toxic effects on renal morphology and function in rat. *N Y State Med*. 1971;71(13):1639-43.
46. Meda H A, Diallo B, Buchet J-P, et al. Epidemic of fatal encephalopathy in preschool children in Burkina Faso and consumption of unripe ackee (*Blighia sapida*) fruit. *Lancet*. 1999;353:536-40.
47. Melville G N, Addae J L. Effects of ackee fruit extracts on bronchomotor tone in rats. *West Indian Med J*. 1988;37(2):97-9.
48. Miller B C, Tainter M T. Estimation of LD50 and its error by log. probit graph paper. *Proc. Soc. Biol. Exp. Med*. 1944;57:261-264.
49. Mills J, Melville G N, Bennett C, West M, Castro A. Effect of hypoglycin A on insulin release. *Biochem Pharmacol*. 1987;36(4):495-7.
50. Ming-tain L, Eugene O, Younan S, Hung-wen L. Synthesis of enantiomerically pure [(methylenecyclopropyl)Acetyl]-CoA: the causative agent of Jamaican Vomiting Sickness. *Journal of American chemical Society*. 1992;57:2471-2476.
51. Ming-tain L, Eugene O, Hung-wen L. Studies of inactivation of general Acyl-CoA dehydrogenase by (1R) and (1S)-(Methylenecyclopropyl) acetyl-CoA. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*. 1992;2(11):1423-1426.

52. Ming-tain L, Ding L, Eugene O, Hung-wen L. Inactivation of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase by a metabolite of hypoglycine: characterization of major turnover product and evidence suggesting an alternative flavin modification pathway. *Journal of American Chemical Society*. 1993;115(5):1619-1628.
53. Morton J, Julia F F. Ackee. *Fruits of warm climates*. Miami; 1987:269-271.
54. Mowat A P. Reye Syndrome. Aetiological considerations, diagnosis and treatment. *Ann. Nestlé*. 1987;45:24-33.
55. Natalini B, Capodiffero V, Espinal R. Isolation of pure (2S,1'S,2'S)-2-(2'-carboxycyclopropyl)glycine from *Blighia sapida* (Ackee). *J Chromatogr A*. 2000;873(2):283-286.
56. Perrot E. Recherches sur le *Blighia sapida* König. *Bull Museum Paris*. 1901;3:131-8.
57. Persaid T Hypoglycin A and foetal development in rabbits. *West Indian Med*. 1968;17:52-56.
58. Pfaffendorf M, Bruning T A, Batink H, Van Zwieten P. The interaction between methylene blue and the cholinergic system. *British Journal of Pharmacology*. 1997;122(1):95-98.
59. Quere M, Ogunssangni A, Bokassa A, Perro A, Van Damme W. Methylene blue and the fatal encephalopathy from Ackee fruit poisoning[letter comment]. *Lancet*. 1999;343(9164):1623.
60. Rebouche C J, Paulson D J. Carnitine metabolism and functions in humans. *Ann. Rev. Nutr*. 1986;6:41-66.
61. Savonnet G. L'arbre, le fruit et le petit berger du Lobi. *cah. ORSTOM, Ser. Sci. Hum*. 1987;17:227-234.
62. Schulz H. Inhibitors of fatty acid oxidation. *Life Sci*. 1987;40(15):1443-9.
63. Sherratt H S A, Al-Bassam S S. Glycine in ackee poisoning. *Lancet*. 1976;ii:12-13.
64. Sherratt H S A. Acyl-CoA esters of xenobiotic carboxylic acid as biochemically active intermediates. *Biochem Soc Trans*. 1985;13(5):856-8.
65. Shih V E, Tanaka K. Plasma and urine amino acid changes in rats treated with hypoglycin. *Clin Chim. Acta*. 1978;88:539-543.

66. Shimizu N, Yamaguchi S, Orii T. A study of urinary metabolites in patients with dicarboxylic aciduria for differential diagnosis. *Acta Paediatr. Jpn.* 1994;36:139-145.
67. Bieber L L. Carnitine. *Ann. rev. Biochem.* 1988;57:261-283.
68. Singh P, Gardner M, Poddar S, Choo-Kang E, Coard K, Rickards E. Toxic effects of ackee oil (*Blighia sapida*) following subacute administration to rats. *West Indian Med J.* 1992;41(1):23-6.
69. Tanaka K, Kean E A, Johnson B. Jamaican vomiting sickness. Biochemical investigation of two cases. *N. Engl. J. Med.* 1976;295:461-467.
70. Tanaka K. Inhibition of gluconeogenesis by hypoglycin: alternate interpretations. *Hepatology.* 1987;7(6):1377-9.
71. Tanaka K, Ikeda Y. Hypoglycin and Jamaican vomiting sickness. *Prog Clin Biol Res.* 1990;321:167-84.
72. Taoka S, Padmakumar R, Lai M, Liu H, Banerjee R. Inhibition of human methylmalony-CoA mutase by various CoA esters. *J. Biol. Chem.* 1994;269(50):31630-4.
73. Van H F, Hue L, Vameq J, Sherratt H S A. Protection of rats by clofibrate against the hypoglycaemic and toxic effects of hypoglycin and pent-4-enoate. An ultra structural and biochemical study. *Biochem J.* 1985;229(2):387-97.
74. Veitch R K, Sherratt H S A, Bartlett K. Organic aciduria in rats made resistant to hypoglycin toxicity by pre-treatment with clofibrate. *Biochem J.* 1987;246(3):775-8.
75. Visarius T W, Stuchi J W, Lauterburg B H. Inhibition and stimulation of long-chain fatty acid oxidation by chloroacetaldehyde and methylene blue in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2000;289:820-824.
76. Von Holt C., Von Holt M. Bohm H. Metabolites effects of hypoglycin and methylenecyclopropaneacetic acid. *Biochem. Biophys. Acta.* 1996;125:11-21.
77. Weil J H. *Biochimie générale.* 7ème éd. Paris : Masson ; 1996.
78. Wenz A, Thorpe C, Ghisla S. Inactivation of general acyl-CoA dehydrogenase from pig kidney by a metabolite of hypoglycine A. *J Biol Chem.* 1981;256(19):9809-12.
79. Zulian G B, Tullen E, Maton B. Methylene blue for ifosfamide-associated encephalopathy. *N Engl J Med.* 1995;332:1239-1240.

# ANNEXES

**Annexe 1** : Noms vernaculaires de *Blighia sapida* dans différentes langues d'Afrique de l'Ouest [54].

Langue	Dénomination	Langue	Dénomination
Français	Ris de veau, figuier finsan, fisanier	Gouro	tia
Anglais	ackee apple	Lobi, Dagara	ti, tyira
Adja	atjan	Mende	jokomi
Ditamari somba	nufugudom	Ashanti	achim, akyen, akye
Bobo	finsan	Twî	ankye, ankye fufuo
Dioula	fisan	Fanti twi	takwadua
Mooré	finsan	Ga	hatschi, ayigbeatia
Bambara	finza	Krobo	kingatsho
Toussian	pinrin	Ewe	adza, atsia
Yoruba	fiza, ishin, ishin jije, ishin oka	Awuna	adza, atsia
Malinké	fiza	Chumbulu	kake
Kabyé	kposso	Tshandjo	peso
Koto koli	kpézo	Kabure	peso
Moba	gbeng	Losso	peso
Tagwana	kohou, koum	Kuatchi	keka
Djimîni	kokougo	Basari	bugpom
Baoulé	kaa	konkomba	bugob
Ebrié	atuanbi	Haoussa	fisa, gwanja, kousa
Shien	pakgwé	Fulani	feso
Nupe	ila, ella	Onitscha	okwocha
Langues béninoises	ukpe, ukpe nofoua, ukpe-aghaba	Boki	otusi-shet
Sobo	ukpe rehren	Kukuruku	awai
Ibo	okpu	Jekri	abikotor
Owerri	okpu ocha	Ijaw	ilipa

**Annexes 2** : Maturity scale assigned to ackee fruit [8].

Assigned N°	Description of fruit
1 Blossom Development	Very small
2 Small	Hard green
3 Medium	Hard green
4 Large full size	Some yellowing
5 Fruit turned colour	Completely red or yellow (no green)
6 Slightly open	Pod lobes split to ~15-mm separation
7 Medium open	Seeds and arrilli visible
8 Wide open	Pod interior visible
9 Arrilli completely exposed	Pod shrivelling
10 Onset of spoilage	Arrilli decay evident

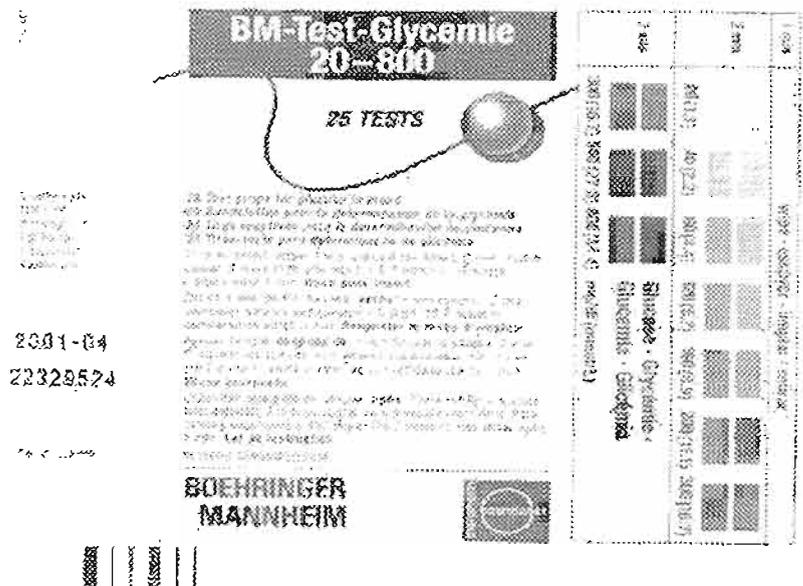
**Annexes 3** : Caractéristique du thermomètre digitale MT 1621-BMWC

Caractéristiques	
Etendue de mesure	32,0°C à 43,9°C
Précision	± 0,1 entre 34,0°C et 40,0°C ± 0,2 en dehors de cette plage à une température de 18°C à 28°C
Echelon	0,01
Température de stockage	-10°C à 60°C

**Annexe 4:** Tableau d'ajustement de la courbe Log-normale par la méthode du maximum de vraisemblance (calcul de la DE 50 du BM).

DE 50 BM								
N°	Conc (mg/kg)	log Conc	Survivants	p obs	p calc	Ecart	Ecart.ty pe	Ecart.r éd
1	2	0.3010	2	0.3333	0.2272	0.1061	0.1711	0.6205
2	4	0.6021	3	0.5000	0.6765	-0.1765	0.1910	-0.9242
3	6	0.7782	5	0.8333	0.8777	-0.0443	0.1338	-0.3315
4	8	0.9031	6	1.0000	0.9519	0.0481	0.0873	0.5503
5	10	1.0000	6	1.0000	0.9799	0.0201	0.0573	0.3505
6	12	1.0792	6	1.0000	0.9911	0.0089	0.0384	0.2322
7	14	1.1461	6	1.0000	0.9958	0.0042	0.0263	0.1586

**Annexes 5 :** Caractéristiques des bandelettes réactives BM-TEST



## SERMENT DE GALIEN

*Je Jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

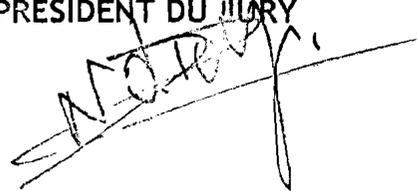
VU ET AUTORISE D'IMPRIMER

LE DIRECTEUR DE THESE

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping, sweeping strokes that form a complex, abstract shape.

Professeur BLAISE KOUDOGBO

LE PRESIDENT DU JURY

A handwritten signature in black ink, featuring a prominent, stylized initial 'M' followed by several fluid, connected strokes.

Professeur M'BAYANG N'DIAYE NIANG