Tome 185 — N° 2 2001

BULLETIN
DE
L'ACADÉMIE NATIONALE DE MÉDECINE

publié par

MM. Louis Auquier, Secrétaire perpétuel
et Jacques-Louis Binet, Secrétaire adjoint

Rédacteur en chef : Professeur Jean Cambier

ACADÉMIE NATIONALE DE MÉDECINE
16, RUE BONAPARTE — 75272 PARIS CEDEX 06
http://www.academie-medecine.fr

2001 — Tome 185 — N° 2

BULLETIN DE L'ACADÉMIE NATIONALE DE MÉDECINE

publié par MM.

Louis AUQUIER, Secrétaire perpétuel
et Jacques-Louis BINET, Secrétaire adjoint

Rédacteur en chef : Professeur Jean CAMBIER

Les sommaires du « Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine » sont reproduits dans les « Current Contents » de l'Institute for Scientific Information (Philadelphie). Les articles sont indexés dans le « Bioresearch Index » du Biosciences Information Service (Philadelphie), dans l'index Medicus, dans Excerpta medica et dans le « Bulletin Signalétique » du C.N.R.S. (Paris).

sommaire

Séance commune Académie nationale de médecine — Académie Vétérinaire de France — Académie d'Agriculture de France " La chaîne du froid et l'aliment "

Présentation

269 Historique de l'application du froid aux denrées alimentaires
M.P. Durand

Communications

275 Problèmes techniques liés à la chaîne du froid
Technical problems relating to the cold chain
A. Gac

287 Croissance microbienne et froid. Étude du cas particulier de *Listeria monocytogènes*
Microbiological growth and refrigeration. Particular case of *Listeria monocytogenes*
R. Rosset

301 Chaîne du froid — Concept de traçabilité — Applications pratiques
The cold chain — The traceability concept — Pratical applications
A. Gac, M.P. Durand

311 Analyse de facteurs influençant la température dans les réfrigérateurs des ménages
Analysis of effecting factors on domestic refrigerator temperature in use
E. Derens, O. Laguerre. B. Palagos

323 Température et qualités sensorielles des aliments
Temperature and sensorial qualities of foods
J. Puisais, M.P. Durand

Actualité

329 Intérêt du génotypage fœtal *RHD* dans la prévention de l'immunisation anti-D
Importance of *RHD* fetal genotyping for preventing anti-D immunisation
Y. Brossard, A. Sender, J.P. Cartron, J. Huchet, F. Pinon, Ph. Blot, G. David

Articles originaux

337 Microglie : origine et développement
Microglia : origin and development
B. Pessac, I. Godin, F. Alliot

349 Neurostéroïdes, leur rôle dans le fonctionnement du cerveau : neurotrophicité, mémoire, vieillissement...
Neurosteroids, a new function in the brain. Neurotrophicity, memory, ageing...
E.E. Baulieu

373 Le don d'ovocytes depuis la loi de bioéthique. Implications médicales, éthiques et juridiques déduites d'une série de 300 cas à l'hôpital Tenon
Ovocyte donation since the application of the so called bioethical laws. Medical, ethical and legal implications posed by the study of a series of 300 cases at Tenon Hospital
J. Salat-Baroux, D. Cornet, J. Mandelbaum, Y. Watanabe, Ph. Merviel, J.M. Antoine

387 Chirurgie des cancers bronchiques après radiochimiothérapie ou chimiothérapie. Risques et bénéfices
Surgical treatment of lung cancer after radiochemotherapy or chemotherapy. Risks and benefits
P. Fuentes, Ch. Doddoli, P. Thomas, R. Giudicelli

405 Les maladies humaines familiales à prions
Inherited human prion diseases
J.M. Warter

417 Les chondrocalcinoses articulaires familiales : étude d'une famille alsacienne
Hereditary diffuse articular chondrocalcinosis : study of alsatian family
P. Netter, D. Loeuille, J.Y. Jouzeau, P. Gillet, J. Peterschmitt, J. Pourel, A. Gaucher

Communiqué

427 Internet et information du public sur le médicament
P. Lechat

Information

433 Réflexions éthiques autour de la réanimation néonatale
D. Pellerin

445 Sur les journées d'appel de préparation à la défense. Premiers résultats d'une enquête sur la santé et les comportements des jeunes
R. Henrion, J.M. Costes, F. Beck, S. Legleye, P. Peretti-Watel

Rapport

451 Sur la demande d'autorisation d'exploiter, en tant qu'eau minérale naturelle, après transport à distance, l'eau du captage Désirée Clary situé sur la commune de Gréoux-les-Bains (Alpes de Haute-Provence)
C. Laroche

Vie de l'Académie

455 Actes

Recommandations aux auteurs

477 Instructions

Abonnements au Bulletin de l'Académie nationale de médecine

479 Tarifs et modalités

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 269-274, séance du 13 février 2001

Présentation de la séance thématique " La chaîne du froid et l'aliment "

Historique de l'application du froid aux denrées alimentaires

Maurice Paul DURAND *

Aliments caloriques et frigories conservatrices se sont unis pour notre plus grande satisfaction en 1876. Le parrain de ce mariage était Charles Tellier. Le voyage de noces eut lieu sur un bateau trois mâts de 1 200 tonneaux, équipé de 3 machines frigorifiques de 20 000 frigories/heure, rebaptisé par Tellier et pour l'occasion : « Le Frigorifique ». La cargaison, constituée par la viande de 10 bœufs, 12 moutons, 2 veaux, est embarquée à Rouen et débarquée à Buenos Aires, après un voyage de 12 000 km parcourus en 105 jours.

La viande supporte assez bien cette atmosphère réfrigérée en air sec, entraînant une déshydratation finale de 25 % environ. Les Argentins prennent immédiatement conscience des formidables possibilités techniques de ce nouveau mode de transport des produits périssables et saluent cette prouesse technique. Le mouvement était lancé et devenait irréversible, puisqu'il perdure jusqu'à nos jours, soit depuis 125 ans. Enfin, c'est en 1877 qu'un français, inventeur de la machine à absorption ammoniac-eau, Ferdinand Carré, démontre la possibilité de transporter des viandes congelées sur le même itinéraire France-Argentine. Une ère nouvelle voyait le jour, celle de la consommation et du transport dans le monde entier des denrées périssables et des produits congelés ou frais.

Nos habitudes alimentaires allaient s'en trouver radicalement changées, diversifiées. L'économie de certains pays allait également s'en trouver profondément modifiée, permettant, pour certains d'entre eux, d'accéder à un statut de pays exportateur et riche.

C'est ainsi qu'en février 1880, le cargo Strathleven apporte à Londres le premier chargement de viande australienne : 134 tonnes de bœuf et de mouton congelées, après un voyage de 24 000 km en 9 semaines. Cet épisode est sans doute à l'origine du développement économique de l'Australie et de la Nouvelle Zélande, jadis vouées à la seule exportation des laines de leurs moutons vers les usines textiles anglaises.

Mais revenons quelques instants sur les relations aliment-froid.

* Correspondant de l'Académie nationale de médecine.

De toute évidence, l'homme comprend tôt que ses aliments se conservent mieux dans l'air froid. Sans le secours d'une machine frigorigène, le froid peut être produit soit :

- par la vaporisation de l'eau au travers de vases en poterie poreuse, encore pratiquée de nos jours. Thévenot nous signale l'existence d'une fresque égyptienne du III^e^ millénaire montrant un esclave agitant un éventail devant des jarres en terre ;
- par le rayonnement de la terre vers l'espace qui explique que même en pays chauds, la nuit, par temps clair, la température peut s'abaisser en dessous de 0° C, aboutissant à la production d'une pellicule de glace, pratique déjà signalée par Protagoras en Égypte au v^e^ siècle avant J.C. et encore appliquée de nos jours en Iran et au Chili.

En ce qui concerne nos ancêtres cavernicoles, les préhistoriens pensent que les grottes, celle d'Altamira par exemple, ont été utilisées pour conserver les aliments, en particulier le gibier ; un auteur espagnol attribue cette fraîcheur à l'évaporation de l'eau, à l'épaisseur des parois et à la détente de l'air dans les crevasses communicant avec l'extérieur.

Quant à l'antiquité gréco-latine, si les traités d'Hippocrate sur « les régimes » et de « l'aliment » sont muets sur ce sujet, tout au plus notons-nous, dans le traité de cuisine d'Apicius, la conservation de la viande par le miel, le sel, le vinaigre, l'huile, l'eau bouillante, l'auteur se bornant à constater que la viande se conserve mieux en hiver qu'en été. Froid et aliments frais n'étaient guère de mode à cette époque.

Ferniot signale que les poissons pouvaient arriver à Rome par des bateaux viviers dans des bacs de métal remplis d'eau de mer et que les romains transportaient ceux pêchés dans le nord dans la neige ou la glace sous des couvertures. Selon cet auteur, ce procédé de conservation des produits frais représentait un progrès indéniable sur ceux en usage jusqu'alors : séchage, salage, fumage. Signalons enfin que Néron, poète, musicien, gastronome autoproclamé, confectionna le premier sorbet en mélangeant pulpe de fruits, miel et neige.

Beaucoup plus tard, nos châtelains construisaient dans les parcs de leurs demeures et pour la conservation de leurs aliments frais, des glacières enterrées dans lesquelles ils stockaient neige et glace recueillies l'hiver.

Il faut attendre le dernier quart du XIX^e^ siècle pour assister à la naissance d'une nouvelle révolution technologique, la conservation et le transport à grande distance des produits périssables en atmosphère réfrigérée. La pratique de récolte, entreposage et transport de la glace naturelle évoqués précédemment, s'est industrialisée. Aux États-Unis 25 millions de tonnes de glace naturelle étaient utilisées en 1890. Cinq cents mille tonnes de glace américaine et norvégienne étaient importées en Grande-Bretagne en 1899.

A partir de 1870, les chambres froides pour fruits, refroidies par la glace naturelle, puis par glace artificielle et enfin par le froid mécanique se multiplient aux États-

Unis. Le transport en caisses glacées (1866) puis en wagons frigorifiques des fruits des régions de l'ouest productrices vers l'est consommateur, prend un essor prodigieux : 60 wagons en 1888, 600 en 1891. En 1910 la « Pacific fruit express » dispose d'un parc de plus de 6 000 wagons réfrigérants entraînant la multiplication par un facteur 10 des vergers en Californie de 1880 à 1910.

La France suit, avec du retard ! Des chambres froides expérimentales sont construites en 1908, puis en 1910 sous l'égide de l'Association Française du Froid. Mais elles sont abandonnées en 1912 faute de clientèle suffisante.

Il faudra attendre la fin de la Seconde Guerre mondiale pour assister à l'explosion du froid alimentaire qui se développa tout au long de cette deuxième moitié du XX^{e} siècle :

- **Froid dans le transport** des aliments (bateaux, avions, camions, wagons réfrigérés).
- **Froid dans l'art culinaire** (légumes prêts à l'emploi, aliments congelés, plats préparés surgelés, viandes, charcuteries, produits laitiers vendus en linéaires réfrigérés).
- **Froid domestique** enfin avec l'enfournement dans le réfrigérateur des aliments achetés une fois par semaine, voire par quinzaine.

Voici brièvement résumés les évènements qui nous ont menés à notre mode de vie actuel, dans lequel le réfrigérateur ménager et le congélateur font partie de notre quotidien culinaire par son approvisionnement en produits dits frais ou congelés achetés dans les gondoles de nos supermarchés.

Tout le monde est à notre table, tous les produits sont à notre disposition, notre curiosité pour les saveurs exotiques se développe, « on oublie les saisons et le plaisir que faisait naître l'apparition des premières asperges, des premières fraises », dit Jean Ferniot.

Ces pratiques peuvent se révéler dangereuses et justifient cette séance commune aux Académies de Médecine, d'Agriculture, Vétérinaire, ayant en charge le problème de l'alimentation de l'homme.

Elles se devaient d'intervenir et de signaler les dangers de la non maîtrise et du non respect de la chaîne du froid dans la préparation des aliments qui nous sont destinés. Aussi, pour cette séance, avons-nous prévu les interventions de :

- André Gac, directeur honoraire de l'Institut International du Froid, qui traitera des récents problèmes techniques dans l'ingénierie du froid ;
- Roland Rosset, vice-président de l'Association Française du Froid, qui ordonnera son exposé autour de l'action de la température sur la croissance des germes potentiellement pathogènes ;
- André Gac et moi-même parlerons du concept de traçabilité et de ses applications pratiques dans la chaîne du froid ;
- Evelyne Derens, chercheur au CEMAGREF (Unité de recherche : génie des procédés frigorifiques) qui fera état des enquêtes faites sur les réfrigérateurs ménagers au domicile du consommateur ;

- Jacques Puisais et Maurice Paul Durand, de l'Institut du Goût, délaissant pour quelques instants les germes pathogènes et les problèmes de croissance bactérienne associés à la température, diront, à la suite de Brillat Savarin en 1848, que manger est aussi un plaisir et que la température idéale de consommation des éléments n'est pas obligatoirement celle de notre réfrigérateur ;
- Enfin la conclusion de ces différents interventions sera tirée par notre collègue Roland Rosset.

Je vous remercie de votre attention.

DISCUSSION

M. Maurice TUBIANA

Comme on l'a dit, de petites quantités de listerias, ou autres bactéries, n'ont pas d'inconvénients, voire présentent des avantages pour les sujets normaux chez qui une immunisation est ainsi entretenue. En revanche, ces bactéries peuvent être dangereuses pour les sujets fragiles : femmes enceintes, personnes âgées. Ne faudrait-il pas informer les utilisateurs de ce fait par un étiquetage approprié ?

Vous proposez un étiquetage approprié pour limiter les conséquences pathologiques des listerias du genre « à déconseiller aux personnes présentant un déficit immunitaire » (femmes enceintes, personnes âgées, etc.). Vous avez tout à fait raison, le président Gabriel Blancher et moi-même partageons ce point de vue. A l'issue de trois réunions internes, sur listeria-listeriose, nous avons proposé un communiqué incluant ce souhait d'étiquetage. Je crois par ailleurs que les services des différents ministères y sont favorables également. Malheureusement, lorsque l'on a proposé ce communiqué au vote de l'Académie cette phrase a été supprimée, en raison des réticences d'un certain nombre de nos collègues. Je suis d'accord pour proposer à nouveau ce texte. En outre, une vive controverse s'est élevée au sein de l'industrie laitière entre les tenants et les opposants de cette mention. Il semblait qu'une légère majorité se dégageait contre celle-ci. Mais je pense que cela devrait évoluer vers une acceptation de celle-ci. Dans les deux oppositions mentionnées ci-dessus on tirait argument qu'on allait porter un coup très dur en ce qui concerne la commercialisation de ces produits dits à risques avec ce genre de mise en garde... ce que je ne crois pas si j'en juge par la consommation des cigarettes et de l'alcool qui perdure, malgré les avertissements.

Mots-clés : Réfrigération. Industrie alimentaire. Microbiologie alimentaire. Microbiologie industrielle.

Key-words (Index Medicus) : Refrigeration. Food industry. Food microbiology. Industrial microbiology.

M. Alain RÉRAT

Il est frappant de constater que l'incidence des bouffées de listérioses en France a beaucoup diminué depuis 10 ans. Mais il semble maintenant impossible de passer en dessous de ce niveau de 4 par million (soit 250 cas par an et 25 % de mortalité). Or, on sait également que les mesures d'hygiène sont de plus en plus drastiques dans les entreprises agro-alimentaires. Ne peut-on pas voir là un problème d'écologie microbienne, les micro-organismes saprophytes qui sécrètent les substances inhibitrices des listerias étant de plus en plus massivement détruits, et l'équilibre entre les listerias et ces micro-organismes étant ainsi rompu ? Les listérioses sont-elles une « maladie de l'hygiène » ?

Une bonne partie des accidents listériens sur les fromages dits au lait cru sont probablement dus au fait que ce ne sont pas de véritables fromages au lait cru qui sont vendus au consommateur. La plus grande partie de ces fromages sont produits à partir de laits dits thermisés, c'est-à-dire chauffés au-dessus de 42° (définition légale du lait cru) et en dessous de 73° (définition légale du lait pasteurisé). La pratique de la thermisation (entre 55° et 70°) s'est insinuée dans cette faille juridique et réglementaire. L'Académie d'Agriculture s'en est émue et a fait remarquer au ministre de l'Agriculture que cette pratique n'a pas de base réglementaire en France, ce à quoi le ministre a répondu en reconnaissant ce fait... Mais il faut trouver un moyen pour détecter cette pratique et cela n'est pas facile, semble-t-il. En effet, les lactobacilles, agents inhibiteurs des listerias, sont détruits lors de ces chauffages, laissant le champ libre aux listerias survivants ou de surcontamination. En outre, ainsi que je l'avais signalé dans la séance listéria ici-même, listéria est ubiquiste et malgré des mesures hygiéniques de plus en plus draconiennes on en aura toujours. Je citais une étude allemande portant sur 11 usines agroalimentaires, sur plus de 1 200 prélèvements/an sur 4 ans. Le pourcentage listeria a été successivement 2,9 % ; 0,9 % ; 0,7 % les 1ère, 2ème, 3èmeet 4ème année malgré les efforts constants de propreté. Conclusion : il faut vivre avec mais faire en sorte que le petit nombre de listeria présent dans le produit n'explose pas.... d'où surveillance rigoureuse du froid. Enfin un membre de l'Académie d'Agriculture, directeur général d'une grosse société normande, est venu nous dire, au cours d'une réunion interne Listeria, qu'il avait de plus en plus de problèmes de fabrication des camemberts avec ces laits trop propres, qu'il était obligé de réensemencer. Donc mon point de vue est qu'effectivement, dans certains cas, l'antibiose naturelle ne peut plus s'effectuer, d'autant qu'avec l'augmentation de la durée moyenne de vie, la proportion de personnes sensibles aux listerias, les personnes âgées, va en augmentant .... d'où, à mon avis, une très probable stabilisation des cas de listérioses dans les années à venir.

M. René GROUSSARD *

En ce qui concerne la pose obligatoire d'un thermomètre dans les frigidaires, l'Académie d'Agriculture considére qu'il faut attaquer « le mal par la racine ». Ici, c'est la connaissance par l'usage de la température, là, ce sera le fait que l'agriculteur évite de polluer dès le premier acte de production, c'est ce que l'on appelle la culture en bon père de famille, qui doit permettre de limiter les conséquences néfastes au niveau du consommateur. Ce dernier doit être informé. Notre souci, à l'Académie d'Agriculture, c'est après chaque séance de publier un communiqué faisant connaître sur chaque communication les conséquences que nous en

* Trésorier perpétuel de l'Académie d'Agriculture de France.

tirons. Nous sommes encore loin d'avoir atteint cet objectif, mais c'est bien le sens de notre démarche qui pourrait être une démarche commune, non seulement pour cette séance mais à l'occasion de chacune de nos séances communes. Nos Académies ont été créées pour cela, c'est en tout cas notre sentiment.

Avec les Académies d'Agriculture et Vétérinaire, il peut y avoir synergie ou complémentarité pour un problème donné, lorsqu'il s'agit d'en tirer les conséquences et lorsqu'il ne s'agit pas d'une simple observation. Ainsi, à l'Académie de médecine, au cours de nos discussions « listériose » il est apparu que le chauffage des laits dit « thermisation » pouvait poser problème. L'Académie de médecine a répondu qu'il s'agissait d'un problème technologique, qui était du ressort de l'Académie d'Agriculture. Cette dernière a formulé un avis sur la « thermisation » des laits suivi d'une réponse du ministre de l'Agriculture. Pour « le froid et l'aliment » thème de cette séance, l'implication des 3 Académies est évidente : ce sont les produits animaux, donc du ressort de l'Académie Vétérinaire, qui posent surtout problème ; la maîtrise du froid et la surveillance logistique sont du domaine des ingénieurs frigoristes, que l'on retrouve à l'Académie d'Agriculture ; les conséquences néfastes du non-respect de la chaîne du froid sur la santé humaine sont du ressort de l'Académie de médecine et il est normal qu'elle soit impliquée. Aussi suis-je tout à fait d'accord pour prévoir un communiqué commun, que nous élaborerons avec le président Gabriel Blancher et que nous soumettrons aux deux autres Académies pour qu'il soit revu, complété ou modifié.

M. Pierre GODEAU

A côté des microbes, dont on a longuement parlé, se pose le problème des parasites qui peuvent être absorbés si le poisson n'est pas congelé à -20°. Qu'en est-il exactement car le mode de consommation des poissons crus expose à contamination, notamment aux anisakidoses ?

— Réponse de M. EUZÉBY

Il est vrai que les anisakidés sont très résistants à la congélation. Mais il faut aussi rappeler que toutes les larves de nématodes logées dans les muscles des poissons ne sont pas toutes des larves d'anisakidés, que tous les anisakidés ne sont pas pathogènes car certains d'entre eux, thermosensibles, sont détruits dans l'organisme humain ; que les larves d'anisakidés ne passent dans les muscles qu'après un certain délai après la mort des poissons et que l'éviscération rapide des poissons prévient la localisation musculaire des parasites.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 275-285, séance du 13 février 2001

Problèmes techniques liés à la chaîne du froid

Technical problems relating to the cold chain

André GAC *

RÉSUMÉ

Après avoir présenté l'état de développement de la chaîne française du froid, on montre l'intérêt économique de l'entreposage et des traitements frigorifiques. Compte tenu de la valeur de la réduction des pertes, le temps de retour des investissements peut être estimé aux environs de trois ans. Dans les années à venir, la conception des nouvelles installations évoluera. De brèves informations sur cette évolution sont fournies. Une des contraintes auxquelles sont confrontés les opérateurs, notamment les transporteurs, est la multiplicité des exigences réglementaires, avec pour conséquences des distorsions de concurrence. L'évolution de la chaîne du froid est aujourd'hui caractérisée par une démarche de régulation logistique complexe des flux de marchandises, au moyen d'un système informatique, afin de satisfaire, à un moindre coût, l'adéquation de la production à la distribution. Cette logistique est une stratégie pour gérer de l'aval vers l'amont les interfaces entre les divers opérateurs. Enfin, on indique les principales causes de ruptures de la chaîne du froid qui se situent au niveau de la vente au détail et de la consommation.

MOTS-CLÉS : FROID.

SUMMARY

After having covered the current status of the cold chain in France, the author highlights the economic impact of refrigerated storage and processing involving refrigeration. Lose reduction is such that the return on investments is estimated as being roughly 3 years. In years to come, progress will be achieved in the field of plant design. Some information on design trends is provided. Operators in general, and carriers in particular, are faced with an increasingly complex regulatory framework leading to a competition imbalance. The current cold chain developmental trend is characterized by complex computer management of logistics : the flow of goods is modulated in order to meet the production to the distribution needs as cost effectively as possible. This logistic strategy enables management of downs-

* Directeur honoraire de l'Institut International du Froid, Membre de l'Académie d'Agriculture de France.

Tirés-à-part : Professeur André GAC, 65 bld Excelmans — 75016 Paris.
Article reçu le 12 janvier 2001, accepté le 15 janvier 2001.

tream to upstream interfaces involving various operators. Finally, the author indicates the main causes of non-compliance with the cold chain, generally at retail and consumer levels.

KEY-WORDS (Index Medicus) : COLD.

INTRODUCTION

La chaîne du froid est un ensemble maillé d'équipements frigorifiques, fixes ou mobiles, connectés les uns aux autres de sorte que les denrées périssables sont maintenues en permanence, de leur production à leur utilisation, à une température définie, dans le but de favoriser leur commercialisation en prolongeant la période pendant laquelle sont préservées leurs propriétés hygiéniques et (ou) commerciales (nutritionnelles et organoleptiques).

Les équipements fixes sont, de l'amont vers l'aval, des entrepôts industriels, des entrepôts de grossistes et de marchés de gros, des plates-formes de distribution, des chambres froides et des meubles de vente et d'exposition dans les magasins de vente au détail et, enfin, des réfrigérateurs et congélateurs domestiques. Les équipements mobiles (engins routiers, caisses mobiles et conteneurs, wagons, cargos polythermes) sont constitués d'une enceinte isolée refroidie le plus souvent aujourd'hui par une machine frigorifique.

La chaîne française du froid est une des plus importantes et performantes au monde.

Ainsi, le volume des frigorifiques industriels, exprimé en litre par habitant, est de plus de 300, alors qu'aux États-Unis il est de l'ordre de 190 litres et d'une dizaine de litres dans les pays du tiers monde. Cet équipement se répartit approximativement en un tiers de locaux à basse température et deux tiers de chambres froides en réfrigération. D'autre part, le volume total de 20 millions de m^3 est partagé à raison de un quart pour l'entreposage public [4], à 90 % en congélation, un quart pour les stations fruitières et légumières, toutes en réfrigération, et un demi pour les chambres froides annexées aux usines de l'agroalimentaire, la plupart en réfrigération.

En ce qui concerne les transports, la France dispose de plus de 70 000 véhicules, dont les deux tiers sont frigorifiques.

Si on met bout à bout les meubles de vente de produits surgelés, congelés et réfrigérés, la longueur totale serait de 3 200 km, dont 1 200 km pour les seuls appareils à basse température.

Enfin, plus de 99 % des foyers disposent d'au moins un appareil frigorifique domestique [16].

JUSTIFICATION MACROÉCONOMIQUE DE LA CHAÎNE DU FROID

La consommation française de denrées périssables, un peu supérieure à vingt millions de tonnes par an ou 360 kg par tête, était la suivante en 1994 :

Produits ultrafrais	— produits laitiers	3 257 500 t
(à +2/+4° C)	— produits carnés	4 965 500 t
— total		8 223 000 t
Produits réfrigérés	— fruits et légumes	9 609 000 t
(à +7/+12° C)	— produits sucrés	984 000 t
— total		10 593 000 t
Produits congelés	— denrées surgelées	837 000 t
(à ou < —18° C)	— crèmes glacées	385 000 t
— total		1 222 000 t

Si la distribution des aliments périssables était faite sans couverture de froid, les pertes seraient augmentées de l'ordre de 30 %. Comme, d'après l'INSE, le coût annuel du panier de la ménagère est d'environ 10 000 francs (1 525 €) et comme tous les aliments, sauf les huiles et le sucre, doivent ou peuvent subir au moins un traitement par le froid entre la production et la consommation, le budget « alimentation » des ménages serait majoré de la valeur des pertes, soit d'environ 15 à 20 %. Pour la communauté nationale, la dépense annuelle supplémentaire serait de l'ordre de 100×10^9 francs ($15{,}25 \times 10^9$ €).

Par ailleurs, une estimation des investissements à consentir pour réaliser la chaîne du froid montre que le temps de retour serait inférieur à trois ans. Ce résultat, qui est remarquable, l'est en fait d'avantage si on tient compte des facteurs suivants [9, 15] :

— son équipement frigorifique permet à la France d'occuper la première place mondiale pour les exportations de denrées périssables et élaborées ;

— la sole cultivée libérée par la réduction des pertes est utilisée à d'autres productions. La France est la deuxième puissance exportatrice de produits agricoles ;

— les intoxications sont moindres grâce à une meilleure protection hygiénique des denrées ;

— des emplois sont créés pour l'exploitation des installations frigorifiques ;

— des activités industrielles et artisanales sont induites par la construction, l'installation et l'entretien des machines.

ENVIRONNEMENT SOCIO-ÉCONOMIQUE DU DÉVELOPPEMENT DE LA CHAÎNE DU FROID

Si depuis la naissance du froid artificiel, en 1876, date du premier transport intercontinental de viandes réfrigérées par Ch. Tellier, la chaîne du froid a relativement peu progressé jusqu'à la fin de la Seconde Guerre mondiale, il n'en a pas été de même durant les quarante dernières années. Les changements résultent de progrès techniques. Ils s'inscrivent dans l'évolution sociale (généralisation du travail des femmes

hors du milieu familial, prise de conscience de la diététique, loisirs et sports, etc.) et ils ont bénéficié de la diffusion de l'information par la presse.

En ce qui concerne la technologie, les faits saillants sont :

— l'installation d'équipements frigorifiques spécialisés à la production (frigorifiques d'abattoir et viandes foraines, stations fruitières, laiteries, etc.) ;
— la création d'un parc important d'engins de transport à température dirigée ;
— la palettisation et la manutention mécanique des charges.

L'évolution sociale a favorisé ou a profité :

— de la généralisation de l'équipement des ménages en réfrigérateurs,
— de l'apparition et du développement des grandes surfaces, dont la part de marché excède 60 % des achats de nourriture,
— de la multiplication des préparations élaborées ou prêtes à l'emploi et des plats cuisinés surgelés ou réfrigérés,
— de l'offre croissante de produits nouveaux. Les consommateurs ne demandent rien mais, devant la diversité de l'offre, sélectionnent ceux qui répondent à leurs besoins, différents selon les âges et les classes sociales, et qui ont un rapport qualité/prix attractif. Un bon exemple est le succès des surgelés, dont la croissance a été de plus de 10 % par an pendant plusieurs décennies, malgré les critiques dont ils sont l'objet encore maintenant,
— du développement de la restauration hors foyer,
— de l'extension des échanges commerciaux de denrées périssables à l'échelle de la planète, avec la disparition de la notion de saison,
— de la prise de conscience par les consommateurs de la diététique et de la sécurité alimentaire ainsi que des concepts de traçabilité, de produits « bio », des OGM, de risques alimentaires, de nuisances environnementales et aussi de chaîne du froid.

ÉVOLUTION LOGISTIQUE PRÉVISIBLE DE LA CHAÎNE DU FROID

De ce qui précède on peut penser que les facteurs suivants influeront sur l'évolution de la logistique de la commercialisation des denrées périssables :

— les progrès faits dans le domaine de la sélection de produits agricoles plus résistants aux contraintes du milieu environnant et mieux adaptés aux conditions de la commercialisation moderne ainsi que la généralisation d'emballages et de conditionnements spécifiques à chaque type de denrée, permettant de réduire les besoins de froid, devraient prolonger la durée de la mise en marché et réduire les coûts de la distribution ;
— pour les nouveaux produits périssables, la chaîne du froid devra satisfaire leurs exigences spécifiques ainsi que cela a été le cas pour les salades préparées en usine, qui doivent être maintenues entre 0 et + 2° C [2] ;

— quel sera le développement du commerce des denrées périssables par Internet ? L'une des raisons du succès des grandes surfaces a été la liberté totale de choix offerte aux consommateurs. En sera-t-il de même pour le commerce électronique par Internet ?

Ces quelques considérations conduiront la chaîne logistique du froid à évoluer durant les prochaines années.

Jusque vers les années 1970, la chaîne du froid avait pratiquement pour unique objet d'assurer au moindre coût, au moment et en quantités correspondant aux besoins, le déplacement des denrées périssables depuis les lieux de production vers les lieux de consommation ou de transformation [5, 6].

Aujourd'hui, il s'agit, au moyen d'un système informatique et de communication, d'une démarche de régulation logistique complexe des apports de marchandises de sorte à satisfaire, en flux tendu (pas de stock en magasin de détail) et à un moindre coût, l'adéquation de la production à la consommation ou à la transformation. En d'autres termes, cette logistique est une véritable stratégie de gestion de l'aval vers l'amont des interfaces entre les divers opérateurs qui deviennent des prestataires de service. Compte tenu des ventes constatées, les détaillants répercutent leurs besoins vers les intermédiaires (transporteurs, grossistes, etc.) et les producteurs. Le maillon terminal de la vente pilote les flux de marchandises, ce qui implique, pour chacun des opérateurs, une capacité technique ou compétence, une capacité financière, une capacité sociale et une capacité commerciale. S'il y a surproduction, l'excédent est détruit ou congelé.

Il faut également prendre en considération la notion d'échelle et d'influence de certains opérateurs par rapport aux autres. Il est évident que les centrales d'achat des grandes sociétés de distribution, à un moindre degré les usines de production des industries agroalimentaires et, dans certaines circonstances, les consommateurs (OGM, vache folle) tendent à imposer leurs conditions techniques et financières aux autres opérateurs, notamment aux producteurs agricoles et aux transporteurs, ce qui peut être cause de déstabilisation socio-économique. Par exemple, vers les années 1995, les prix de revient d'exploitation d'engins de 40 tonnes étaient de près de 6,5 F/km (1 €). Il arrive que des transporteurs en difficulté financière soient obligés d'accepter des contrats à des conditions sensiblement inférieures des distributeurs, ce qui engendre des situations malsaines de concurrence. Il en est de même pour le secteur agricole, confronté à une concurrence parfois sauvage.

Pour l'avenir, la commercialisation des denrées périssables évoluera vers un système global européen par intégration des logistiques nationales. Aussi, le développement de la chaîne du froid s'inscrira dans un schéma logistique global, ce qui suppose une organisation économique en réseau coopératif.

PERSPECTIVES D'ÉVOLUTION DES ÉQUIPEMENTS FRIGORIFIQUES

Tous les opérateurs de la chaîne du froid sont soumis à des contraintes de rentabilité financière et à de nombreuses réglementations de diverses natures, plus ou moins strictes et certaines arbitraires voire contradictoires. Il faut prendre conscience que dans tous les domaines de l'emploi du froid, et notamment dans celui de l'agroalimentaire, les préoccupations actuelles sont très marquées en matière de protection de l'environnement et d'économie d'énergie.

Le protocole de Montréal et ses amendements ont banni l'emploi des fluides frigorigènes halogénés chlorés, destructeurs de la couche d'ozone, qui étaient utilisés dans les machines frigorifiques et dans les isolations.

L'engagement des États tend à limiter les rejets de CO_2 et des gaz à effet de serre [12].

Les réglementations actuelles et probables contribueront à réorienter la conception des équipements, à modifier les procédés de production et de distribution de froid ainsi qu'à adapter la logistique, en ce qui a trait à l'organisation des transports à température dirigée, aujourd'hui fortement axés sur l'utilisation de la route [13, 18].

Par exemple, la configuration actuelle, en ligne, des entrepôts n'est pas la plus favorable. On pourrait imaginer que les frigorifiques industriels du futur seraient construits sur une base carrée, avec un espace central pour la distribution des lots dans les différentes chambres froides et avec la salle des machines au-dessus de cet espace, ce qui réduirait considérablement les risques de fuite de fluide [14].

UN EXEMPLE DE RIGIDITÉ RÉGLEMENTAIRE — LES TRANSPORTS À TEMPÉRATURE DIRIGÉE

Le transport à température dirigée des produits périssables est principalement assuré par des véhicules routiers, malgré leurs inconvénients (saturation du trafic, pollution, nuisance sonore). Il représente de 5 à 10 % des tonnages totaux qui, en France, sont de 70 kg par jour et par habitant. D'autre part, l'organisation des circuits commerciaux alourdit le coût de la distribution. En moyenne, il est déplacé en engin frigorifique plus d'une tonne par habitant et par an pour une consommation annuelle de 360 kg [8].

Les transports de denrées périssables pour compte propre régressent au profit d'entreprises prestataires de service car ces transports sont sans doute parmi les plus techniques et aussi parmi ceux devant satisfaire le plus d'exigences, celles relatives à la sécurité des déplacements sur les routes et celles concernant le contrôle de la température et le maintien en bon état, en particulier hygiénique, des denrées prises en charge.

La libre circulation des marchandises depuis l'ouverture du marché unique et l'apparition du cabotage engendrent un contexte concurrentiel fort qui pousse les

opérateurs à optimiser un outil pour le rendre modulable en fonction des besoins de leurs clients [17].

Comme il n'existe pas de directive régissant les conditions techniques de transport des denrées périssables, la réglementation à appliquer est celle du pays où circulent les engins, ce qui fait qu'un transporteur européen doit respecter seize réglementations, quinze textes nationaux et, hors des limites de l'Union, l'accord ATP (Accord relatif aux transports internationaux de denrées périssables et aux engins spéciaux à utiliser pour ces transports) [1]. Un transporteur de l'Europe de l'Est circulant dans l'Union, n'a à satisfaire que l'ATP. Pour palier cet imbroglio réglementaire, tous les pays de l'Union Européenne étant parties à l'ATP, les professionnels demandent qu'une directive cadre reprenne les spécifications des annexes techniques de l'ATP. C'est là, pour les prochaines années, une condition essentielle au développement des transports dans des conditions de concurrence loyale.

D'autre part, la directive 93/43/CEE relative à l'hygiène alimentaire, qui renforce celle sur l'enregistrement de la température pour les denrées congelées ou surgelées, impose à tous les opérateurs d'organiser la prévention des dangers de pollution que les denrées périssables ou non pourraient encourir [3]. Cette directive a conduit les transporteurs français à rédiger et à diffuser un guide de « bonnes pratiques hygiéniques dans les transports sous température dirigée » [7].

A côté des réglementations spécifiques aux transports des denrées périssables, il existe d'autres obligations particulièrement contraignantes comme les interdictions de circulation certains jours, différentes d'un pays à l'autre, les attentes anormalement longues à certaines frontières de l'Europe de l'Est (jusqu'à 48 heures), la longueur maximale fixée par une directive des semi-remorques rendant difficile la mise en place d'un groupe frigorifique performant et peu bruyant, ou encore le poids total en charge qui n'est pas majoré pour tenir compte de la présence de la machine frigorifique, de l'isolation, des parois mobiles, etc.

De plus, la réglementation sociale est de plus en plus contraignante, notamment en France. Pour limiter l'effet de serre et améliorer la sécurité, il est envisagé d'imposer le ferroutage à l'échelon européen, ce qui modifiera profondément les conditions de transport de masse.

Mais, en dehors de ces contraintes, les entreprises de l'Europe occidentale se trouvent en situation de concurrence défavorisées par rapport à celles de l'Europe centrale et orientale. En effet, si le contexte réglementaire présent est maintenu pendant encore quelques années, des sociétés étrangères à l'Union, soumises à une réglementation plus laxiste, exploitant des véhicules de performances médiocres avec des personnels sous-payés et offrant des prix de service anormalement faibles, se substitueront en grande partie aux entreprises de l'Europe de l'ouest, tant pour les transports internationaux que pour des transports intracommunautaires et locaux. Cette évolution risque d'avoir de graves conséquences socio-économiques et, de plus, d'être responsable d'accidents de la route. On pourrait la comparer à celle de la marine marchande. L'évolution de celle-ci s'est traduite, en une vingtaine d'années,

par la prolifération des pavillons de complaisance, par la réduction drastique des flottes occidentales et par des catastrophes maritimes de plus en plus fréquentes. Ainsi, avec près de 400 navires en 1982 et 210 en 1998, la France est passée du 5e au 28e rang mondial.

Aussi, des actions répétées de sensibilisation devront être effectuées auprès des gouvernements, de la Commission Européenne et des Nations Unies, pour que les règlements soient coordonnés, qu'ils soient strictement contrôlés afin d'améliorer la qualité des services, de réduire les nuisances et la pollution et de favoriser l'établissement d'un climat de concurrence loyale.

LES RISQUES DE RUPTURE DE LA CHAÎNE DU FROID

La chaîne du froid est, aujourd'hui, d'une fiabilité remarquable, mais elle ne peut être totalement sûre. Les ruptures peuvent être accidentelles, telles une panne de machine ou une fuite de fluide, voire répétitives, cause d'ignorance ou de négligence.

La fréquence des risques de rupture par ignorance et négligence est la plus grande aux stades des transports, de la distribution, de la vente au détail et de la consommation.

Les transports de masse

Pour ces transports, sans ouverture de porte, en engins agréés ATP, les risques sont limités. On dispose, en cas de panne, d'un délai suffisant pour prendre des mesures conservatoires, même pour des denrées réfrigérées, en raison de l'inertie thermique du chargement et du faible coefficient de transfert de chaleur des parois de la caisse. En revanche, si les engins ne sont pas performants, si la distribution de l'air est hétérogène ou si les conditions de transport sont inadéquates, il y a risque de réchauffement et perte de tout ou partie de la cargaison.

Les livraisons

Lors des livraisons, l'air de la caisse est renouvelé à chaque ouverture de porte et, par temps chaud, il n'est pas possible de maintenir la température intérieure. Aussi est-il nécessaire de minimiser le temps des ouvertures et de limiter la durée des tournées. En outre, il est bon de doubler la porte par un rideau en lames de plastique souple.

La vente au détail

L'exposition à la vente est une phase sensible [10, 11].

Pour les meubles ouverts horizontaux à ouverture vers le haut, les paquets situés au centre de la couche supérieure sont inévitablement plus chauds que l'air refroidi passant à leur surface, en raison des échanges radiatifs avec le plafond, ces échanges étant grands par rapport à ceux par convection et conduction. L'écart de tempéra-

ture entre le produit le plus chaud et l'air peut atteindre 7 à 8° C. Ce réchauffement est spécialement néfaste pour les denrées animales réfrigérées ; la température du paquet le plus chaud peut être de +10° C quand l'air est injecté à 0° C et est repris à +4° C.

Le phénomène est semblable pour les meubles verticaux ou à étagères, malgré les deux ou trois rideaux d'air soufflé destinés à isoler les paquets exposés du milieu ambiant.

Les principaux remèdes consistent à emballer les produits dans une pellicule réflectrice de l'infrarouge lointain, c'est-à-dire un film d'aluminium et non du papier blanc, si cela est commercialement possible, et à réaliser un milieu réflecteur de l'infrarouge.

Pour les appareils horizontaux, il s'agit de surmonter l'ouverture d'un baldaquin de forme appropriée en aluminium pur (non anodisé). Le gain de température est d'environ 3° C avec l'emballage et du même ordre de grandeur pour le baldaquin. De plus, il convient de recouvrir l'ouverture d'un couvercle, si possible réflecteur, pendant les périodes de non vente. Pour les meubles à étagères, il faut les placer face à face et il serait bon d'installer un faux plafond en aluminium au-dessus de l'allée.

Les meubles verticaux fermés sont peu sensibles aux échanges radiatifs mais nettement aux transferts d'air lors de l'ouverture de la porte. Aussi, faut-il réaliser des portes de faible hauteur, les munir de joints étanches et minimiser la durée des ouvertures par un dispositif de rappel automatique. Cependant, en fin de journée de forte vente, le samedi notamment, la température des quelques paquets restant remonte de plusieurs degrés C, ce qui a peu de conséquences, ces meubles étant utilisés pour la vente des produits congelés ou surgelés. Pour limiter le réchauffement, il est bon de les maintenir correctement remplis.

Les meubles horizontaux fermés sont les plus sûrs mais ils sont considérés comme étant « moins vendeurs ». Ils sont adoptés par les magasins spécialisés pour produits surgelés.

Enfin, quel que soit le type de meuble d'exposition, il est bon de climatiser le magasin, de n'utiliser que des lampes froides, d'éviter les emplacements à fort courant d'air (près des portes) et la proximité des fenêtres.

Enfin, il est très important que les personnels sachent qu'il ne faut jamais surcharger les meubles et qu'il faut minimiser la durée des séjours en milieu chaud (déchargement des engins et réapprovisionnement des meubles). Un principe à respecter est « premier entré, premier sorti ».

La consommation

Le dernier maillon à risques de la chaîne du froid est celui de la consommation. Les risques peuvent être dus à une interruption de la chaîne de froid ou à une conservation anormalement prolongée des produits en réfrigérateur. Ils sont d'autant plus réels qu'aucun contrôle officiel ne peut être effectué.

Le seul véritable remède est de diffuser une information correcte concernant le choix et l'utilisation des réfrigérateurs et des congélateurs domestiques.

CONCLUSION

Toute technique, qui n'est pas financièrement rentable, est rapidement abandonnée.

Or, grâce au froid, les industries de l'agroalimentaire, en mettant sur le marché à des prix compétitifs des produits de plus en plus variés et élaborés, tendent à se substituer à la cuisine familiale. De ce point de vue, elles peuvent être assimilées à des industries de service de sorte que la chaîne alimentaire devient un outil « sur mesure » apte à satisfaire les multiples exigences des producteurs, des industriels et des commerces, ce qui implique une diversification des services logistiques à assurer en particulier par les professionnels du froid.

Les contraintes imposées pour la protection de l'environnement, tant planétaire que local, imposeront des modifications importantes dans la conception et la construction de machines très compactes, économes en énergie, peu bruyantes. La conception de ces équipements plus performants et leur exploitation moins coûteuse feront de plus en plus appel à l'informatique et aux systèmes modernes de télécommunication. Cependant, il demeure bien des inconnues concernant les fluides frigorigènes et les mousses isolantes, en particulier.

Devant la multiplication des réglementations nationales, européennes et internationales (il y a, en dehors des directives, 52 accords internationaux des Nations Unies pour les seuls transports de marchandises), les professionnels devront participer beaucoup plus activement qu'aujourd'hui à l'élaboration des textes, de sorte à ne pas être enfermés dans des « impasses techniques » ou se trouver en situation de concurrence déloyale.

BIBLIOGRAPHIE

[1] AN. — Accord relatif aux transports internationaux de denrées périssables et engins spéciaux à utiliser pour ces transports. *CEE-NU,* Genève, 1970.

[2] AN. — Conditions recommandées pour la conservation des produits périssables réfrigérés. *Inst. Inter. du Froid,* Paris, 1979, 148 p.

[3] AN. — Réglementation des conditions d'hygiène relatives au transport de denrées périssables. Arrêté du 1er février 1994. *JO* du 20 mars 1994.

[4] AN. — L'entreposage frigorifique public en 1997. *USNEF*, Paris, 1998, *715,* 5 p.

[5] AN. — Guide de l'entreposage frigorifique. *Inst. Inter. du Froid,* Paris, 1993, 209 p.

[6] AN. — Maîtrise de la chaîne du froid — Guide technique. *Ass. Franç. du Froid,* Paris, 1995, 120 p.

[7] AN. — Guide des bonnes pratiques logistiques — Denrées périssables et autres produits alimentaires en flux tendu. *ANIA, ANTRODEP, CFCA, CLTI, FCD, FFOCT, FNTR, GRDP, Transfrigoroute, UNOSTRA*, Paris, 7 fiches, avril 1996.

[8] Colin J. — La problématique du transport des produits alimentaires. *Rev. Gen. Froid,* 1996, *12*, 32-35.

[9] Gac A., Thevenot R. — Compétitivités technique et économique des procédés du froid appliqués aux productions alimentaires d'origine agricole. *Cahiers du CENECA. Le froid en agriculture,* Paris, 1977, 19 p.

[10] Gac A., Gautherin W. — Le froid dans les magasins de vente de denrées périssables. *Pyc Édition,* 1987, 160 p.

[11] Gac A. — L'amélioration technique des conditions de vente au détail des denrées périssables. *Bull. Acad. Vét. de France,* 1995*, 68*, 15-21.

[12] Gac A. — La chaîne du froid et l'effet de serre. *Rev. Gen. Froid*, 1996, *9*, 29-34 et 1996, *10*, 14-18.

[13] Gac A. — Les perspectives de développement de la logistique frigorifique. *Acad. Agri.*, 1999, sous presse.

[14] Gac A. — Optimisation de la conception et de la gestion des entrepôts frigorifiques. *Pyc Livres*, 2000, 200 p.

[15] Hirou M. — Enquête 1994 sur les coûts de revient. *Rev. Gen. Froid*, 1994, *12*, 37-42.

[16] Ollier C. — Le marché français des appareils ménagers. L'exportation soutient la production. *Rev. Gen. Froid,* 1998, 4, 24-27.

[17] Roger J.M. — Que représente le transport frigorifique routier en France. *Rev. Gen. Froid,* 1994, *12*, 34-35.

[18] Tanguy E. — Les plates-formes multimodales d'éclatement. *Rev. Gen. Froid,* 1994, *12*, 43-45.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 287-299, séance du 13 février 2001

Croissance microbienne et froid. Étude du cas particulier de *Listeria monocytogènes*

Microbiological growth and refrigeration Particular case of Listeria monocytogenes

Roland ROSSET *

RÉSUMÉ

Les micro-organismes comportent des espèces qui s'adaptent aux environnements les plus rigoureux ; c'est ainsi qu'en matière de froid la plus grande partie d'entre elles résistent aux très basses températures négatives (l'azote liquide à -169° C est idéale pour conserver les agents microbiens). Par ailleurs des germes qualifiés de psychrotrophes se multiplient fort bien entre 0° C et + 10° C. L'attention est attirée, parmi ceux-ci, sur Listeria monocytogènes*, contaminant fréquent des denrées alimentaires, qui est capable de provoquer des accidents graves par consommation d'aliments mal conservés (rupture de la chaîne du froid, réfrigérateurs ménagers mal utilisés). Des recommandations sont formulées pour éviter ces accidents, notamment chez des consommateurs fragiles tels que les immunodéprimés.*

MOTS-CLÉS : MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE. LISTERIA MONOCYTOGÈNES.

SUMMARY

Some of micro-organisms are able to adapt themselves to hardest environmental conditions. So, about cold conditions, most of them can still grow at very low temperatures under 0° Celsius (nitrogen liquefied at -169° C is the best way for preserving microbes). By another way some germs, qualified psychrotophic bacteria, grow quite easily between 0° C and + 10° C. Among these bacteria the author draw the attention to Listeria monocytogenes*, a germ contaminating often foodstuffs and being responsable of deep deseases by eating food preserved in bad conditions (breaking off of refrigeration chain, bad use of domestic refrigerators). Recommandations are laid down to avoid these deseases, more particularly for frail consumers as immuno compromised adults.*

KEY-WORDS (Index Medicus) : FOOD MICROBIOLOGY. LISTERIA MONOCYTOGENES.

* Membre de l'Académie nationale de médecine et de l'Académie Vétérinaire de France, Vice-Président de l'Association Française du Froid — 16, rue Bonaparte — 75272 Paris cedex 06.

Tirés-à-part : Professeur Roland ROSSET, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 10 janvier 2001, accepté le 15 janvier 2001.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 287-299, séance du 13 février 2001

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes (*L. m.*) est un contaminant fréquent des aliments capable de se multiplier à température comprise entre 0° C et +10° C (il est qualifié pour ce fait de psychrotrophe), et ce lentement mais significativement (passage de quelques unités par gramme à plusieurs milliers en 8-10 jours). Quoique non sporulé, il résiste, dans une certaine mesure, à la chaleur : une pasteurisation limite, type HTST du lait (72° C — 15 s), une cuisson ménagère classique sont insuffisantes pour le détruire. Il est également résistant au froid : il persiste pendant des mois, voire des années, dans ses repaires (sols, végétaux, matériel, ...) à des températures inférieures à +5° C. Evidemment la congélation n'a aucune action sur sa vitalité. Pathogène pour les animaux et pour l'homme, il entraîne chez les malades une mortalité voisine de 30 %. Ses maléfices imposent une connaissance sérieuse des conditions de contaminations et d'infections pour préconiser une prophylaxie efficace. Un facteur essentiel de sa multiplication est lié à la conservation des aliments contaminés pendant une durée « longue » (de l'ordre de 8 jours et plus) sous un régime de réfrigération insuffisant : rupture de la chaîne du froid amenant la température au-dessus de +5° C. Ce germe est d'autant plus dangereux qu'il ne provoque pas de modifications apparentes de l'aliment comme le font les agents d'altération, de putréfaction. Véritable hypocrite sournois, il trompe son monde en n'alertant pas le consommateur trop confiant.

Ce préambule justifie l'intérêt des hygiénistes, qui doivent et peuvent participer activement à la prévention de la listériose.

HISTORIQUE — LE GENRE *LISTERIA*

En 1926, au Canada, Murray, Webb et Swann décrivent 6 cas de mononucléose infectieuse chez le lapin et le cobaye et en rendent responsable un germe qu'ils nomment *Bacterium monocytogenes*. En 1927, Pirie, en Afrique du Sud, isole chez la gerbille, atteinte de la maladie de la rivière Triger, le même germe que Murray ; il le nomme *Listerella hepatolytica* en l'honneur de Sir John Lister, chirurgien anglais émule de Louis Pasteur [1].

En 1918, le premier cas humain est décrit par Dumon et Cotoni chez un soldat atteint de méningite. D'autres cas suivront en pathologie animale et humaine, avec en 1951 la première infection néonatale due au germe que l'on appellera *Listeria monocytogenes*. Par la suite des contaminations humaines d'origine alimentaire seront observées lors de véritables épidémies.

Indiquons que le genre *Listeria* comporte 6 espèces :

— 4 espèces pathogènes : *L. monocytogenes* (espèce la plus fréquemment observée) ; *L. welshimeri* (essentiellement chez le mouton) ; *L. seeligeri* ; *L. ivanovii ;*

— 2 espèces inoffensives : *L. innocua* ; *L. murrayi* (*L. grayi*).

De ces différentes espèces c'est *L. m.* qui est de loin le plus souvent responsable des listérioses humaines, notamment par ses sérovars 4b, ½ a et ½ b.

CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

Petit germe gram positif non sporulé, cilié, cultivant en aéro-anaérobiose, une faible quantité d'oxygène lui est nécessaire (il est qualifié de micro-aérophile). Comme tout microbe, sa multiplication passe par une première phase de latence (dite aussi lag-phase) pendant laquelle le nombre de germes reste stationnaire ; sa durée est fonction de la composition du milieu, de l'environnement, du pH, de la température, et ce de quelques heures à plusieurs jours ou semaines. Les hygiénistes cherchent à prolonger cette phase en imposant des conditions défavorables. Puis vient la phase de multiplication exponentielle qui amène le germe à des taux importants (10^3 à 10^7 par g), taux dangereux pour le consommateur. Les facteurs de la multiplication seront étudiés à propos des aliments. Cependant, dès maintenant, insistons sur le rôle de la température.

L. m. appartient au groupe des psychrotrophes [2], germes qui, bien qu'ayant un optimum de croissance au-dessus de 30° C, se multiplient encore, quoique lentement, entre +10° C et -1,5° C. Les psychrotrophes comportent, à côté de quelques espèces pathogènes provoquant des intoxications alimentaires ou des accidents pathologiques (Listériose, Yersiniose...), des espèces non pathogènes mais sources d'altération des aliments, entre autres la putréfaction des « frigos » observée sur des viandes maintenues en réfrigération pendant plusieurs jours (Pseudomonas...).

Cinq germes psychrotrophes pathogènes sont particulièrement intéressants :

— *Aeromonas hydrophila* (température d'arrêt de la croissance : +4° C voire 0° C),
— *Bacillus cereus* (type psychrotrophe) (+7,5° C voire 0° C),
— *Clostridium botulinum II* (type E pisciaire) (+3,3° C),
— *Listeria monocytogenes* (0° C voire -1,5° C),
— *Yersinia enterocolytica* (-1° C).

Le Tableau 1 indique pour *L. m.* les temps de génération (GT) nécessaires à une division ; il donne également la durée de la phase de latence (LT), et ce dans les viandes et à différentes températures [3].

L'isolement et le diagnostic de *L. m.* sont aujourd'hui rapidement effectués : 4 jours suffisent alors qu'il y a une dizaine d'années, 2 à 3 semaines étaient nécessaires.

TABLEAU 1. — Temps de génération (GT) et phase de latence (LT) de *Listeria monocytogenes* dans les viandes [2]

Aliment	Température (°C)	Temps de génération GT (h.)	Phase de latence LT (h.)
Rôti de bœuf	— 1,5 (a) 3 (a) 3 (b)	100,0 26,5 80,9	173,7 59,0 477,1
Conserve de bœuf (corned beef)	0	110,0	
Viande cuite	5	44-61	
Jambon	5 10 15	33,2 13,4 6,1	
Bœuf cuit	5 10	18,6 — 22,6 8,5 — 9,0	80,6 — 83,4 22,6 — 30,4
Pâté	7 10 12,5	19,7 9,12 1,6	48 27,6 24

(a) Emballage sous vide.
(b) Emballage sous atmosphère modifiée (CO^2).

PHYSIOPATHOLOGIE

Pouvoir pathogène chez l'homme

Le pouvoir pathogène de *L. m.* produit chez l'homme des formes distinctes : une forme périnatale et une forme non périnatale (Tableau 2) [4].

La forme périnatale (ou materno-natale) correspond à un cas où *L. m.* est isolée d'un site normalement stérile de la femme enceinte, du nouveau-né ou du fœtus, la mère et l'enfant comptant pour un seul cas.

La forme non périnatale englobe les cas ne répondant pas à la définition précédente.

Ces formes sont épidémiques ou non épidémiques (cas sporadiques). Les formes épidémiques se caractérisent par de nombreux cas avec émergence d'une souche appartenant à un même lysovar et au même pulsovar. Les formes sporadiques sont celles qui ne sont pas épidémiques, selon la définition ci-dessus.

La forme périnatale se manifeste par des symptômes évoquant une grippe (notamment fièvre, courbature chez la femme enceinte). Elle peut, dans les cas graves, se traduire par une interruption de grossesse, le plus souvent après le 3ème mois avec

TABLEAU 2. — Listériose humaine en France [4]
Nombre de cas, incidence des formes périnatales et non-périnatales

Année	Nombre total de cas	Incidence (par millions d'habitants)	Formes périnatales (%)	Formes non-périnatales (%)
1987	366	6,3	51	49
1988	397	7,1	43	57
1989	409	7,3	47	53
1990	305	5,4	36	64
1991	387	6,8	44	56
1992	457	7,9	34	66
1993	451	7,9	32	68
1994	336	5,9	22	78
1995	301	5,2	20	80
1996	220	3,8	27	73
1997	228	3,9	23	77
1998	230	3,8	20	80

mort de l'enfant. Lorsque la grossesse se poursuit, le nouveau-né présente une septicémie avec ou sans troubles méningés, une infection pulmonaire, une conjonctivite. L'enfant peut naître sain mais contaminé par la mère, succomber à 5 — 10 jours d'une méningite bactérienne.

Les formes non périnatales atteignant l'enfant ou l'adulte ont, après une incubation longue (3 à 70 jours), des manifestations neuro-méningées (avec une mortalité de 25 %) ou septicémiques (avec une mortalité de 30 à 70 %). Ce sont les personnes âgées et les immunodéprimés qui paient le plus lourd tribut à la septicémie.

Pouvoir pathogène chez l'animal

Un grand nombre d'espèces animales sont sensibles à *L. m.*, que ce soit des mammifères domestiques (bovins, ovins, caprins, porcins, lapins), des oiseaux (poulets) ou des animaux sauvages (gibier). Il s'agit de septicémies, de formes nerveuses (encéphalites), d'avortements, mais aussi de symptômes bénins laissant les sujets atteints en bonne santé apparente mais porteurs et excréteurs de *L. m.*, notamment par les fèces. L'excrétion par le lait lors de mammites apparentes ou occultes est particulièrement dangereuse pour le consommateur.

REPAIRES DE *LISTERIA MONOCYTOGÈNES* SOURCES DES BACTÉRIES

L. m. est ubiquitaire, en fait elle peut être présente dans tout l'environnement (air, eau, sol, poussières), végétaux, animaux (en particulier dans leur tube digestif, donc dans les matières fécales, le lisier, le fumier, les épandages).

L. m. contamine également l'homme sain porteur de germes chez lequel on a montré que jusqu'à 80 % des matières fécales pouvaient héberger *L. m*. On retiendra ainsi que *L. m.* est un hôte normal de l'intestin de l'homme et de l'animal. On conçoit l'importance de ce fait, qui rend difficile la prophylaxie.

L. m. peut contaminer les pâturages, les fourrages, les ensilages et tous les végétaux, notamment ceux qui sont en contact avec le sol (asperges, champignons, choux, salades...). Sa résistance dans le sol est considérable, il peut y subsister plusieurs années. La contamination des produits animaux est également fréquente, aussi bien celle des produits « crus » (lait, viande, poissons) que des produits cuits lorsque le procédé de cuisson a été « doux ». La recontamination des aliments assainis, notamment par la chaleur, peut s'effectuer si la protection et le conditionnement sont insuffisants (surfaces et plans de travail des ateliers de transformation ayant une hygiène défectueuse).

Citons le cas particulier d'une vache ayant une mammite à *L. m.* Son lait peut avoir un aspect normal et être contaminé très longtemps (plusieurs mois) sans signe apparent. La contamination peut s'étendre par dilution aux laits de mélanges, rendant la pasteurisation classique inefficace. Les *L. m.* étant le plus souvent intra-leucocytaires sont de ce fait protégées contre le chauffage et leur destruction nécessite une surpasteurisation (78-80°C — 1 à 2 min.). Des épidémies ont ainsi été produites par du lait entier ou écrémé, chocolaté, par des fromages frais à base de lait « cru » ou mal pasteurisé.

Si la contamination est faible dans les aliments au moment de leur production (moins de 1 ufc /g par exemple), elle peut atteindre des taux considérables au moment de la mise en consommation si la durée de conservation est longue et/ou la température trop élevée (supérieure à +5° C : le passage prolongé de +5 à +10° C multiplie par 2, voire plus, la vitesse de reproduction).

Modes de contamination

La voie directe par contact avec un animal infecté est possible mais rare, tout comme la voie interhumaine (maternités, hôpitaux). En revanche c'est la voie indirecte qui est la plus fréquente, comme nous l'avons indiqué précédemment (milieu extérieur, sécrétions, excrétions animales, membranes fœtales, fèces). Mais ce sont les aliments qui sont les transmetteurs essentiels de la bactérie, la dose infectieuse *minima* est mal connue, dépend de l'aliment et du consommateur (vraisemblablement supérieure à 10 ufc /g).

***Listeria monocytogènes* et aliments**

Une suspicion générale s'impose vis-à-vis de tous les aliments non chauffés ou insuffisamment chauffés. Cependant divers facteurs peuvent s'opposer à la multiplication de *L. m.*, voire détruire la bactérie.

— pH : Culture arrêtée à pH inférieur à 4,5 (parfois pH 5,6 est suffisant). Les aliments conservés en milieu acide sont sans danger (vinaigre, ...).

— Humidité relative, Aw : *L. m.* est arrêtée dans sa croissance pour une Aw inférieure ou égale à 9,3. La conservation par le sel nécessite une concentration minimale de 10 %.

— Qualité de l'atmosphère environnante : *L. m.* est micro-aérophile, c'est dire que les conditionnements en atmosphère modifiée sont peu efficaces ; le CO^2 à plus de 20 % a cependant un rôle inhibiteur partiel.

— Substances antimicrobiennes : les molécules classiques sont efficaces : lactate, nitrate, propionate, benzoate, sorbate, formol (fumage), bactériocines naturelles...

— Associations microbiennes : les lactiques sont efficaces. Retenir que la présence de germes susceptibles de concurrencer *L. m.* est un facteur limitant intéressant. L'absence de germes, l'état aseptique facilitent la croissance lors de recontamination.

— Température de stockage : nous avons bien indiqué que *L. m.* est un psychrotrophe, ce qui signifie que la conservation des aliments doit s'effectuer rigoureusement au froid, et plus précisément à température proche de 0° C, et de toutes façons inférieure à +5° C pendant toute la chaîne du froid. On sait que c'est le dernier maillon, celui du consommateur, qui est le plus fragile (température du réfrigérateur ménager fréquemment à +7 / +9° C). On notera qu'un stockage à +5° C ne doit pas être prolongé plus de 10 jours, alors qu'à 8-10°C on ne dépassera pas 5 jours pour avoir une certaine sécurité.

Le recours raisonné à ces divers facteurs permet de limiter la croissance de *L. m.* (application du système multibarrière) et d'accroître la sécurité des aliments.

Le Tableau 2 relatif à l'épidémiologie de *L. m.* montre qu'une variété très grande d'aliments a provoqué des épidémies, retenons quelques cas [1] :

— produits végétaux (choux en salade, riz en salade) ;

— viande et produits carnés : intoxications fréquentes ;

La viande crue est très souvent contaminée ; se méfier de la viande hachée mal conservée (à température trop élevée) consommée sans cuisson ou après cuisson insuffisante. Fréquemment donnée à des jeunes enfants ou à des personnes âgées, elle peut être source d'intoxication ;

— produits carnés : les produits de charcuterie à cuire ou séchés (saucissons secs) ont une faible contamination et ne présentent pas de danger réel. En revanche,

les produits de charcuterie à consommer en l'état et ceux qui peuvent être recontaminés (produits à la coupe) puis conservés à température inadéquate (+7 / +10° C) ont provoqué des listérioses souvent mortelles (pâtés, saucisses, langue en gelée, rillettes) ;

— poissons et produits de la mer : ils ont rarement été impliqués, cependant on a observé des listérioses provoquées par des moules, des truites mal salées, mal fumées ;

— lait, produits laitiers, fromages : *L. m.* est un contaminant fréquent du lait cru (1 à 9 % pollué). Soit par excrétion mammaire (mammite à *Listeria*), heureusement assez rare mais provoquant un contage prolongé. Soit par voie extra-mammaire : l'origine se trouve alors dans les poussières des aliments (surtout s'ils sont ensilés), l'eau, les fèces. La pasteurisation, pour être efficace, nécessite un barème de 73° C pendant 20 secondes. La thermisation (57° C à 62° C) est en revanche insuffisante [5] ;

— fromages : ils sont à l'origine de listérioses sévères. Heureusement *L. m.,* contaminant fréquent du lait et pollueur non moins fréquent des ateliers, est détruit progressivement dans les fromages du fait de l'acidité ; par ailleurs les flores associées sécrétrices de bactériocines retardent ou empêchent la multiplication des *L. m.* des fromages au lait cru. Signalons que la thermisation qui détruit cette flore associée en respectant *L. m.*, est maléfique puisqu'elle laisse *L. m.* se multiplier sans concurrence [6].

Les normes proposées par le *Codex Alimentarius* imposent l'absence de *L. m.* dans 25 g, mais le Conseil Supérieur d'Hygiène publique tolère une présence limitée à moins de 100 ufc/g au moment de la consommation.

Les examens microbiologiques sont absolument insuffisants pour assurer la sécurité des aliments car il serait nécessaire d'analyser un nombre considérable d'échantillons : déceler une proportion de défectueux de 0,1 % dans un lot avec 95 % de chance de réussite impose l'analyse de 2 000 échantillons... ceci est évidemment impossible, d'où les mesures impératives de prévention et l'application en particulier du système HACCP.

PATHOGÉNIE — IMMUNITÉ [7]

L'immunité est acquise par une infection clinique ou subclinique à la suite de la formation non pas d'anticorps, comme c'est le cas dans la majorité des atteintes microbiennes, mais par la création de lymphocytes T protecteurs à longue vie. Chez les immunodéprimés ces lymphocytes et les macrophages sont ou détruits ou en faible nombre d'où la sensibilité des immunodéprimés à l'agression par *L. m.* On comprend comment la résistance peut être acquise lentement par renforcement spécifique du système immunitaire succédant à l'introduction fréquente de *L. m.* présentes à très faible dose dans les aliments et dans l'environnement. La consom-

mation d'aliments stériles, si elle évite l'infection, ne permet pas de renforcer nos défenses.

EPIDÉMIOLOGIE

La fréquence en France de la listériose humaine épidémique est aujourd'hui faible. On peut l'apprécier par l'examen du Tableau 3. Après les flambées importantes de 1992 (276 cas) et de 1993 (38 cas) la mise en œuvre d'un réseau épidémiologique bien structuré et d'un système d'alerte efficace a permis de diminuer le nombre des sujets atteints. L'incidence par million d'habitants (3,8 — 3,9) se situe en dessous de l'incidence mondiale [4].

Depuis 1995, on observe moins de 300 cas par an, avec 1 à 2 % de mortalité. La diminution du nombre total de cas est spectaculaire : 457 cas en 1992, 230 en 1998, 36 en 1999 [3].

PROPHYLAXIE — RECHERCHES À ENTREPRENDRE [8-10]

La prophylaxie de la listériose est difficile et nécessite rigueur et volonté.

Le respect des 10 points suivants est impératif :

1. Choix de l'alimentation animale :
   - — la listériose est considérée comme une maladie liée à l'ensilage des aliments des animaux ;
   - — écarter celui-ci lorsque les matières premières (lait, viande) sont destinées à fabriquer des produits à risques.
2. Matières premières utilisées sans chauffage :
   - — améliorer les méthodes d'assainissement ;
   - — mise au point de traitement de substitution : ionisation, recours aux anti-microbiens naturels, aux acides organiques...
   - — lait cru : recours à la microfiltration, aux pressions ultra-hautes, aux flores barrières associées.
3. Procédé industriel de fabrication rigoureux :
   - — appliquer les procédés de l'HACCP ; veiller à une formation continue du personnel ; respecter les règles des guides de bonnes pratiques hygiéniques (GBPH), contrôler avec soin le nettoyage et la désinfection...
4. Maîtrise absolue de la « chaîne du froid » :
   - — la contamination et la multiplication peuvent se réaliser chez et par le consommateur ;
   - — tous ses maillons, dont celui du consommateur, doivent être solides ;

TABLEAU 3. — Epidémies de listérioses d'origine alimentaire [3].

Pays	Année	Nombre de cas		Dont décès	Aliments
		total (*)	Epidémiques		
France	1975		> 100		
USA (Massachussets)	1979		20	5	légumes crus , lait
Canada (Nouvelle Ecosse)	1981		41	18	choux en salade
USA (Massachussets)	1983		49	14	lait pasteurisé
USA (Californie)	1985		142	48	Fromage frais mexicain
Suisse (canton de Vaud)	83-87		122	34	fromage frais Vacherin, Mont d'Or
France	1987	366			
Royaume Uni	88-89		> 300		Pâté
France	1988	397			
France	1989	409			
France	1990	305			
Australie	1990			6	Pâté
France	1991	387			
Nouvelle Zélande	1992	4		2	moules fumées
France	1992	457	276	85	langue de bœuf en gelée
France	1993	451	38		Rillettes
Italie	1993		18		riz en salade
France	1994	336			
USA (Illinois)	1994	66			lait chocolaté pasteurisé
Suède	1994		8	2	truite fumée
France	1995	301	37	4	Fromage : Brie de Meaux
France	1996	220	10		
France	1997	228	14		Fromage : Livarot, Pont l'Evêque
Italie	1997	1594			maïs
France	1998	230	20		Fromage : Epoisses
USA	1998	325	70	> 10	Saucisses (hot dog)
France	1999		36	2	rillettes [6], charcuterie [30]

(*) Nombre de cas total = cas épidémiques et sporadiques.

5. Méfiance pour les produits non stériles conservés longtemps et/ou consommés sans cuisson ;
   - — limiter DLC (date limite de consommation) et DLUO (date limite d'utilisation optimale) ;
   - — veiller à éviter les recontaminations ;
   - — des études de microbiologie prévisionnelle concernant l'évolution des produits sont à entreprendre.
6. Développer des recherches sur les mécanismes de virulence et d'immunité.
7. Réaliser des enquêtes épidémiologiques précises. Respecter les mesures de déclaration obligatoire (application du décret du 13 mars 1998). Organiser le réseau de surveillance.
8. Entreprendre des recherches pour formaliser des méthodes de détection et de dénombrement rapides de *L. m.* et d'un coût modéré.
9. Informer le consommateur « normal » et les personnes fragiles en recourant à tous les moyens.

   « Interdire » la consommation de produits à risques aux « immunodéprimés » (jeunes ; personnes âgées ; femmes enceintes ; patients atteints d'hémopathies, de cancer, de diabète, malades traités en vue de transfert d'organes ; hémodialysés ; alcooliques ; malades atteints du SIDA).

   Informer les consommateurs des règles à respecter en hygiène alimentaire.

   Rappeler les conditions d'utilisation rationnelle des réfrigérateurs ménagers. Lorsqu'elles sont mauvaises, ceci peut être dû à plusieurs facteurs (prendre toutes les dispositions pour y remédier) :
   - — l'absence de notice précise ; les niveaux de température sont souvent inconnus ; la position de la zone la plus froide, qui varie avec le type d'appareil, n'est généralement pas précisée ;
   - — l'absence de thermomètre est très fréquente, tandis que les indications fournies par le thermostat ont souvent peu de relation avec les températures réelles ;
   - — la charge abusivement élevée des appareils gène la circulation de l'air ;
   - — l'introduction, dans le réfrigérateur, de denrées insuffisamment refroidies voire chaudes ;
   - — l'ouverture des portes est trop fréquente ;
   - — l'entretien et l'hygiène des appareils (dégivrage, nettoyage, désinfection) sont insuffisants.
10. Impliquer tous les acteurs (dont l'Administration) et sensibiliser les hygiénistes et les professionnels de la santé (médecins en particulier) ainsi que le public.

    Prendre garde à la « psychose » et aux répercussions sociales et économiques associées à une information mal contrôlée.

CONCLUSION

La température est un facteur dominant de la croissance microbienne : son abaissement en dessous de +10° C permet de prolonger la durée de conservation de tous les aliments. Cependant la réfrigération ainsi appliquée ne fait que stopper la croissance de certains germes tout en ralentissant celle d'autres qualifiés de psychrotrophes ; parmi ceux-ci se trouvent des germes d'altération (« dangereux » pour les aliments) et des germes pathogènes (« dangereux » pour l'homme). Ces derniers sont responsables de toxi-infections alimentaires et d'accidents graves, notamment *Listeria monocytogenes* agent de la listériose. Pour limiter la multiplication de *L. m.,* contaminant fréquent de nos denrées, des recommandations sont formulées. Elles concernent tout particulièrement le maintien de la « chaîne du froid » à une température voisine de 0° C, et ce jusque chez le consommateur lui-même. L'utilisation irrationnelle des réfrigérateurs domestiques étant une cause essentielle de la croissance ultime de *L. m.*, des conseils sont énoncés pour accroître la sécurité alimentaire.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Carlier V., Bolnot F.H. — *Listeria monocytogenes* et listériose. *Bull. Soc. Vét. Prat. de France,* 2000*, 84, 3,* 143-156.

[2] Rosset R. — Sécurité alimentaire et froid, le problème des psychrotrophes. *Rev Gén. du froid*, 1993, *934,* 16-18.

[3] Ryser E.T., Marth E.M. — Listeria Listeriosis and food safety. New-York : Dekker Ed., 1999, 1 vol, 644 p.

[4] Jacquet Ch., Brouille F., Saint-Cloment C., Catimel B., Rocourt J. — La listériose humaine en France en 1998. *BEH,* 1999*, 37,* 153-158.

[5] Vœu de l'Académie d'Agriculture de France. — Appellation " Lait cru ", 2000.

[6] Catteau M. — *Listeria monocytogenes* un problème de méthodes d'analyse ? *Bull. Soc. Fr. Microbiol.,* 1999*, 14 [2],* 99-101.

[7] Audurier A., Berch P. — *Listeria in* Le Minor L., Veron M. — Flammarion Ed., 2ème édit, 1990*,* 844-857.

[8] Tubiana M. — Alimentation et cancer. *Bull. Acad. Natle Méd.,* 1998*, 182*, 1887-1897.

[9] Anonyme. — Maîtrise de la chaîne du froid des produits carnés réfrigérés. *CEMAGREF AFF, Guide technique*, 1999*, 1 vol.,* 108 p.

[10] Rosset P., Rosset R. — La « pathologie » du réfrigérateur. *Rev. Gén. du Froid,* 2000*, 1000*, 71-73.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 287-299, séance du 13 février 2001

DISCUSSION

M. Pierre DELAVEAU

La résistance au froid des bactéries est-elle liée à leur constitution génétique ? Peut-il y avoir adaptation au cours du temps ?

Toutes les bactéries sont résistantes au froid et ceci grâce au leur structure cellulaire et, en particulier, à celle de leur membrane. En revanche, leur aptitude à s'adapter à leur environnement et à se multiplier à différentes températures (élevées ou basses) dépend de leur équipement enzymatique élaboré par leur potentiel génétique, par ailleurs très hétérogène d'une souche à une autre. *L. monocytogènes* a ainsi des facultés d'adaptation exceptionnelles se manifestant après des séjours à différentes températures.

M. Jacques EUZÉBY

Approuvez-vous l'interdiction de l'utilisation du lait cru pour la fabrication des fromages ? Y a-t-il, dans le lait cru, une interaction entre ferments lactiques et listeria pathogènes : les ferments lactiques inhibent-ils les listeria ?

L'utilisation du lait cru pour la fabrication de certains fromages permet de bénéficier de l'élaboration de produits aromatiques très appréciés. Ces produits sont formés par une microflore qui est détruite au chauffage ; mais qu'en est-il des germes pathogènes ? leur persistance (entre autres celle de *L.m*) n'est en réalité le plus souvent que très partielle, détruits qu'ils sont par les bactériacines, les systèmes lacto-peroxydases initiés par les flores persistantes. *Lacto bacillus, Pédiococcus, Lactococcus*.... Cependant, pour quelques fromages, la résistance de *L.m* peut être manifeste (surtout si elles sont en grand nombre) et présenter un certain danger pour des immunodéprimés ; ceux-ci devraient s'abstenir de les consommer. En conclusion, les ferments lactiques ont donc un certain pouvoir inhibiteur sur *L.m*.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 301-310, séance du 13 février 2001

Chaîne du froid — Concept de traçabilité — Applications pratiques

The cold chain — The traceability concept — Pratical applications

André GAC*, Maurice-Paul DURAND**

RÉSUMÉ

La traçabilité permet de suivre l'évolution des qualités d'un produit alimentaire et, en particulier, sa salubrité. A partir de la notion de trépied frigorifique d'André Monvoisin, on examine les conditions de mise en œuvre de la chaîne du froid, produit sain, froid précoce, froid continu. Puis on présente deux théories, la théorie TTT et la théorie PPP. A propos des ruptures de la chaîne du froid au niveau des réfrigérateurs domestiques, après avoir rappelé les souhaits de l'Académie de médecine et du Centre national de la Consommation, sont examinés les moyens de contrôle pratique (mouchards) pour le réfrigérateur et pour les produits. Les différents indicateurs et intégrateurs sont présentés avec leurs limites. Les intégrateurs, temps — température sont plus largement examinés. La conclusion souligne la nécessité de rétablir la confiance des consommateurs rendus méfiants par les dernières crises alimentaires.

MOTS-CLÉS : FROID. INDUSTRIE ALIMENTAIRE.

SUMMARY

Traceability makes it possible to monitor the properties of a foodstuff in general and its safety in particular. Based on the « refrigerated trio » concept developed by André Monvoisin, cold chain implementation conditions are examinated, with emphasis on the following three aspects, a safe product and early and continuous application of refrigeration. The TTT and PPP theories are presented. Following an overview of the French Academy of Medecine and the National Consumer Centre's recommendations, non compliance with the cold chain at household refrigerator level is discussed along with control equipment for refrigerators and products. Various indicators and integrators are presented and their described. Time-

* Directeur honoraire de l'Institut International du Froid, Membre de l'Académie d'Agriculture de France.

** Correspondant de l'Académie nationale de médecine.

Tirés-à-part : Professeur André GAC, 65 bld Exelmans — 75016 Paris.
Article déposé le 13 février 2001.

temperature integrators are examined in depth. In the conclusion, the authors stresse the need to restore consumer confidence following recent foof-safety scares.

KEY-WORDS (Index Medicus) : COLD. FOOD INDUSTRY.

CHAÎNE DU FROID — CONCEPT DE TRAÇABILITÉ

La traçabilité est définie comme la possibilité de suivre un produit aux différents stades de sa transformation et de sa commercialisation, en particulier dans les filières alimentaires. Elle est fondée sur deux concepts, le concept « évolution de la qualité » d'une denrée et le concept « historique », c'est-à-dire connaissance des durées de chaque étape de son utilisation.

Le terme qualité regroupe trois familles de caractéristiques, les caractéristiques hygiéniques, nutritionnelles et sensorielles. Un produit peut être sain et avoir mauvais goût, comme cela est le cas d'une viande traitée par rayonnement ionisant, ou être toxique tout en ayant un aspect et une saveur agréables, ce qui arrive quand une crème glacée est fabriquée dans des récipients mal lavés.

Si les consommateurs ont de tout temps privilégié la satisfaction gustative, ce n'est que relativement récemment qu'ils ont pris en considération les propriétés nutritionnelles et l'équilibre diététique de leur alimentation. Aussi, on pourrait regrouper sous le terme de caractéristiques commerciales ces deux types de propriétés.

En revanche, l'État est responsable de la santé publique. Il a le devoir de contrôler la chaîne alimentaire de sorte à garantir l'absence de toxicité de tous les produits remis aux consommateurs. Il fixe et impose les conditions à respecter selon la fragilité des substances. Il exige de tous les opérateurs de la chaîne alimentaire d'être en mesure de fournir l'historique d'une denrée, de sa production à la vente au détail. Enfin, il intervient chaque fois qu'il y a des accidents alimentaires graves.

Mais aujourd'hui, sensibilisés par les médias, les consommateurs ont pris conscience des risques et dangers dus à des négligences ou à des erreurs commises par l'un des opérateurs de la chaîne alimentaire. Ils désirent également, selon le principe de transparence, connaître les caractéristiques des aliments qu'ils achètent. Aussi, les producteurs ont l'obligation de fournir diverses informations. Actuellement, ces informations, telles que composition, origine, mode de préparation, date limite de conservation ou de consommation, ... doivent être inscrites sur l'emballage pour les denrées préemballées. Récemment l'Académie nationale de médecine a recommandé que certaines informations essentielles, comme la température et la durée de conservation, soient également indiquées aux acheteurs pour les denrées fraîches d'origine animale non préemballées, comme les viandes coupées à la demande.

Bien entendu, les interventions de l'État et les obligations qu'il impose dépendent de la nature des produits ainsi que des traitements éventuels qu'ils ont subis.

Globalement, les produits alimentaires peuvent être classés en deux grandes catégories, les denrées périssables et les produits de l'épicerie sèche.

Les denrées périssables sont des substances alimentaires dont les caractéristiques hygiéniques et (ou) commerciales sont préservées plus longtemps quand elles sont maintenues à une température définie, différente et le plus souvent inférieure à celle de l'ambiance.

Leur commercialisation implique l'utilisation correcte de la chaîne du froid, ce que André Monvoisin a défini, de façon imagée, par l'expression de « trépied frigorifique », c'est-à-dire Produit sain, Froid précoce, Froid continu.

Produit sain

De façon très générale, le froid n'améliore pas les qualités d'un produit. Un fruit blessé, une viande avariée sont davantage altérés après un séjour au froid. Une des rares exceptions où le froid élimine une contamination est la désinfection des viandes ladres. Les parasites sont tués par la congélation dans un délai d'autant plus court que la température est plus basse.

L'absence d'effet de stérilisation par le froid impose que, dès la production, les règles strictes d'hygiène soient scrupuleusement observées tant dans les ateliers et locaux que par le personnel. Bien entendu, il peut se produire des manquements, dus à des pannes de machine de production de froid ou d'alimentation en électricité, ou à des contaminations microbiennes accidentelles. Il peut arriver que les matières premières utilisées soient à l'origine d'une contamination. Cependant, le risque au stade de la production est limité, à la fois en raison de la compétence des responsables, de la fiabilité des équipements, de la brièveté des traitements des produits, de la conception et de la fréquence des nettoyages des locaux ainsi que de la généralisation de la mécanisation qui diminue le nombre des interventions humaines. Bien que l'on connaisse mal l'impact des opérations industrielles sur le risque d'intoxication, on estime que la cause de ces accidents alimentaires est de l'ordre de 3 à 5 %.

Froid précoce

Tout retard au refroidissement réduit le temps de commercialisation et d'utilisation d'une substance alimentaire périssable. Aussi, les traitements préalables au traitement frigorifique comme le blanchiment des légumes, le désossage et le pièçage des carcasses, le filetage des poissons doivent être effectués rapidement et le plus tôt possible. La congélation des poissons à bord des bateaux est un facteur de qualité, spécialement pour les poissons gras.

Cependant, il existe quelques exceptions. Par exemple, la quasi-totalité des produits conservés à basse température sont congelés sans délai sauf pour la viande de bœuf qui resterait dure. C'est pourquoi, les carcasses sont maturées par un

entreposage en chambre froide à +4° C pendant une à deux semaines préalablement à la congélation, de façon à développer un état de tendreté.

Froid continu

Il est bien établi que la chaîne du froid doit être ininterrompue.

Les denrées périssables sont le siège de multiples phénomènes d'altération, qui peuvent être des réactions biochimiques, une évolution physiologique ou la prolifération de germes microbiens. De façon très générale, la loi de l'action du froid sur ces phénomènes biologiques est celle de Van't'off ou encore celle du Q10. La constante du Q10 est une caractéristique de chaque type de phénomène, qui, dans une plage relativement étroite de température, est comprise entre 2 et 20. Ainsi, les pommes de terre et les châtaignes deviennent sucrées après quelques mois au froid, parce que l'hydrolyse de l'amidon en saccharose est plus rapide que la combustion des sucres par la respiration. A la température ambiante, le phénomène est inversé. La saveur sucrée disparaît rapidement.

Pour caractériser le comportement au froid d'une denrée, il faut choisir une réaction qui soit représentative de son évolution globale. Par exemple, pour les fruits réfrigérés, on adopte la relation de l'intensité respiratoire en fonction de la température, dont le Q10 est de l'ordre de 3 à 3,2. Pour les congelés et surgelés, les phénomènes représentatifs de leur état sont des changements de qualités organoleptiques, ce qui justifie l'importance de l'analyse sensorielle [1].

La préservation d'une denrée au froid est d'autant plus prolongée qu'elle est maintenue de façon permanente à la plus base température tolérée par la denrée. Cette température, ou température requise, est de l'ordre de -20°C pour toutes les substances congelées et surgelées, un peu plus basse pour les crèmes glacées. Les denrées réfrigérées sont conservées à une température supérieure à leur température cryoscopique ou congélation commençante, qui est de -1,1° C pour les produits animaux, et qui est comprise entre -1,5 à -5° C pour les végétaux. En pratique, les viandes et les poissons sont conservés vers 0° C, alors que les fruits et légumes, qui sont des organes vivants, peuvent être atteints d'accidents physiologiques, les maladies du froid, au-dessous d'une température critique. Selon les espèces et les variétés, cette température est comprise entre 0 et +16° C.

Au cours de leur commercialisation, les denrées ne peuvent pas être maintenues rigoureusement en permanence à la température requise. Il existe des risques de ruptures de la chaîne du froid, qui se situent principalement durant les phases terminales de la commercialisation, c'est-à-dire les livraisons, la vente au détail et le séjour en réfrigérateur.

Dans l'entrepôt industriel des producteurs, la température est correctement contrôlée et les risques de réchauffement sont très limités. Il en est de même pour les transports de masse, en engins frigorifiques gros porteurs, comme des semi-remorques, à condition que les lots soient palettisés et qu'ils ne séjournent pas en

milieu non refroidi, que les manutentions soient mécanisées, que la caisse soit en bon état et, surtout, que la distribution de l'air intérieur soit homogène, ce qui n'est pas toujours le cas.

La théorie TTT

L'objectif de la chaîne du froid est de faire en sorte que, pour un coût minimal ou du moins acceptable, les consommateurs disposent du plus grand délai possible d'utilisation de denrées périssables de bonnes qualités hygiéniques, nutritives et sensorielles.

Or, comme chaque produit périssable a un comportement au froid spécifique, il est clair que, selon la succession des températures auxquelles il a été soumis, son délai de consommation peut être plus ou moins réduit.

C'est pourquoi, il est utile de connaître la relation temps/température caractéristique de chaque denrée [2]. Cette relation, qui a été étudiée à l'université d'Albany à propos de la préservation des qualités sensorielles des denrées congelées, est connue sous le sigle TTT (Time, Température, Tolérance). Entre -5 et -20°C, elle est représentée par une droite en coordonnées semi-logarithmiques temps-température. En-dessous de -20°C, la durée de stockage est peu augmentée. Connaissant la relation TTT d'un produit, on peut déterminer la durée résiduelle de son utilisation à partir de l'historique des conditions antérieures de stockage.

Cette même théorie peut être appliquée aux denrées réfrigérées, encore que son intérêt soit moindre en raison de la relativement faible durée totale de commercialisation de ces denrées.

La théorie PPP

Le concept PPP (Product, Process, Packaging,) est apparu plus récemment. Il met en évidence l'importance de l'emballage et du conditionnement des paquets en fonction de la nature des produits et des traitements auxquels ils ont été soumis.

Le matériau d'emballage, qui est en contact direct avec la substance, est souvent un film plastique qui ne doit engendrer aucune toxicité. Il doit être de qualité alimentaire et chimiquement neutre. Son rôle peut être passif. Il protège les denrées contre les souillures et les contaminations qu'elles peuvent subir au cours de leur commercialisation et réduit leur perte de masse. Pour les produits congelés, il est souhaitable que le film soit plaqué sur la substance, de sorte à limiter l'apparition du givre et à éliminer l'air.

Le conditionnement est un sur-emballage, la plupart du temps en carton, servant de support informatif et publicitaire. Il protège les denrées des chocs et écrasements.

Aujourd'hui, on tend à adopter des emballages actifs, dits aussi fonctionnels [3]. Ils sont adaptés à chaque type de produit alimentaire. Ils peuvent prolonger la durée de

la conservation commerciale sans refroidissement ou avec un traitement frigorifique modéré, comme c'est le cas des semi-conserves. Le sachet peut être refermé, permettant, ainsi, la cuisson sous vide ou en four à micro-ondes ou encore une pasteurisation par irradiation ionisante. Par incorporation d'un additif ou même par greffages chimiques de molécules, ces emballages peuvent être sensibles aux changements indésirables de la composition du milieu gazeux interne ou encore à l'apparition de contaminations microbiennes. Ils peuvent aussi dégager de façon lente et progressive des vapeurs antiseptiques prolongeant la durée de l'état de salubrité d'une denrée. Ils peuvent aussi signaler les conditions antérieures de conservation (pastilles intégrant les facteurs temps/températures).

APPLICATIONS PRATIQUES

Tous les traitements, les équipements et les moyens de contrôle mis en œuvre à l'amont du réfrigérateur ménager contribuent à limiter les risques d'altération des produits périssables et à préserver l'ensemble de leurs propriétés sensorielles. Cependant, le principal point faible est le dernier maillon de la chaîne du froid qui est sous la seule dépendance des consommateurs.

Les souhaits officiels

L'Académie de médecine s'est émue de cet état de fait à la suite de récents incidents listériens sur des produits de charcuterie où il est apparu qu'un produit correct au départ pouvait se trouver fortement contaminé lors d'une mauvaise utilisation du réfrigérateur. Dans son communiqué en date du 14 mars 2000, l'Académie soulignait

- La nécessité d'intensifier les recherches en vue de la mise au point de dispositifs permettant de s'assurer que la chaîne du froid n'a pas été rompue.
- La nécessaire information du consommateur sur les règles d'utilisation : éviter les produits chauds, les surcharges, nettoyage régulier, répartition spatiale en fonction des produits.
- Nécessité d'équiper les réfrigérateurs neufs d'un thermomètre à lecture visible si possible de l'extérieur et d'un compartiment dont la température sera maintenue entre 0 et 4° C.
- De même, un rapport émanant du Centre National de la Consommation soulignait un besoin croissant du consommateur d'être objectivement informé sur les produits et une exigence accentuée concernant la sécurité. En particulier les auteurs de ce document souhaitent disposer de témoins visibles les assurant du respect de la chaîne du froid et voudraient voir se généraliser des dispositifs du type « pastille fraîcheur » assurant l'absence de rupture de la température de conservation.

Les moyens de contrôle de rupture de la température de conservation

Il existe 3 types de contrôle :

- l'indicateur réversible, l'indicateur récupère sa couleur initiale lorsque la température est redescendue au-dessous du seuil maximal toléré ;
- l'indicateur irréversible : le changement de couleur est irréversible même si la température du produit est redevenue convenable ;
- l'indicateur temps-température : qui prend en compte les excès thermiques du produit et la durée de ceux-ci.

Les contrôles se font :

Au niveau du réfrigérateur

Outre l'examen régulier de la température, des « mouchards » sont proposés : ainsi un poisson en plastique plongé dans un verre d'eau dont la couleur verte de l'œil vire au noir réversible lorsque la température dépasse + 4° C. Tout récemment, la société Datitia a mis au point des encres qui changeraient de couleur à diverses températures, ces changements sont également réversibles. On pourrait apposer ces timbres aux différents étages du réfrigérateur.

Au niveau du produit

Tous ces indicateurs sont appliqués à la surface du produit à surveiller et sont en général des dispositifs jetables. Ils se subdivisent en diverses catégories :

Les indicateurs temps-température critique indiquant que le produit a été exposé à une température supérieure à la température de référence. Aucun d'entre eux ne relate l'historique de cette surexposition thermique. Nous en connaissons au moins cinq de ce type.

Les enregistreurs de température jetables

Les systèmes basés sur l'indication directe de la température (Datitia)

Pour un coût minime, une encre est imprimée sur l'étiquette du produit, le changement de couleur qui est réversible, s'opère lorsque la température maximale programmée est dépassée. La précision serait de ± 0,5°, des indicateurs irréversibles sont également à l'étude.

Les intégrateurs temps-température

Ce sont de bons outils qui répondent au vœu émis par le Centre National de la Consommation.

Parmi les différents systèmes :

- certains mettent en jeu la fusion d'un réactif et sa diffusion au-dessus d'une température déterminée, d'autres mesurent le changement de pH et de couleur

d'un substrat lipidique en présence d'une lipase, un autre système mesure la corrosion d'une bandelette indicateur métallique ;

- le réactif fresh-check Lifelines : il a été évoqué dans cette enceinte en 1996 [4-5]. Il s'agit d'un monomère de diacétylène incolore qui se polymérise en donnant un composé noir. Ce changement de couleur est fonction du temps et de la température d'exposition du produit. En jouant sur le radical R du monomère on peut développer toute une série d'indicateurs possédant diverses validités. La formule est la suivante : R-C ≡ C-C ≡ C-R.

Il existe deux possibilités d'utilisation des réactifs de Lifelines :

- constater la fin de validité du produit (couleur du réactif identique à la couleur du témoin de fin de validité). Elle reflètera l'ensemble des aléas thermiques subis par le produit, indiquera la fin de validité réelle de celui-ci, dont la date pourra ne pas se superposer à la date limite de consommation imprimée. Ainsi, en suivant la loi d'Arrhénius, le réactif prévu pour virer en 32 jours à +5° changera de couleur en 1,2 jour à 30 ;
- apprécier la durée de validité restante du produit, c'est-à-dire appréciation du capital salubrité résiduel. Cela est possible au moyen d'une lecture instrumentale, le système fresh-scan, relié à un ordinateur qui pourra donner des valeurs intermédiaires entre 0 % et 100 % (début et fin de validité réelle du produit).

Que penser de ces systèmes ?

Pour pouvoir être utilisés largement, ces intégrateurs doivent être simples, fiables, de lecture facile, peu encombrants, de coût modique, aisés à poser. Ce qui est le cas des systèmes Lifelines et bientôt Datitia, qui ont notre préférence.

Arguments critiques

Une bonne partie des frigoristes leur reproche d'indiquer la température de surface et non la température réelle profonde du produit, on risque ainsi de pénaliser certains produits corrects, ayant seulement une légère surexposition thermique de surface.

Bien que la puce fraîcheur de Lifelines indique la validité résiduelle du produit, nous ne saurons pas à quel endroit la chaîne du froid a été malmenée. Les frigoristes sont favorables à cet intégrateur lorsque la puce, placée au milieu de la palette, reflètera réellement la température du lot palettisé.

Dans l'étiquette Datitia, si le changement de couleur réversible est utile dans l'immédiat, celle-ci doit être remplacée rapidement par une étiquette à changement de couleur irréversible, dont l'intensité de coloration doit refléter la durée de surexposition thermique.

Cependant, il faut savoir que les réglementations imposent les enregistrements thermiques depuis le stockage en fin de fabrication jusqu'aux stades des linéaires des

grands magasins. Les enregistrements doivent être conservés un an et sont donc consultables à tout moment en cas d'accidents. Enfin signalons que la réglementation est beaucoup plus stricte avec les produits surgelés alors que ce sont les produits en froid positif qui peuvent poser problème et pour lesquels il n'y a pas d'arrêté qui fixe les températures maximales.

Enfin signalons que les frigoristes déclarent qu'il faudrait autant de sortes d'indicateurs que de produits à surveiller, car chacun d'entre eux réagit différemment au froid, comme au chaud.

Arguments favorables

Dans l'indicateur Lifelines le changement de couleur du réactif, devenant identique à la couleur témoin, indique la fin de la vie commerciale du produit, même si cette notion est excessive car mesurée à la surface du produit, mais cela ne peut que profiter au consommateur si celui-ci veut bien se donner la peine de lire les étiquettes.

De même, dans le système logistique d'acheminement des produits, le système fresh-scan avec la lecture instrumentale permettra de déterminer la validité réelle du produit et de proposer sa commercialisation plus ou moins rapide.

Bilan de l'utilisation des intégrateurs Lifelines dans une société de grande distribution

Une enquête portant sur 3 000 personnes clientes, effectuée pendant 3 ans, a permis de dégager les constations suivantes :

- 20 à 30 % ne les connaissent pas, ne lisant probablement pas les étiquettes ; mais 90 % pensent que c'est utile ;
- 70 à 80 % les connaissent ; trois quarts d'entre eux les regardent dans leurs réfrigérateurs. Mais 25 à 29 % pensent que la DLC est suffisante, doutent du bon fonctionnement de cet ITT ou pensent que c'est une opération commerciale ;
- il n'a pas été noté de réclamations négatives des consommateurs ; il n'y a pas eu de retour important de marchandises vers le magasin. Les clients sont sensibilisés progressivement et participent activement à cette surveillance du froid, ce qui est le but recherché ; l'augmentation des ventes des sacs isothermes aux caisses des magasins en serait un révélateur.

CONCLUSIONS

En dehors des meubles domestiques, tous les équipements et traitements frigorifiques ainsi que les moyens de contrôle mis en œuvre contribuent à limiter les risques d'altération des produits périssables et à préserver efficacement l'ensemble de leurs propriétés. En cas d'accident alimentaire grave, les archives relatives à l'hygiène et à

la température, pour les congelés, que les opérateurs doivent réglementairement conserver pendant un an, permettent de repérer à quel niveau se situe le manquement. Cependant, il subsiste deux points faibles qui sont le non contrôle obligatoire de la température des denrées animales réfrigérées, qui peuvent devenir toxiques si elles sont mal conservées, et le dernier maillon de la chaîne du froid, qui est sous la seule dépendance des consommateurs.

Pour la sécurité du consommateur, la surveillance de la température du réfrigérateur est indispensable et devrait être inculquée dès l'âge scolaire. Surveillance par lecture thermométrique ou au moyen de « mouchards » colorés. La surveillance de la salubrité des aliments est souhaitable également, les intégrateurs ITT indiquant la fin de validité de l'aliment, qui peut être différente de la DLC, du type Lifelines, sont utiles malgré les reproches que certains peuvent faire.

Les indicateurs irréversibles (comme ceux en projet chez Datitia) indiquant un dépassement de la température maximale de conservation et dont l'intensité de la coloration donnera la mesure de cette surexposition thermique, bien que moins sophistiqués que les précédents, seront utiles également en raison de leur coût extrêmement modique (de l'ordre de 1 centime).

Le consommateur actuel traverse une grave crise de confiance en ce qui concerne son alimentation. Au moins rassurons le sur le froid.

Disons-lui que l'État ne peut pas tout faire et qu'il serait bon qu'il participe également à cette surveillance de son alimentation.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Depledt F. — Évaluation sensorielle méthodologique. Manuel méthodologique. Tec & Doc Lavoisier Paris, 1998, 2ème éd., 353 p.

[2] AN. — Recommandations pour la préparation et la distribution des aliments congelés. *Inst. Inter. du Froid Paris*, 1986, 2ème éd., 418 p.

[3] Multon JL., Bureau G. et *al.* — L'emballage des denrées alimentaires de grande consommation. Tec & Doc Lavoisier Paris, 1998, 2ème éd., 1 082 p.

[4] Durand M.P. — Les indicateurs Temps-Température, un moyen de contrôle de la qualité des Produits alimentaires. *Bull Acad. Natle méd.,* 1996, 1995-2004.

[5] Durand M.P. — Les indicateurs Temps-Température ITT dans la surveillance de la chaîne du froid dans les aliments frais. *Bull. Soc. Vet. Prat. France*, 1996, *80*, 405-429.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 311-322, séance du 13 février 2001

Analyse de facteurs influençant la température dans les réfrigérateurs des ménages

Analysis of effecting factors on domestic refrigerator temperature in use

Evelyne DERENS*, Onrawee LAGUERRE*, Bernard PALAGOS*

RÉSUMÉ

L'objectif de l'étude présentée était de connaître le niveau des températures de conservation et d'identifier les facteurs influençant le niveau des températures de l'air dans les réfrigérateurs des ménages en France. L'enquête réalisée auprès des ménages s'est insérée dans « l'enquête individuelle nationale sur la consommation alimentaire (INCA) en 1998-1999 » réalisée par le CREDOC, département prospective de la consommation. L'originalité a été de réaliser un enregistrement des températures à trois niveaux du compartiment réfrigérateur sur 1 semaine. Les auteurs présentent la distribution de la température globale, les caractéristiques techniques des réfrigérateurs soumis à l'enquête et les résultats des analyses statistiques descriptive et multi-dimensionnelle. On constate que 26 % des réfrigérateurs en utilisation ont une température globale moyenne supérieure à 8° C. La température moyenne des 119 réfrigérateurs étudiés est de 6,6° C (minimum 1° C et maximum 11° C). L'étude met en évidence que le niveau de température des réfrigérateurs est le résultat de nombreuses interactions entre les différents paramètres liés à la pratique des consommateurs et à la conception des réfrigérateurs et non d'un seul des paramètres en particulier.

MOTS-CLÉS : RÉFRIGÉRATION. SÉCURITÉ PRODUIT CONSOMMATION.

SUMMARY

A survey was carried out in France in 1999 in order to know the air temperature in domestic refrigerators and the factors which may effect this temperature. Temperatures were recorded at three levels (top, middle and bottom of the refrigerator compartment). A questionnaire was filled to acquire the following information : characteristic of family (number of family members, age, profession, income...), characteristic of refrigerator (trade, type, age, tem-

* CEMAGREF, Unité de Recherche, Génie des procédés frigorifiques — Groupement d'Antony, Parc de Tourvoie, BP 44 — 92163 Antony cedex.

Tirés-à-part : Mme Evelyne DERENS, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 2 janvier 2001, accepté le 15 janvier 2001.

perature setting, refrigerating type...) and the use condition (room temperature, near by heat source, built in, door opening frequency ...). The average temperature of the 119 surveyed refrigerators was 6.6° C. Descriptive analysis and multi dimensional analysis of factors effecting refrigerator temperature were carried out. The classification tree and the segmentation confirm the influence of the use condition (frequency of door opening, temperature setting, near by heat source and built in). There is no direct effect of one factor but the combination of all of them.

Key-words (Index Medicus) : Refrigeration. Consumer product safety.

INTRODUCTION

Dans le secteur alimentaire, la France dispose d'une des réglementations nationales les plus strictes au monde. Elle fixe les températures maximales à maintenir selon les types de denrées et selon les maillons de la chaîne (transport, entreposage, remise au consommateur). Pourtant, malgré une élévation générale du niveau technique et du niveau d'hygiène, on constate que deux maillons restent encore fragiles : ceux de la distribution et de la consommation. Si le maillon de la distribution a été, tout en restant encore fragile, nettement amélioré grâce à une meilleure conception, une maintenance efficace, une surveillance rigoureuse et une formation adéquate du personnel, le maillon consommation, en revanche, reste une source de préoccupation. Il laisse en effet toute liberté de comportement à l'utilisateur avec un risque de ne pas assurer la continuité de la sécurité alimentaire.

Pourtant les consommateurs pourraient se baser, pour la conservation des aliments après achat, sur les valeurs fixées dans l'arrêté du 9 mai 1995 (*J.O.* du 16 mai 1995) réglementant « l'hygiène des aliments remis directement au consommateur ». Cet arrêté indique les températures de conservation des produits réfrigérés jusqu'à leur remise au consommateur et précise cinq niveaux de température de conservation. On peut citer quelques exemples comme 0 à +2° C pour les poissons et les crustacés, un maximum de +4° C pour les aliments très périssables pour lesquels l'absence de maîtrise de la température pendant une courte durée présente un risque microbien pour le consommateur (abats, volailles, préparations froides non stables à base de viande, lait cru, fromages découpés ou râpés préemballés...) et un maximum de +8° C pour les aliments périssables tels que les produits stables à base de viande tranchée, les produits laitiers frais autres que le lait pasteurisé, les desserts lactés, les beurres et matières grasses, ...

Afin de connaître les conditions de conservation après l'acte d'achat, il est important d'avoir une notion de la température maintenue par les réfrigérateurs en fonctionnement chez les consommateurs.

C'est pourquoi le Cemagref (Unité de recherche génie des procédés frigorifiques) a conduit une étude dont l'objectif était d'une part de connaître le niveau des températures de conservation, et d'autre part, d'identifier les facteurs influençant le niveau des températures de l'air dans les réfrigérateurs des ménages en France.

L'enquête réalisée auprès des ménages s'est insérée dans « l'enquête individuelle nationale sur la consommation alimentaire (INCA) en 1998-1999 » réalisée par le CREDOC, département prospective de la consommation. Elle s'est déroulée d'avril à juin 1999.

MÉTHODOLOGIE

Dans chaque ménage soumis à l'enquête, un enregistreur de température a été déposé pendant une semaine dans le réfrigérateur (un par ménage) et un questionnaire technique a été rempli par l'enquêteur avec le représentant du ménage. Les sondes ont été placées en haut, au milieu et en bas du compartiment réfrigérateur ou, en haut et en bas, selon le nombre de sondes disponibles et selon un protocole établi par le Cemagref.

Cent quarante-trois ménages ont été étudiés au total (questionnaire + enregistrement de températures) ; mais pour différentes raisons techniques, seuls 119 enregistrements ont pu être exploités.

Dans le questionnaire, le Cemagref et le CREDOC avaient demandé les informations suivantes :

- les caractéristiques des ménages (critères déterminés par le CREDOC) : nombre de personnes du foyer, âge, profession, région, lieu d'habitation (nombre d'habitants), revenus,
- les caractéristiques du réfrigérateur : marque, type, âge, hauteur du compartiment réfrigérateur, niveau de réglage du thermostat, mode de réfrigération, présence d'un thermomètre, type et fréquence des dégivrages,
- l'utilisation du réfrigérateur : placé près d'une source chaude, aération ou non de la partie arrière, température dans la pièce, fréquence moyenne d'ouvertures de porte.

Une des particularités de cette étude était d'enregistrer la température en continu au sein des réfrigérateurs ménagers et non pas de prendre une mesure ponctuelle à un moment donné.

En revanche, la nature du contenu du réfrigérateur, son type d'arrangement et le taux de remplissage n'ont pas pu être pris en compte dans cette enquête.

ANALYSE DESCRIPTIVE

Etudions d'abord les données qualitatives obtenues avant d'analyser leur impact sur les températures enregistrées.

Les réfrigérateurs sont pour la plupart récents : 51 % ont moins de 4 ans et 35 % ont entre 5 et 10 ans (Fig. 1). En comparant ces valeurs aux statistiques INSEE 1996, on

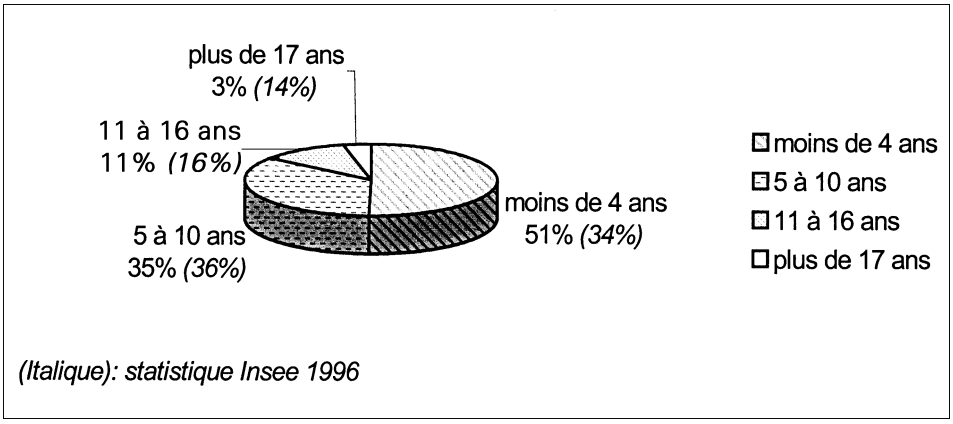


FIG. 1 — Age des réfrigérateurs en France.

constate que, dans notre échantillon, le nombre de réfrigérateurs de moins de 4 ans est nettement plus important. Ceci peut s'expliquer par un renouvellement important des réfrigérateurs ces 4 dernières années avec une diminution importante, en parallèle, du nombre de réfrigérateurs âgés de plus de 17 ans.

Les différents types de réfrigérateurs cités dans le questionnaire sont présentés dans le Tableau 1 ; seuls 4 types de réfrigérateurs ont été répertoriés dans cette enquête (Fig. 2). En effet, aucun ménage étudié ne possède de réfrigérateurs « 3 portes ou 2 portes, 3 zones » ou « côte à côte ». Ces réfrigérateurs dits américains, sont pourtant achetés de manière importante dans d'autres pays comme aux États-Unis et en Allemagne, mais apparemment peu en France.

Concernant le mode de réfrigération (froid statique ou froid ventilé), 54 % des ménages possèdent un réfrigérateur à froid statique, 10 % un réfrigérateur à froid ventilé et 36 % n'ont aucune idée de refroidissement de leur réfrigérateur.

Pour le type de dégivrage**,** on ne peut pas se fier à toutes les réponses reçues. Elles sont entachées d'une erreur à propos du dégivrage manuel car les modes de dégivrage du réfrigérateur et du congélateur ont parfois été confondus. Nous pouvons quand même constater que le système de dégivrage semi-automatique est surtout présent dans les réfrigérateurs de type armoire (81 %) et que le dégivrage automatique est principalement présent dans les réfrigérateurs de type double porte et combinés.

Du point de vue cette fois de l'utilisation du réfrigérateur, on constate que 70 % des ménages règlent le thermostat de leur réfrigérateur à moins de 50 % du réglage maximal, c'est-à-dire sur les positions les moins froides (Fig. 3). L'échelle des

TABLEAU 1. — Les différents types de réfrigérateurs.

TYPE	NOM	DESCRIPTION
A	Table-top	une porte, hauteur < 90 cm
B	Armoire (ou une porte, hauteur > 90 cm)	équipé d'une porte et composé d'un compartiment principal de conservation des denrées fraîches, et éventuellement d'un compartiment d'entreposage des denrées surgelées
C	Double-porte	équipé de 2 portes et composé de 2 compartiments (compartiment d'entreposage des denrées fraîches en partie basse, compartiment des denrées surgelées en partie haute)
D	Combinés	équipé de 2 portes et composé d'un congélateur en partie basse surmonté d'un compartiment de conservation des denrées fraîches en partie haute
E	3 portes ou 2 portes 3 zones	composé d'un compartiment réfrigéré, d'un compartiment des denrées très périssables et d'un compartiment des denrées surgelées
F	Côte à côte	équipé de 2 portes et composé de 2 compartiments placés côte à côte, généralement un réfrigérateur et un congélateur

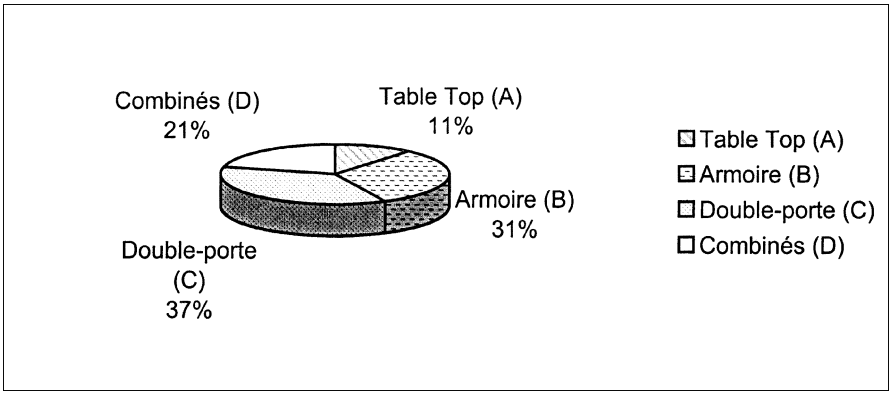


FIG. 2 — Répartition des types de réfrigérateurs.

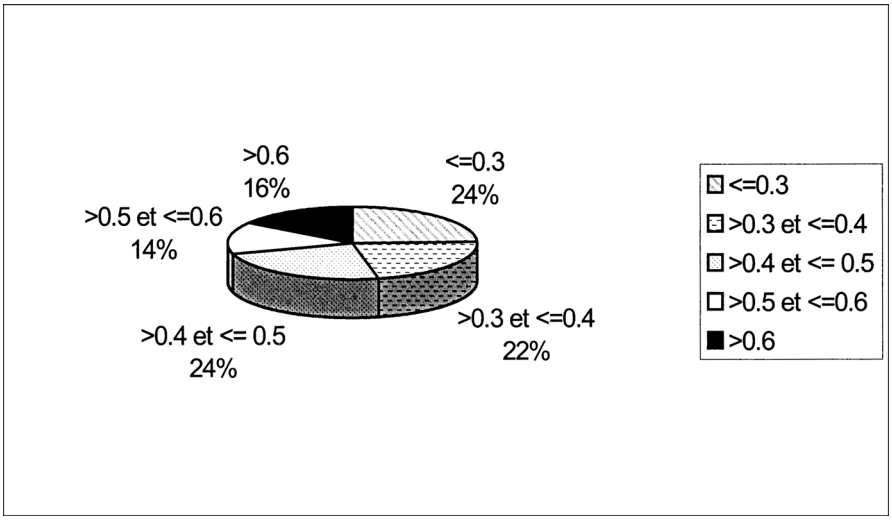


FIG. 3 — Réglage du thermostat des réfrigérateurs ménagers.

thermostats étant différente selon les marques et les modèles de réfrigérateur, nous avons représenté la position du thermostat au moment de l'enquête en pourcentage de l'échelle totale.

D'autre part, 30 % des réfrigérateurs sont placés près d'une source chaude et 14 % sont encastrés.

Quant au nombre d'ouvertures de porte, les données obtenues sont des estimations faites par le représentant du ménage. Quarante-trois pour cent des ménages pensent ouvrir la porte de leur réfrigérateur entre 10 et 20 fois par jour (Fig. 4).

On constate, dans cette étude, que l'on n'aboutit pas à des conclusions qui auraient pu paraître évidentes. Par exemple, le fait d'être peu nombreux au foyer (≤ 2 personnes) n'implique pas systématiquement un faible nombre d'ouvertures de porte. Le type de réfrigérateur acheté (A, B, C ou D) ne dépend pas du nombre de personnes au foyer.

ANALYSE DES TEMPÉRATURES

Pour chaque réfrigérateur, la température globale (TG) est définie comme la moyenne des températures haut, milieu et bas du réfrigérateur, chacune étant obtenue en faisant la moyenne des températures enregistrées sur la semaine. La température du milieu n'a pas toujours été relevée en raison du nombre limité d'appareils enregistreurs.

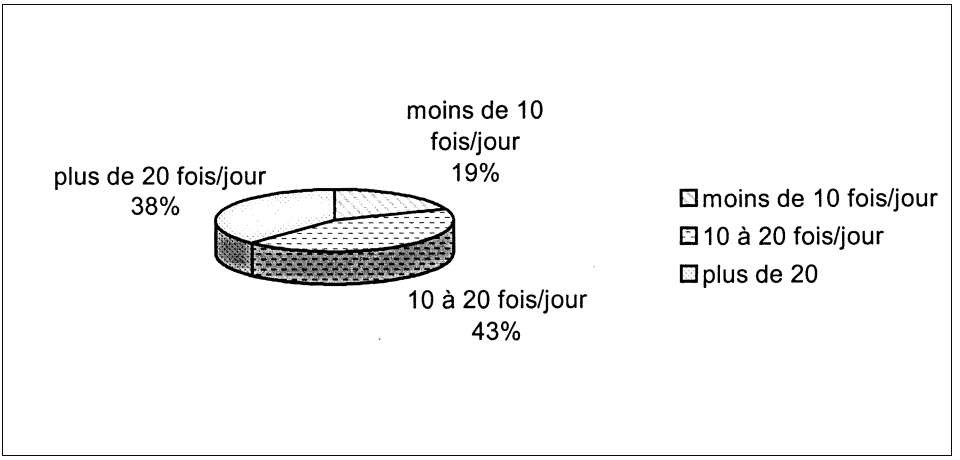


FIG. 4 — Répartition du nombre d'ouvertures de portes.

La moyenne de la température globale (TG) des réfrigérateurs est de 6,6° C avec un écart-type de 2,3° C (Tableau 2) ; elle oscille à 95 % dans un intervalle de confiance de (6,2 ; 7° C). La distribution de TG est proche d'une loi gaussienne. Cinquante pour cent des températures globales (TG) sont comprises entre 5,2° C et 8,2° C, un quart des valeurs étant supérieur à 8, 2° C et un quart inférieur à 5,2° C (Tableau 2 et Fig. 5).

Après cette visualisation de la répartition globale des températures, il nous a paru intéressant de raisonner par classes de température.

La Figure 6 présente la répartition des réfrigérateurs selon les classes de température réglementaires 0 à 2° C / 2 à 4° C / 4 à 8° C / plus de 8° C / définies dans l'arrêté du 9 mai 1995 réglementant l'hygiène des aliments remis directement au consommateur. Nous constatons que, dans les conditions d'utilisation, 26 % des réfrigérateurs ont une température supérieure à 8° C, donc supérieure aux températures réglementaires quel que soit le type de produit, et que seuls 11 % des réfrigérateurs présentent une température inférieure ou égale à 4° C.

Après cet aperçu global, nous avons étudié, par une analyse de variance, l'influence de la position (bas, milieu, haut) et du type de réfrigérateur (A, B, C ou D) sur la température globale. Cette analyse montre qu'il n'y a pas globalement d'influence, ni de la position, ni du type de réfrigérateur.

En revanche, il y a une interaction entre ces deux facteurs. On constate que selon le type de réfrigérateur, la température la plus basse ne se situe pas au même endroit. En effet, pour le type Armoire (B), contrairement aux types de réfrigérateurs C et D, la température du haut est inférieure à celle du bas ; la position de la « zone froide »

TABLEAU 2. — Température moyenne, min, max, quartile et médiane à différents niveaux des réfrigérateurs.

	n	moyenne	Ecart-type	min	max	médiane	Quartile inf	Quartile sup
TG	120*	6,6	2,3	0,9	11,4	6,8	5,2	8,2
TH	117	6,7	2,5	-1,6	12,0	7,0	4,9	8,2
TM	72	6,4	2,4	-0,2	10,7	6,9	4,8	7,8
TB	119	6,5	2,7	-1,0	11,6	6,7	5,2	8,5

* une température enregistrée sans questionnaire

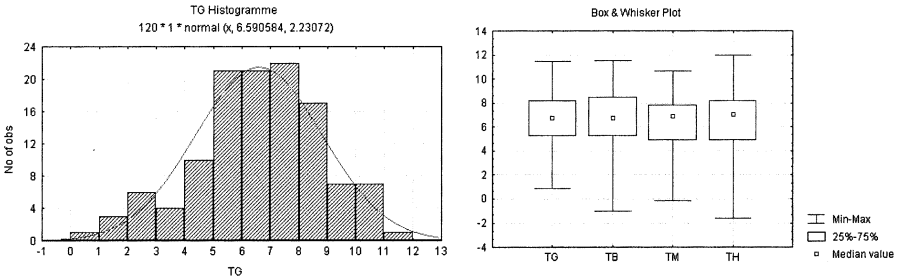


FIG. 5 — Distribution de la température globale de l'air dans 119 réfrigérateurs et valeurs des médianes et quartiles.

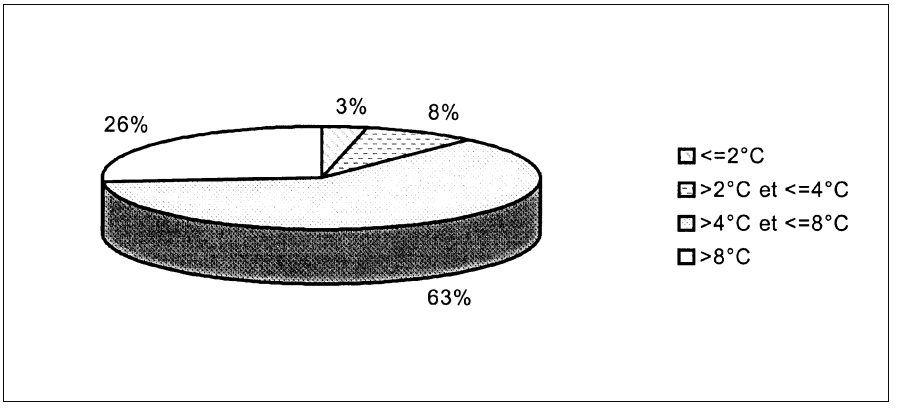


FIG. 6 — Distribution des réfrigérateurs selon les 4 classes de température définies pour différents types de produits par la réglementation (arrêté du 9 mai 1995).

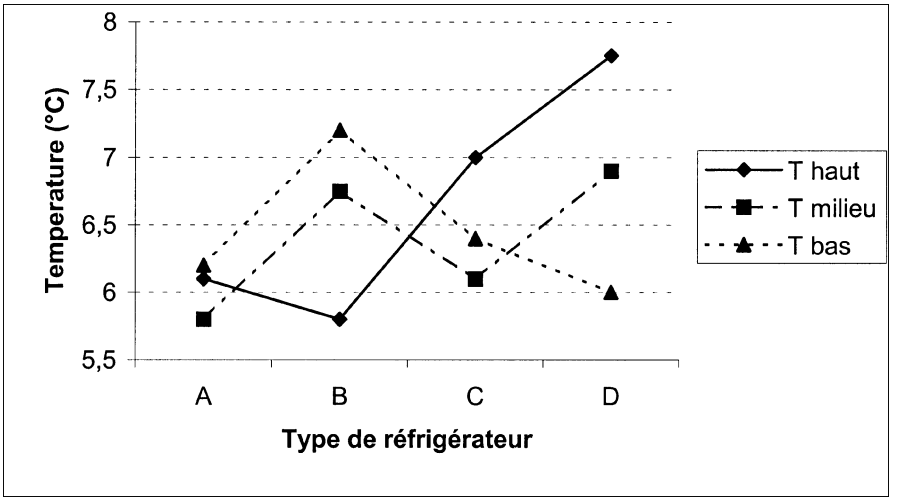


FIG. 7 — Interaction entre le type de réfrigérateur et la position (haut, milieu, bas) sur la température moyenne de l'air.

dépend donc, apparemment, du type de réfrigérateur. D'autre part, la plus importante hétérogénéité, 1,7° C entre les températures du bas et du haut est observée pour le type Combiné (D) (Fig. 7). Pour les réfrigérateurs Table Top (A), on observe une homogénéité de température, due en partie à son faible volume.

L'analyse bi-dimensionnelle n'a pas permis de dégager l'influence d'un paramètre particulier sur le niveau de température. Il semblait donc indispensable d'avoir une approche multi-dimensionnelle pour vérifier que la valeur de la température globale est bien dépendante d'une association de paramètres.

En premier lieu, nous avons réalisé une typologie des réfrigérateurs en prenant comme critères les paramètres d'utilisation et les caractéristiques techniques des réfrigérateurs. Cette classification, qui n'utilise pas la température comme critère de séparation, aboutit à 8 groupes de réfrigérateurs les plus différents possibles (un groupe étant constitué de réfrigérateurs les plus semblables pour les critères choisis).

On caractérise ensuite ces groupes par leur température moyenne en la calculant, et l'on constate que seuls les 2 groupes les plus opposés ont une température moyenne globale différente. Le groupe dont la température moyenne est la plus faible (5,6° C) est caractérisé par un taux important de thermostats en position maximale, par un taux nul pour le nombre d'ouvertures de portes supérieur à 20 par jour et ne contient aucun réfrigérateur encastré. A l'opposé, le groupe dont la température moyenne est la plus élevée (7,2° C) est caractérisé par un réglage du thermostat en position faible, un nombre d'ouvertures de porte élevé et une présence importante de réfrigéra-

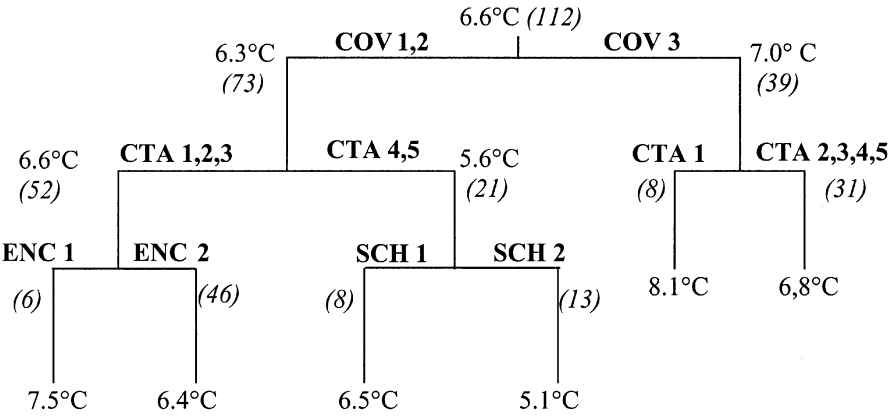


FIG. 8. — Arbre de décision.

teurs encastrés (79 %). Cette analyse montre l'influence de l'interdépendance des facteurs.

L'autre méthode utilisée est la segmentation. Le résultat de cette méthode de classification descendante est un arbre (Fig. 8). Chaque segment représente une sous-population, qui est déterminée à partir d'une des variables explicatives choisies : nombre d'ouvertures de portes, réglage du thermostat, emplacement près d'une source chaude, encastrement.

Le premier découpage est effectué grâce à la variable nombre d'ouvertures de portes (COV) qui est, d'après la méthode et l'algorithme, la variable qui sépare au mieux l'échantillon en deux. L'analyse a été réalisée sur 112 réfrigérateurs pour lesquels toutes les valeurs étaient présentes.

Cet arbre de décision permet, bien que les effectifs soient parfois faibles, de dégager certaines tendances.

Une variable importante est le nombre d'ouvertures de porte : dès que l'on ouvre plus de 20 fois (COV3), la température peut augmenter, mais un réglage de thermostat adéquat peut la stabiliser (CTA 2, 3, 4 ou 5). En revanche, un réglage en position la plus faible (position 1, CTA1) ne fera qu'augmenter la température (ici 8,1° C).

Pour un nombre d'ouvertures de porte faible ou moyen, la température peut décroître avec un réglage en position les plus froides (position 4 ou 5), sauf s'il s'agit de réfrigérateurs près d'une source chaude (SCH1). En revanche avec un réglage de thermostat dans les positions faibles (1, 2 ou 3), la température reste près de la moyenne, sauf s'il y a encastrement (7,5° C).

CONCLUSIONS

Rappelons que tous les résultats énoncés par la suite concernent un échantillon de 119 réfrigérateurs ménagers.

Sur le comportement des utilisateurs, on constate une méconnaissance du mode de réfrigération de leur réfrigérateur (36 % n'en ont aucune idée). D'autre part, les trois quarts environ des ménages règlent le thermostat de leur réfrigérateur dans les positions qui correspondent aux positions les moins froides, peut-être par souci d'économie d'énergie ou simplement pour un confort personnel pour certains aliments (boisson pas trop froide par exemple) en oubliant de se poser la question des risques hygiéniques éventuels.

Vingt-six pour cent des réfrigérateurs présentent une température globale supérieure à 8° C. Cette température est pourtant la température maximale tolérée pour les aliments dans l'arrêté réglementant l'hygiène des aliments remis directement au consommateur. De même, seuls 11 % des réfrigérateurs présentent une température inférieure ou égale à +4° C, qui est la température maximale tolérée pour de nombreux aliments tels que les produits transformés non stables à base de viande, comme les plats préparés réfrigérés.

Globalement, il n'y a pas de différence entre les températures moyennes hautes et basses mais il en existe une lorsque l'on raisonne par type de réfrigérateur. En effet, l'emplacement de la zone froide varie selon le type de réfrigérateur, et le type de réfrigérateur double porte présente l'hétérogénéité la plus importante entre les températures moyennes, hautes et basses, du compartiment réfrigérateur.

Cette étude a montré qu'on ne peut pas établir de liens directs entre un des paramètres observés et le niveau de température moyen du réfrigérateur. Par exemple, le réglage du thermostat seul ne suffit pas à déterminer la température moyenne du réfrigérateur.

Le niveau des températures dans le réfrigérateur dépend de la combinaison des réglages des différents facteurs. Un exemple : un nombre d'ouvertures de porte important associé avec un réglage thermostat en position la moins froide provoque une température moyenne supérieure à 8° C.

Il semble souhaitable que le consommateur connaisse, dans son compartiment réfrigérateur, les positions « froides » et « moins froides » afin d'y placer les aliments adéquats. Il peut pour les connaître, se référer d'une part à la notice du fabricant et, d'autre part, mesurer la température de son réfrigérateur au moyen d'un thermomètre. Des campagnes d'information et des brochures explicatives seraient utiles pour aider le consommateur à bien utiliser son réfrigérateur ; certaines sont en cours.

REMERCIEMENTS

Le Cemagref a bénéficié de la compétence du CREDOC dans le domaine des enquêtes auprès des consommateurs dans le cadre de l'étude INCA 1998-1999 et l'en remercie.

La Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) et la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) ont soutenu financièrement cette étude.

Les fabricants (Testo, Sopac Thermocontrôle, Groupe Befic, Jules Richard Instruments, Groeneveld) ont fourni gracieusement les enregistreurs de température utilisés.

RÉFÉRENCES

— Actualités : Concurrence, Consommation et Répression des Fraudes, nº 110, mai 1998.

— Blanchard M. — Conservation dans le réfrigérateur domestique des aliments réfrigérés. *Rev. Gen. Froid*, 1993, Septembre, 26-29.

— Bruhn C.M., Schutz H.G. — Consumer food safety knowledge and practices. *Journal of Food safety*, 1999, *19*, 73-87.

— Enquête individuelle et nationale sur les consommations alimentaires. Éditions Tec et Doc, 2000, 158 p.

— Flynn O.M., Blair I., McDowell D. — The efficiency and consumer operation of domestic refrigerators. *Rev. Int. Froid*, 1992, *15*[5], 307-312.

— Garry P. — L'alimentation française est de plus en plus sûre. *Rev. Gen du Froid*, 1999, *999*, 11-13.

— James S.J., Evans J. — Consumer handling of chilled foods : Temperature performances. *Revue Int. Froid*, 1992, *15*, 299-306.

— O'Brien G.D. — Domestic refrigerateur air temperatures and the public's awareness of refrigerateur use. *International Journal of Environmental Health Research*, 1997, *7*, 141-148.

— Rosset P., Rosset R. — L'usage domestique du froid ou la pathologie du réfrigérateur. *La Lettre Scientifique de l'Institut Français pour la Nutrition*, 1999, *69*, octobre 1999.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 323-327, séance du 13 février 2001

Température et qualités sensorielles des aliments

Temperature and sensorial qualities of food

Jacques PUISAIS*, Maurice-Paul DURAND **

RÉSUMÉ

*Le plaisir de la consommation des aliments est souligné par Brillatt-Savarin au XIX*ème *siècle. Indépendamment des bactéries pathogènes, des mauvais goûts dus à une prolifération microbienne ou à des actions enzymatiques peuvent se développer dans les réfrigérateurs à température mal gérée. Il faut distinguer température de conservation et température de consommation de l'aliment. L'ambiance idéale d'un repas se situe à 22° pour une humidité de 60 %. Sur le plan des quatre saveurs principales, sucré et salé sont mieux perçus à 18°, amer-acide à 8°. Toutes ces notions développées précédemment sont appliquées dans les cas de l'analyse sensorielle et des repas.*

MOTS-CLÉS : GOÛT (SENS). RÉFRIGÉRATION.

SUMMARY

The pleasure of food-intake was emphasized by Brillat-Savarin in XIX° century. Beside pathogen bacterias, bad flavours caused by bacterial growth or enzymatic effects may happen in refrigerators with a mismanaged temperature. We have to distinguish between food-conservation and food-intake temperature. The ideal room-temperature to appreciate a meal is about 22° C with a damp of 60 %. Relating to the four main flavours, salt and sweet are at their best at 18°, bitter and sour at 8°. All what is written before can be applied either in the case of sensorial analysis and meal.

KEY-WORDS (Index Medicus) : TASTE. REFRIGERATION.

De la lecture attentive des livres « *du Régime* » et « *de l'Aliment* » d'Hippocrate, il ressort *in fine* que l'aliment n'est qu'une nécessité pour construire ou entretenir son

* Académie d'Agriculture de France, 18 rue de Bellechasse — 75007 Paris, et Président de l'Institut français du goût.

** Correspondant de l'Académie nationale de médecine.

Tirés-à-part : Professeur Jacques PUISAIS, à l'adresse ci-dessus.

Article reçu le 5 janvier 2001, accepté le 15 janvier 2001.

corps. De l'appétit, conséquence du phénomène physiologique qu'est la faim, et de sa dimension subjective, le goût, je ne l'ai guère vu en signaler l'importance.

Quant au « *Traité de Cuisine d'Apicius* » I^er^ siècle, souvent cité, il s'agit en fait d'un ensemble de recettes dont il décrit la préparation.

Le goût en est-il sucré, salé, amer, acide ?... Quelles sont les températures de consommation souhaitables ?... Ce n'est pas indiqué. Il est vrai qu'à cette époque, la consommation alimentaire était essentiellement à base de bouillies et que les légumes et viandes étaient également bouillis.

Il faut arriver à Brillat-Savarin et à son « *Traité de Physlologie du Goût* » de 1848 pour reconnaître que manger un aliment goûteux, appétent, est un des plaisirs de la vie et que cette consommation d'aliments obéit à certaines règles qui permettent d'en mieux apprécier les qualités sensorielles.

Par ailleurs, il déclare dans ses « *Aphorismes* » :

- « Le créateur en obligeant l'homme à manger pour vivre l'y invite par l'appétit et l'en récompense par le plaisir ».

Arrivé à un âge relativement avancé, il continue en déclarant :

- « Le plaisir de la table est de tous les âges, de toutes les conditions, de tous les pays, et de tous les jours, il peut s'associer à tous les autres plaisirs, et reste le dernier pour nous consoler de leur perte ».

C'est ce que je vous souhaite à tous.

Dans cette séance, nous aborderons :

Sur le plan organoleptique, la température de conservation de l'aliment frais

En particulier son maintien en atmosphère réfrigérée est nécessaire pour éviter des dégradations préjudiciables au goût. Celles-ci peuvent survenir lors d'une conservation à une température insuffisamment basse : viandes à odeur de putréfaction, poissons à odeur ammoniacale, laits tournés à saveur très acide, altérations toutes d'origine microbienne, mais également goûts de rance du beurre, saveur acide du jus d'orange, d'origine enzymatique.

En revanche, l'aliment au moment de sa consommation doit voir sa température varier en fonction des diverses saveurs recherchées

Si *l'excès de froid*, en particulier l'absorption d'eau glacée (surtout par temps chaud) risque d'engendrer de sérieux désordres intestinaux, *l'excès de chaud* est tout aussi néfaste de conséquences. Ainsi on voit apparaître des brûlures de la cavité buccale et nous avons en mémoire la relative fréquence des cancers de l'œsophage et de l'estomac chez l'homme japonais qui a l'habitude de manger très chaud tandis que son épouse, prenant son repas ensuite donc à température plus basse, y est moins sujette.

Ajoutons enfin que si la nature de l'aliment, sa température normale de consommation, permettent d'épanouir ses potentialités sensorielles dans les quatre saveurs fondamentales (sucré, salé, amer, acide), il faut savoir que l'ambiance du repas, en outre, reste essentielle, comme nous le redit Brillat-Savarin « On goûte le plaisir de la table dans toute son étendue lorsque les quatre conditions suivantes sont réunies : chair au moins passable, bon vin, convives aimables, temps suffisant ».

Le froid et l'ambiance alimentaire

L'homme au cours de ses repas est « bombardé » de stimuli provenant aussi bien des boissons que des aliments qu'il consomme.

Tous ses sens sont ainsi mobilisés. Il se trouve dans une position poly-sensorielle mettant en jeu plusieurs régions de son cerveau.

On a observé que les propriétés sensorielles de l'objet « aliments-boissons » étaient différentes selon la température de consommation et que le sujet, c'est-à-dire le goûteur, était lui-même influencé dans ses performances sensorielles par l'effet thermique ambiant.

En agissant sur la température, les caractères sensoriels des boissons et des aliments peuvent ainsi être développés et élargir le champ psychosensoriel du goûteur.

La température va donc permettre de placer le sujet dans des conditions optimales de plaisir alimentaire comme elle va permettre à l' « objet-aliment » de solliciter un registre émotionnel optimal.

J'ai pu observer que les caractères sensoriels des prises alimentaires étaient mieux perçus dans des locaux à une température de 22° pour une humidité de 60 %.

Si l'humidité est plus importante (pouvant atteindre 100 %) la température optimale dans laquelle doit se dérouler la dégustation est de 18° alors qu'à 40 % d'humidité elle est de 24 °. Ces valeurs étant observées dans des ambiances sans mouvement d'air marqué (ventilation naturelle ou artificielle).

L'utilisation du froid pour maintenir des locaux où les personnes prennent leurs repas à une température correcte, favorisera des prises alimentaires diversifiées et équilibrées.

Le sujet pourra dans de telles situations couvrir ses besoins tout en profitant normalement des sources émotionnelles émanant de son alimentation.

Le point est important car c'est ainsi que la satiété ne sera pas satisfaite uniquement par une impression physique, mais aussi réglée à partir du plaisir ressenti.

On veillera à ce que cet équilibre thermique soit obtenu par des techniques douces, sans effets dus à la circulation de l'air et à l'émission de bruit, sur l'ambiance.

Le froid et les aliments

Les aliments et les boissons vont alerter l'ensemble de nos sens au cours du repas. On a observé, pour certains de leurs constituants, les influences suivantes sur les perceptions (Tableau 1).

TABLEAU 1.

	TEMPÉRATURE 18°	**TEMPÉRATURE 6°**
ALCOOL à 10°	**8**	**6**
ACIDE LACTIQUE 2g/1	**6**	**8**
ACIDE MALIQUE 2g/1	**6**	**7**
ACIDE TARTRIQUE 2g/1	**6**	**7**
TANIN 2g/1	**5**	**8**
GLYCÉRINE 3g/1 (Impressions sucrée et tactile)	**8** (1)	**5** (1)

(1) Echelle de perception notée de 1 à 10

Les influences de la température sont donc nettement enregistrées. On peut souligner que, selon les seuils de sensibilité individuels, ils peuvent être plus ou moins décalés.

On a également étudié l'effet thermique pour l'ensemble des stimulations

1. Tout d'abord au niveau des quatre saveurs :
   - les stimulations de l'ensemble sucré sont perçues avec moins d'intensité à la température de 8° qu'à 18° ;
   - les stimulations de l'ensemble salé sont également perçues avec moins d'intensité à la température de 8° qu'à 18° ;
   - les stimulations de l'ensemble amer sont perçues avec plus d'intensité à 8° qu'à 18° ;
   - les perceptions de l'ensemble acide sont également plus importantes à basse température.
2. Les stimulations chimiques attachées aux stimulations astringentes, brûlantes, piquantes, métalliques seront également influencées par le froid :
   - la note astringente est plus développée à 8° qu'à 18° ;

- la note brûlante à 8° est moins développée qu'à 18° ;
- la note piquante à 8° est plus développée qu'à 18°.

3. Pour ce qui concerne les stimulations olfactives, la perception des stimuli présente moins d'intensité à basse température qu'à température élevée.
4. Quant aux stimulations tactiles, elles offrent une sensation plus dense à basse température qu'à haute température ; ainsi une soupe tiède paraîtra plus épaisse que si elle est servie chaude.

En conséquence, les personnes profitent pleinement des impressions sensorielles proposées lorsque leur aliment ou leur boisson est consommé à température optimale.

Quelques applications

Analyse sensorielle

Dans les ateliers sensoriels la température doit être de 21° ± 1°, ainsi les goûteurs se trouvent dans des conditions d'appréciation performantes. Cette température doit être maintenue pendant toute la durée de l'examen. Pour ce qui concerne les produits goûtés, ils devraient être présentés à leur température optimale d'expression. Il est inadmissible de rencontrer des résultats d'examen sensoriel sans indication de la température de dégustation.

Repas

Les mets et les boissons seront présentés à leur température d'usage. Ce point est important pour l'ensemble des repas familiaux mais cet aspect prendra encore plus d'importance chez les malades dont l'appétit est souvent faible. Cette remarque est valable pour tous les éléments entrant dans l'alimentation depuis les plus simples jusqu'aux plus complexes. La température de l'eau, par exemple, doit être d'environ 5 degrés inférieure à la température ambiante du local où le sujet se trouve. Il en sera de même des fromages, voire des fruits. On devra évidemment tenir compte des seuils de sensibilité thermiques, individuels.

Mais l'absence de rigueur sur des principes aussi simples tend à expliquer le manque d'appétit d'un sujet pour des raisons compliquées alors qu'il ne s'agit que d'un simple état de faits.

CONCLUSION

Tenir compte des stimulations thermiques des aliments comme des conditions ambiantes du repas met en jeu une suite de dispositions qui doivent être parfaitement maîtrisées... Ainsi chacun pourra pleinement profiter de ses aliments aussi bien dans leur aspect nutritionnel que dans leurs effets psychosensoriels.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 329-336, séance du 6 février 2001

Actualité

Intérêt du génotypage fœtal *RHD* dans la prévention de l'immunisation anti-D

Importance of RHD fetal genotyping for preventing anti-D immunisation

Yves BROSSARD *, Alfred SENDER, Jean-Pierre CARTRON [*],
Jacques HUCHET*, François PINON*, Philippe BLOT*, Georges DAVID*

Lecture par Georges DAVID

RÉSUMÉ

L'immunoprophylaxie de l'immunisation fœto-maternelle Rhésus D par l'injection d'immunoglobulines anti-D est largement appliquée aux femmes Rh négatif, après l'accouchement d'un enfant Rh positif et après interruption de grossesse. La possibilité de pratiquer le groupage Rh du fœtus par génotypage sur l'ADN des cellules amniotiques et surtout sur l'ADN fœtal du plasma maternel devrait permettre l'extension de la prévention à la période prénatale chez toutes les femmes porteuses d'un fœtus Rh positif. Ainsi améliorerait-on encore l'efficacité de l'immunoprophylaxie tout en limitant l'utilisation d'un produit, les gammaglobulines, d'origine humaine, aux seuls cas bien justifiés.

MOTS-CLÉS : IMMUNOGLOBULINE RH. ÉRYTHROBLASTOSE FŒTALE. ISO-IMMUNISATION RH. GÉNOTYPE.

SUMMARY

Anti-D prophylaxis is currently applied in France after birth of an RhD positive infant, after interruption of pregnancy and after some antenatal immunizing events (amniocentesis...). However this program does not cover all the prenatal exposures to fetal RhD antigen, and maternal Rh immunization continues to occur. DNA RhD genotyping of the fetus is now reliably performed on amniotic fluid, and pre diagnostic studies on fetal DNA extracted from maternal plasma are promising. The widespread use of fetal RhD genotyping on maternal blood would allow the antenatal administration of Rh immuneglobuline in all Rh

* Centre d'Hémobiologie Périnatale (CHP), 53 Boulevard Diderot — 75570 Paris cedex 12.
** Unité INSERM U 76, Institut National de la Transfusion Sanguine. 6, rue Alexandre Cabanel — 75015 Paris.

Tirés-à-part : Professeur Georges DAVID, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 12 janvier 2001, accepté le 15 janvier 2001.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 329-336, séance du 6 février 2001

negative patients bearing an Rh positive fetus, insofar as it would preclude exposing the other Rh negative patients to the above plasma derived and rather expensive blood product

KEY-WORDS (Index Medicus) : RHO (D) IMMUNE GLOBULIN. ERYTHROBLASTOSIS, FETAL. RH ISOIMMUNIZATION. GENOTYPE.

L'histoire de l'immunisation fœto-maternelle Rhésus a pour point de départ la découverte du système de groupe sanguin Rhésus, en 1940, par Landsteiner. En un demi-siècle on a assisté à l'identification de la maladie fœtale et néonatale qu'elle provoque, à la mise au point de son traitement postnatal par l'exsanguino-transfusion du nouveau-né, puis du traitement prénatal par transfusion fœtale *in utero,* enfin à sa prévention par l'injection de gammaglobulines.

Ainsi une génération médicale a vu se dérouler le cycle complet de cette maladie : sa découverte, sa compréhension, sa maîtrise thérapeutique puis sa prévention. Alors sa disparition est-elle proche ? Malheureusement pas. Car il ne s'agit pas d'une maladie infectieuse dont on peut espérer l'éradication de l'agent causal. C'est une affection qui relève de la génétique, puisqu'elle est inhérente à la combinaison constitutionnelle de certains couples. On ne peut espérer qu'en pallier les conséquences par un effort de prévention qui devra être poursuivi inlassablement sous peine d'un retour de ses manifestations.

C'est sur les contraintes de cette prévention que nous insisterons aujourd'hui, ainsi que sur ses récents progrès. Mais avant de les aborder, il n'est pas inutile de rappeler le mécanisme de l'immunisation et de ses conséquences fœtales et néonatales.

PHYSIOPATHOLOGIE DE L'IMMUNISATION ET SES CONSÉQUENCES

Le système Rhésus

Classiquement on attribuait au système Rhésus 3 couples d'allèle : C et c, E et e, D et d reconnus (sauf d) par des anticorps spécifiques.

La récente découverte des gènes du système a clarifié cette vue [1]. Le phénotype dépend de deux gènes : le gène D et le gène CE, chacun codant pour un polypeptide de la membrane de l'hématie.

Le gène D est soit présent (sujet Rhésus positif), soit absent ou silencieux (sujet Rhésus négatif). Il présente également des réarrangements qui modulent son expression phénotypique. Le gène CE est polymorphe, le polypeptide exprimant soit C ou c, E ou e.

Le locus Rh est situé à l'extrémité du bras court du chromosome 1.

Mécanisme de l'immunisation

Dans les conditions actuelles, où les immunisations d'origine transfusionnelle sont en principe évitées, l'immunisation fœto-maternelle résulte du passage transplacen-

taire, fréquent pour ne pas dire habituel au moment de l'accouchement, d'hématies fœtales dans la circulation maternelle. Lorsque les hématies sont porteuses d'un antigène d'origine paternelle non présent chez la mère, elles déclenchent la fabrication d'allo-anticorps correspondants. L'immunisation de loin la plus fréquente est une immunisation anti-RhD.

Parmi les allo-anticorps produits par la mère, les immunoglobulines franchissent le placenta par un mécanisme actif de transcytose syncytiotrophoblastique. Ce transfert est précoce, dès le 3e mois de la grossesse. Son importance va en croissant de telle sorte que le taux fœtal atteint, voire dépasse, le taux maternel en fin de grossesse.

Chez le fœtus, les anticorps forment, en se fixant sur les antigènes Rhésus des hématies, des immuns complexes qui se lient aux récepteurs des macrophages, les activent et provoquent l'hémolyse.

Manifestations fœtales et néonatales

L'hémolyse comporte deux conséquences :

— la libération d'hémoglobine, transformée en biliverdine puis en bilirubine non conjuguée qui est épurée par le trophoblaste vers la circulation maternelle ;
— une anémie partiellement compensée par une réaction érythroblastique intense.

Au-dessous d'un certain seuil (environ 7g/dL au cours du deuxième trimestre et 9g/dL au cours du troisième trimestre) peut survenir une défaillance circulatoire avec constitution d'épanchements séreux et d'œdèmes tissulaires, y compris placentaires. C'est la classique anasarque fœto-placentaire aboutissant à la mort fœtale ou néonatale.

Dans les formes moins graves avec naissance d'un enfant vivant, l'anémie se poursuit. Mais une autre symptomatologie se développe, l'ictère. L'épuration de la bilirubine ne dispose plus du secours placentaire. D'autre part, l'épuration hépatique est inefficace du fait de l'immaturité de la glycuroconjugaison dans les premiers jours de la vie. L'hyperbilirubinémie provoque, au-delà d'un certain seuil (200 mg/L), une nouvelle menace, l'ictère nucléaire, ainsi dénommé du fait de la fixation toxique de la bilirubine sur les neurones des noyaux thalamiques, du tronc cérébral et du cervelet. Cette encéphalopathie bilirubinique laisse, en cas de survie, de graves séquelles motrices et sensorielles.

PRISE EN CHARGE THÉRAPEUTIQUE

Avant la naissance

L'immunisation maternelle est révélée par la présence d'anticorps lors des recherches d'agglutinines irrégulières, obligatoires au cours de la grossesse. En cas de

positivité, se pose alors le problème, plus difficile, de l'évaluation de l'atteinte fœtale. Elle ne repose que sur des signes indirects, avant tout le titrage et la mesure pondérale des anticorps maternels. Mais, d'une part il n'y a pas un parallélisme étroit entre leur taux et la gravité de la maladie, d'autre part leur évolution au cours de la grossesse est variable et difficilement prévisible, ce qui impose des examens réguliers et rapprochés.

La détection de l'anémie fœtale ne peut être, également, qu'indirecte : soit par la mesure dans le liquide amniotique du taux de bilirubine, traduisant l'intensité de l'hémolyse, mais elle nécessite une amniocentèse qui n'est pas sans inconvénient, en particulier celui d'aggraver l'immunisation ; soit par des signes de souffrance circulatoire décelés notamment par l'échographie, le rythme cardiaque et le doppler du flux sanguin, mais ces signes sont tardifs.

Les mesures thérapeutiques sont fonction de la gravité de l'anémie : transfusion ou même exsanguino-transfusion partielle *in utero* par ponction des vaisseaux ombilicaux et accouchement prématuré.

Après la naissance

Si l'anémie est immédiatement intense, elle nécessite une exsanguino-transfusion par concentré globulaire. Mais c'est la prévention de l'ictère nucléaire qui devient la préoccupation majeure. Elle est fondée sur une surveillance du taux de bilirubine (en distinguant la bilirubine totale et la bilirubine non liée à l'albumine qui représente la fraction neurotoxique). La règle est de maintenir le taux de bilirubine sous la limite des 200 mg/dL en combinant exsanguino-transfusion et photothérapie.

Cette phase difficile des 5 premiers jours passée, une anémie secondaire peut encore s'installer au cours des semaines suivantes.

PRÉVENTION PAR LES IMMUNOGLOBULINES ANTI-RHD

Mécanisme et efficacité de l'immunoprophylaxie

Les immunoglobilines empêchent l'immunisation secondaire à l'hémorragie fœto-maternelle par deux mécanismes :

— principalement par la destruction rapide de ces hématies selon le même mécanisme que chez le fœtus,

— par l'inhibition des cellules B maternelles, incapables de se transformer en plasmocytes et de produire des anticorps.

Cet effet protecteur a été démontré par de nombreux essais thérapeutiques dès les années 70. Dans les séries traitées, après la première naissance d'un enfant Rhésus positif et ABO compatible (si l'enfant est ABO incompatible, les anticorps anti A et B exercent une certaine protection naturelle) la fréquence moyenne d'une immuni-

sation maternelle 6 mois après l'accouchement est seulement de 0,4 % contre 4 à 8 % dans les séries non traitées. Ce taux d'efficacité d'environ 90 % se confirme après la deuxième grossesse avec enfant Rhésus positif. Alors que le taux d'immunisation, chez les femmes non traitées, s'élève en moyenne à 12 %, il reste à 1,5 % chez les femmes traitées [2].

Ces premières études mirent également en évidence : d'une part la nécessité de faire l'apport d'anti-D dans un délai rapide après l'accouchement, moins de 72 heures ; d'autre part l'importance du volume de l'hémorragie maternelle, qui conditionne fortement le risque d'induction d'une immunisation [3]. D'où l'importance, pour déterminer la quantité d'immunoglobulines à injecter, de faire une évaluation du volume d'hématies fœtales ayant pénétré dans la circulation maternelle. Ceci est possible grâce au test de Kleihauer, qui permet l'identification de ces hématies [4].

Indications actuelles

Les résultats très positifs de ces premières études furent à l'origine de la mise en pratique de l'immunoprophylaxie systématique chez toute femme Rhésus négatif après accouchement d'un enfant Rhésus positif, ce qui représente le chiffre considérable de 70 000 femmes par an, en France.

Par ailleurs on a étendu cette pratique au *post abortum*, qu'il s'agisse d'interruptions spontanées ou provoquées, et même en cours de grossesse en cas de traumatisme abdominal ou de toute autre circonstance susceptible de causer une hémorragie fœto-maternelle, y compris et surtout les amniocentèses. Là aussi le nombre de femmes concernées, chaque année, est important : 20 000 après avortement spontané, 20 000 après interruption volontaire de grossesse, 10 000 après amniocentèse, enfin 20 000 pour des causes diverses. C'est donc un total d'environ 160 000 femmes qui relèvent de ces indications chaque année.

Faut-il aller plus loin ?

Certains pays (États-Unis, Canada, Grande Bretagne) ont étendu cette immunoprophylaxie à la période prénatale en pratiquant une injection systématique au dernier trimestre de toute grossesse de femme Rh négatif non encore immunisée.

La justification de cette extension est fondée sur le fait qu'une immunisation peut se produire au cours même de la première grossesse, dans les deux derniers mois avant l'accouchement, du fait de passages d'hématies fœtales, minimes mais suffisants pour induire l'immunisation [5]. L'application de l'ensemble de ces mesures fait tomber la fréquence cumulée des immunisations maternelles après naissance du deuxième enfant Rhésus positif de son taux spontané, en moyenne 12 %, à environ 1 % [6].

Cette couverture maximale, en particulier l'injection systématique au cours de toute grossesse de femme Rhésus négatif a pour inconvénient certaines administrations inutiles puisqu'un certain pourcentage des fœtus (environ 40 %) est Rhésus négatif,

donc sans risque d'immunisation. La surconsommation d'un tel produit, outre son inconvénient économique (une majeure partie est importée des États-Unis où se pratiquent des immunisations délibérées de sujets Rh négatif, ce qui est proscrit en France) a surtout l'inconvénient d'augmenter les risques de contamination infectieuse que comporte potentiellement tout produit d'origine sanguine. En une période où l'on en vient à prendre en compte le risque de transmission du prion pathologique, ces craintes ne peuvent plus être négligées.

Aussi est-on resté réservé dans notre pays, spécialement marqué par le drame du sang contaminé, à l'égard d'une pratique allant jusqu'à des injections prénatales aveugles quant au groupe Rhésus du fœtus. Certes une technique pourrait permettre de connaître ce groupe. C'est un prélèvement sanguin fœtal au niveau des vaisseaux ombilicaux. Mais au prix de risques fœtaux disproportionnés et d'une cause d'hémorragie fœto-maternelle supplémentaire.

Deux découvertes sont venues, récemment, bouleverser le problème dans un sens heureux. Tout d'abord l'identification des gènes du système Rhésus permettant de passer de la détermination phénotypique classique, par les anticorps spécifiques des groupes exprimés sur les hématies, à une détermination génotypique sur l'ADN de toute cellule [1]. Ensuite la découverte de l'existence, au cours de la grossesse, non seulement de cellules fœtales mais d'ADN libre dans la circulation maternelle sur lequel peut être pratiqué le génotypage [7].

Dès lors s'ouvrait la possibilité d'une nouvelle approche pour l'identification du groupe Rhésus fœtal, se réduisant à une prise de sang maternel. C'est cette voie qu'a entrepris d'explorer le Centre d'Hémobiologie Prénatale en liaison avec l'Unité INSERM U 76, Institut National de la Transfusion Sanguine.

Détermination du groupe Rhésus fœtal par génotypage

La mise au point technique et la fiabilité ont tout d'abord été testées sur l'ADN fœtal extrait des cellules du liquide amniotique, qui sont d'origine fœtale [8]. L'étude a porté sur une série de 437 liquides amniotiques provenant d'amniocentèses faites pour différentes indications. Les résultats ont été comparés à ceux du groupage traditionnel des nouveau-nés. On a ainsi pu établir la sensibilité du génotypage, 100 %, et sa spécificité, 95 %. Ce léger défaut de spécificité ne tient pas au test lui-même, mais à l'existence connue de gènes D non fonctionnels : le gène existe, mais il ne s'exprime pas au niveau phénotypique. Heureusement la conséquence en est beaucoup moins grave que ne le serait un défaut de sensibilité. Une amélioration technique devrait permettre d'y remédier.

Ces résultats favorables ont fait considérer le génotypage comme validé. Il est maintenant, depuis octobre 1997, à la disposition de toutes les équipes obstétricales de la région parisienne qui peuvent y recourir chaque fois qu'elles ont à pratiquer une amniocentèse chez une femme Rh négatif, ce qui devient de plus en plus fréquent en raison de l'extension du dépistage des anomalies chromosomiques.

Par ailleurs l'objectif, plus important encore, d'un génotypage sur l'ADN fœtal du plasma maternel fait l'objet d'une étude en cours qui portera sur 1 000 femmes Rh négatif testées en début de grossesse. Les difficultés sont évidemment plus grandes que pour le liquide amniotique. Ceci pour deux raisons. Tout d'abord la quantité très réduite d'ADN fœtal dont on dispose. D'autre part la difficulté de trouver des marqueurs spécifiques de l'ADN fœtal par rapport à l'ADN maternel. Cependant les premiers résultats obtenus laissent espérer des solutions satisfaisantes.

Il n'est donc pas déraisonnable de miser sur une prochaine entrée en application pratique de cet important progrès.

Intérêt du génotypage Rhésus sur l'ADN fœtal du plasma maternel

L'intérêt majeur sera de permettre un meilleur ciblage de la prévention de l'immunisation maternelle par les gammaglobulines chez les femmes Rh négatif en cours de grossesse. Dès maintenant environ 30 % des femmes Rh négatif non immunisées reçoivent des injections anténatales d'immunoglobulines à la suite de circonstances spontanées ou de gestes obstétricaux susceptibles de provoquer une hémorragie fœto-maternelle. Faute de pouvoir identifier le groupe fœtal, ces injections sont faites indistinctement, quel que soit le groupe du fœtus. Or environ 40 % des fœtus sont Rh négatif, ne comportant donc aucun risque d'immunisation maternelle. Le ciblage de l'immunoprophylaxie anténatale que permettrait le groupage génotypique éviterait ces injections d'un produit rare, cher et dont l'origine sanguine humaine laisse toujours planer un doute quant à son innocuité.

Le ciblage permettrait, au demeurant, d'accepter une extension de l'immunoprophylaxie à toutes les femmes Rh négatif, en cours de grossesse, dès lors que le génotypage aurait révélé que le fœtus est Rh positif. On se rapprocherait ainsi de la pratique anglo-saxonne, mais avec l'énorme différence d'une limitation aux seuls cas justifiés.

Mais l'intérêt du génotypage fœtal débordera le champ de la prévention et concernera deux autres domaines.

Tout d'abord celui de la détection de l'immunisation maternelle qui repose sur des recherches itératives d'agglutinines irrégulières au cours de la grossesse des femmes Rh négatif (au moins 4 par grossesse). Limiter le renouvellement aux seules femmes enceintes d'un enfant Rh positif est un objectif médicalement rationnel et dont on pourrait démontrer l'intérêt économique.

Enfin, dans le domaine du suivi des femmes immunisées, il serait utile de pouvoir déterminer le plus tôt possible et d'une manière non invasive si le fœtus est Rh positif ou non. Dans ce dernier cas la surveillance serait allégée.

CONCLUSION

Bien que maîtrisée, l'immunisation fœto-maternelle restera toujours menaçante. Sa prévention par les gammaglobulines ne doit pas faire relâcher la vigilance. Malgré

toute la gratitude qu'on lui doit en raison de son efficacité il ne faut pas sous-estimer les risques potentiels de cette pratique.

En attendant l'apparition probable de produits à effet identique mais d'origine biotechnique, le génotypage Rh fœtal dans le liquide amniotique et plus encore dans le sang maternel nous donne le moyen d'une utilisation plus judicieuse des gamma-globulines.

REMERCIEMENTS

Nous remercions V. de Lachaux pour sa contribution à la présentation orale de cette note.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Colin Y., Cherif-Zahar B., Le Van Kim C., Raynal V., Van Huffel V., Cartron J.P. — Genetic basis of the Rh D positive and Rh negative blood group polymorphisme as determined by Southern analysis. *Blood*, 1991, *78,* 2747-2752.

[2] Brossard Y., Parnet-Mathieu F., Larsen M. — Incompatibilités fœto-maternelles érythrocytaires. *Transfusion sanguine. Une approche sécuritaire.* Lefrere J.J., Rouger P., John Libbey, 2000, 290-318.

[3] Woodrow J.C. — Rh immunisation and its prevention. *Ser Haematol,* 1970, *3,* 3-12.

[4] Kleihauer E., Braun H., Betke K. — Demonstration von Fetalem haemoglobin in den erythrocyten eines Blutausstrichs. *Klin Wschr*, 1957, *35,* 637-638.

[5] Huchet J., Defossez Y., Brossard Y. — Detection of transplacental haemorrage during the last trimester of pregnancy. *Transfusion*, 1988, *28,* 506.

[6] Huchet J., Dallemagne S., Huchet C., Brossard Y., Larsen M., Parnet-Mathieu F. — L'utilisation antepartum de l'immunoglobuline anti-D chez la femme Rh négatif. *J Gynecol Obstet Biol Reprod Paris,* 1987, *16,* 101-111.

[7] Lo Y.M., Hjelm N.M., Fidler C., Sargent I.L., Murphy M., Chamberlain P., Poon P., Redman C., Wainscoat J. — Prenatal diagnosis of fœtal Rh D status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med,* 1998, *339,* 1734-1738.

[8] Aubin J.T., Le Van Kim C., Mouro I., Colin Y., Bignozzi C., Brossard Y. — Specificity and sensitivity of the Rh D genotyping methods by the PCR-based DNA amplification. *Br J* Haematol, 1997, *98,* 356-364.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 337-347, séance du 6 février 2001

Microglie : origine et développement

Microglia : origin and development

Bernard PESSAC *, Isabelle GODIN, Françoise ALLIOT

RÉSUMÉ

La microglie, c'est-à-dire les macrophages intraparenchymateux du système nerveux central, représente environ 10 % de la population cellulaire du cerveau de souris adulte. Nous rapportons ici que des progéniteurs de la microglie peuvent être mis en évidence dans les bourrelets neuraux à partir du 8e jour de l'embryogenèse et qu'ils proviennent du sac vitellin. Nous montrons que la microglie se développe par multiplication dans le tissu cérébral et que la très grande majorité des cellules microgliales apparaît dans les deux semaines qui suivent la naissance. Ces résultats indiquent que la microglie a pour origine des progéniteurs migrant à partir du sac vitellin, pénétrant l'ébauche neurale et s'y multipliant activement.

MOTS-CLÉS : MICROGLIE, cytologie. SYSTÈME NERVEUX CENTRAL. MACROPHAGE. EMBRYOLOGIE. CELLULES SOUCHES. VÉSICULE VITELLINE.

SUMMARY

As suggested by Del Rio Ortega a long time ago, it is now widely accepted that microglia are the resident macrophages of the central nervous system. Microglia represent about 10 % of the adult brain cell population. We have previously shown that the late embryonic and adult mouse brain contain potential microglial progenitors. We report here that microglial progenitors can be detected in neural folds from embryonic day 8. They originate from the yolk sac in which macrophage progenitors are found from embryonic day 7. We also report that the bulk of microglial cells (about 95 %) appear during post-natal development. A major finding is that microglia arise by an intense in situ proliferation comparable to that of neural cells. Taken together, these results show that adult mouse microglia originate from cells migrating from the yolk sac and whose progeny actively proliferates in the brain during development.

KEY-WORDS (Index Medicus) : MICROGLIA, cytology. CENTRAL NERVOUS SYSTEM. MACROPHAGES. YOLK SAC. EMBRYOLOGY. STEM CELLS.

* CNRS — 15 rue de l'École de Médecine — 75270 Paris cedex 06.

Tirés-à-part : Docteur Bernard PESSAC, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 30 juin 2000, accepté le 2 octobre 2000.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 337-347, séance du 6 février 2001

INTRODUCTION

Dans le cadre des rapports entre le système nerveux central (SNC) et le système immunitaire, nous nous sommes intéressés à l'origine des macrophages intraparenchymateux, c'est-à-dire la microglie, qui, chez la souris adulte, représente au moins 10 % du nombre total des cellules de l'encéphale [1]. Il apparaît ainsi que le SNC est l'organe qui, en valeur absolue, est le plus riche en macrophages. Il est donc paradoxal que l'origine et la fonction de ces cellules et leurs relations avec l'ensemble du système immunitaire soient encore très mal définies et fassent l'objet de nombreuses controverses.

Del Rio Ortega fut le premier à suggérer que la microglie pouvait avoir pour origine des macrophages méningés pénétrant le cerveau à la fin du développement embryonnaire [2]. L'immense majorité des auteurs admet maintenant que les cellules microgliales appartiennent au système hémopoïétique et expriment des marqueurs macrophagiques. Ainsi, Perry et *al.* ont montré que chez la souris, les cellules microgliales expriment des antigènes communs avec l'ensemble des macrophages dès le 15e jour du développement embryonnaire [3]. Cependant le site d'origine de la microglie, et le moment précis où elle apparaît dans l'ébauche de l'encéphale ne sont pas encore connus. Pour répondre à ces questions, il est nécessaire de déterminer si la microglie provient :

— soit de progéniteurs pénétrant très tôt l'ébauche du SNC, avant même la mise en place de la circulation sanguine, et proliférant ensuite activement *in situ*. Le site de production de ces progéniteurs pourrait être soit le sac vitellin, soit la splanchnopleure para-aortique, où s'effectue la seconde génération de précurseurs hématopoïétiques [4] ;

— soit de cellules provenant des organes hémopoïétiques (foie, rate et moelle osseuse) et colonisant le SNC de façon continue *via* la circulation durant le développement embryonnaire puis adulte.

Les réponses à ces questions permettraient de savoir si la microglie embryonnaire et la microglie adulte ont une origine distincte ou commune et donc si la microglie adulte dérive de la microglie embryonnaire.

L'observation qui a suscité notre intérêt quant à l'origine de la microglie a été la démonstration de la présence, dans le cerveau de souris en fin de développement et adulte, de cellules que nous avons qualifiées de progéniteurs potentiels de la microglie [5]. En effet, nous avons mis en évidence la présence d'un petit nombre de cellules (environ $15x10^3$) dans l'encéphale de la souris adulte, qui, dans nos conditions expérimentales, sont capables de proliférer très intensément *in vitro*, chacun de ces progéniteurs donnant naissance à environ $2x10^5$ cellules. Celles-ci ont un phénotype comparable à celui de la microglie adulte, caractérisé par l'expression de marqueurs macrophagiques classiques tels qu'un récepteur du complément et les antigènes Mac-1 et F4/80.

Ces données suggéraient que le SNC contient des progéniteurs capables de donner naissance à la microglie. Nous avons donc entrepris des expériences afin de déterminer la date d'apparition des progéniteurs de la microglie dans l'ébauche neurale en comparaison avec la présence de progéniteurs de type macrophagique dans les deux premiers sites d'hémopoïèse apparaissant au cours du développement, le sac vitellin et la splanchnopleure para-aortique. Nous avons ensuite étudié la capacité des progéniteurs de la microglie et de leur descendance à proliférer *in situ* dans le SNC.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

— **Souris** : les embryons sont datés en fonction de leur morphologie générale et du nombre de somites. La dissection du sac vitellin a été effectuée comme décrit [6]. L'encéphale a été prélevé à partir du 7^{e} jour embryonnaire (bourrelets neuraux) jusqu'à l'âge adulte.

— Pour mettre en évidence des progéniteurs de la microglie ou des macrophages, des suspensions unicellulaires ont été préparées à partir du SNC et du sac vitellin à divers stades du développement et mises en co-cultures, comme rapporté précédemment [5] ;

— **Les anticorps primaires** suivants ont été utilisés :
- pour la mise en évidence des caractères microgliaux/macrophagiques les anticorps monoclonaux Mac-1 (Caltag code RM2800) et F4/80 (Caltag code RM2900) ;
- pour la mise en évidence des cellules en prolifération, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal anti-PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), clone PC10 (Dako code M 0879).

— **Les anticorps secondaires** ont été la fraction F(ab')2 anti-IgG (H+L) conjuguée soit à la R — phycoérythrine (R-PE) soit à la fluorescéine (FITC) : les sérums suivants ont été utilisés : sérum de chèvre anti-rat-FITC (Caltag code R 40101) ; sérum de chèvre anti-rat-R-PE (Caltag code R40104) ; sérum de chèvre anti-souris FITC (Immunotech code 0219a) ou, enfin, sérum de lapin anti-souris R-PE (Dako code R 0439).

— **Immunohistochimie** : après anesthésie, les souris adultes ont été perfusées avec une solution de Hanks puis une solution de périodate-lysine-paraformaldéhyde (2 %) (PLP) [3]. Les cerveaux ont été post-fixés dans la même solution pendant 4 heures, incubés dans une solution de sucrose à 20 % pendant 18 heures puis inclus dans du « Tissue-Tek ». Après congélation rapide, nous avons effectué des coupes parasagittales de 6 μm. Les jeunes embryons et les ébauches de SNC ont été directement plongés dans la solution de PLP puis traités comme les cerveaux adultes. Après décongélation, les coupes ont été incubées avec les anticorps monoclonaux Mac-1 ou F4/80 dilués au 1/20^{e}. Pour les doubles marquages avec l'anticorps anti-PCNA (dilué au 1/50^{e}), les coupes ont été prétraitées avec un

mélange méthanol-acétone 7/3 (V/V) pendant 5 minutes puis incubées avec les anticorps secondaires correspondants FITC et R-PE dilués au 1/50e pendant 3 heures.

— **Double immunomarquage des suspensions de cellules cérébrales** : les cerveaux, débarrassés des méninges et des plexus choroïdes, ont été coupés en très petits morceaux puis incubés avec une solution de 0,25 % de trypsine dans du versène 1 : 5000 comprenant 10 μg/ml de collagénase type VII-S. Après 30 min à 37° C, les fragments ont été dissociés par pipettage dans du milieu de Eagle contenant du sérum et centrifugés. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans du paraformaldéhyde à 4 % et les cellules dissociées ont été ensuite cytocentrifugées à 400 tr/min pendant 4 minutes. L'immunomarquage a été effectué ensuite en les incubant pendant 18 heures avec l'anticorps F4/80 et le deuxième anticorps correspondant pendant 3 heures. Après ce premier immunomarquage, les cellules ont été incubées 5 min dans l'éthanol à 95 %, puis 18 heures avec l'anticorps anti-PCNA et enfin avec le 2e anticorps correspondant.

RÉSULTATS

Origine

Nous avons utilisé pour cette étude le paradigme qui nous a permis de mettre en évidence les progéniteurs de la microglie. Ceux-ci ont été définis comme des cellules isolées à partir du SNC, qui adhérent à des couches de cellules astrocytaires et prolifèrent très vigoureusement pour donner naissance à des colonies contenant environ 2 x 10^5 cellules exprimant des marqueurs macrophagiques/microgliaux [5]. Nous avons d'abord établi le stade exact auquel apparaissent ces progéniteurs, en utilisant des suspensions de cellules d'ébauches du SNC préparées à différents temps du développement, à partir du 7e jour de gestation (jdg). Au stade pré-somitique, aucun progéniteur n'est détecté dans les bourrelets neuraux. Le premier progéniteur microglial n'apparaît qu'au stade 4-8 somites, au début du 8e jdg. A ce stade, le seul site d'hémopoïèse active est le sac vitellin [6]. Pour déterminer s'il contient des progéniteurs macrophagiques/microgliaux, nous avons co-cultivé des suspensions de cellules, isolées à partir du sac vitellin, sur des couches de cellules astrocytaires. Nous avons ainsi pu observer que le sac vitellin contient des progéniteurs de type macrophagique, dès le 7e jdg, donc avant qu'ils n'apparaissent dans l'ébauche neurale. Puis, en quelques heures, dès le stade 11-14 somites, le nombre de progéniteurs microgliaux augmente significativement alors que le nombre de progéniteurs macrophagiques du sac vitellin continue de s'accroître de façon exponentielle (Fig. 1).

Par la suite le nombre de progéniteurs microgliaux augmente très rapidement, atteint un plateau vers le 15e jdg et persiste tout au long de la vie adulte [5]. Ces résultats indiquent que les progéniteurs de la microglie envahissent précocement

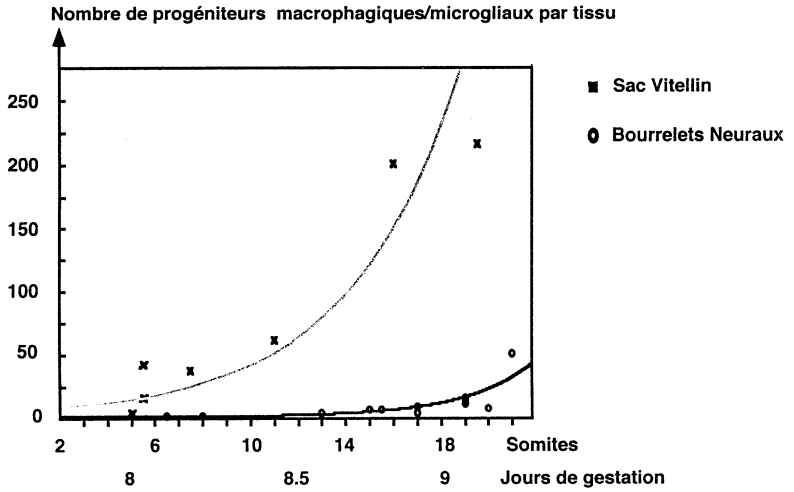


FIG. 1. — Comparaison de la cinétique de prolifération des progéniteurs macrophagiques du sac vitellin et des progéniteurs microgliaux de l'ébauche neurale. Des suspensions unicellulaires du sac vitellin ou de l'ébauche neurale ont été cocultivées sur des monocouches astrocytaires et le nombre de clones compté après 3 à 6 semaines.

l'ébauche du SNC, avant l'établissement de la circulation, par migration à partir du sac vitellin.

Nous avons ensuite déterminé la localisation des premières cellules microgliales dans l'ébauche du SNC. Le premier stade auquel cette étude a été possible est le 10^{e} jdg. L'immunohistologie avec un anticorps spécifique des macrophages et de la microglie a montré la présence de nombreuses cellules positives dans l'ébauche de la tête, localisées pour la plupart dans le mésenchyme lâche qui entoure le neuro-épithélium. Cependant, dès ce stade, on peut voir des cellules marquées qui semblent migrer dans le neuro-épithélium à partir du mésenchyme (Fig. 2). Le nombre de cellules microgliales augmente ensuite considérablement. Elles sont présentes dans l'ensemble de l'encéphale avec une répartition relativement homogène dans les substances grise et blanche. Il est à noter qu'on observe peu de cellules macrophagiques à la proximité des vaisseaux.

Développement

Dans un premier temps, il a été nécessaire d'établir la cinétique d'apparition de la microglie. Des suspensions cellulaires ont donc été préparées à partir du cerveau de souris et les cellules marquées avec un anticorps spécifique de la microglie. Ceci nous a permis de déterminer le nombre de cellules microgliales par encéphale à différents stades du développement (Tableau 1). Le fait majeur est leur augmentation très rapide de la naissance (0,6 x10^{6}) au stade adulte (13,5 x10^{6}). Ainsi, l'immense

TABLEAU 1. — Cinétique d'apparition de la microglie

STADE DU DÉVELOPPEMENT (en jours)	nombre total de cellules/encéphale (x 106)	nombre de cellules microgliales/ encéphale (x 10^6)
GESTATION		
16	20	0,140
18	21	0,350
POSTPARTUM		
0	35	0,6
7	100	3,1
11	125	8,75
12	128	9,3
14	130	9,5
ADULTE	135	13,5

A chaque âge indiqué, les encéphales ont été dissociés en suspensions unicellulaires incubées avec l'anticorps Mac-1 ou F4/80 comme indiqué dans « Matériels et Méthodes ». La très grande majorité (~95 %) des cellules microgliales apparaît après la naissance.

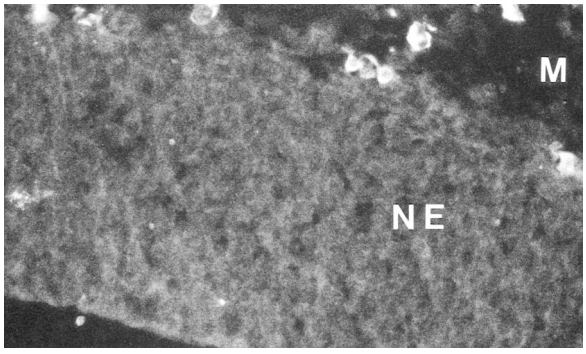


FIG. 2. — Immunomarquage des cellules microgliales (F4/80 +) sur des coupes d'ébauches neurales au 10e jdg. Les cellules F4/80 + sont nombreuses dans le mésenchyme (M). Certaines ont pénétré dans le neuroépithélium (NE). Grossissement X440.

majorité (95 %) des cellules microgliales apparaît après la naissance, c'est-à-dire après la fermeture de la barrière hémato-encéphalique.

Quelle est l'origine de la microglie adulte ? Dérive t-elle de progéniteurs potentiels, présents dans les bourrelets neuraux dès le 8e jour du développement embryonnaire, et se multipliant ensuite *in situ* ? S'il en est ainsi, un grand nombre de cellules microgliales doivent être en état de prolifération pendant le développement. Pour vérifier cette hypothèse, des suspensions de cellules cérébrales ont été doublement marquées avec l'anticorps F 4/80 spécifique de la microglie et avec un marqueur de prolifération cellulaire qui détecte la protéine PCNA, exprimée seulement par des cellules en multiplication [7]. Il a été ainsi possible d'identifier et de compter deux populations cellulaires, l'une doublement marquée qui représente les cellules microgliales en prolifération, l'autre n'exprimant que le PCNA et qui représente l'ensemble des cellules neurales en mitose à l'exception de la microglie. Les résultats de ces expériences, résumés dans le Tableau 2, ont été très clairs : dès le 16e jdg, premier temps auquel ces expériences ont pu être réalisées, plus de la moitié des cellules microgliales exprime l'antigène de prolifération. Pendant la semaine qui suit la naissance, un peu moins de la moitié de toutes les cellules (microgliales ou non) sont encore en multiplication. En revanche, lors de la 2e semaine postnatale, la proportion de cellules neurales qui se divisent chute brutalement alors que le pourcentage de cellules microgliales en prolifération ne diminue que progressivement.

En résumé, l'immense majorité des cellules microgliales apparaît après la naissance, c'est-à-dire après la fermeture de la barrière hémato-encéphalique. Au moins dans leur très grande majorité, les cellules microgliales du cerveau adulte proviennent donc de progéniteurs qui prolifèrent activement *in situ*.

DISCUSSION

L'appartenance des cellules microgliales à un lignage dérivé du mésoderme est reconnue par l'immense majorité des auteurs. Alors que la présence de la microglie chez l'embryon a été mise en évidence depuis longtemps, le stade auquel apparaissent les premières cellules de type microglial et leur origine était resté indéterminé, du moins chez les mammifères. La question de l'origine de la microglie adulte est aussi controversée. Alors que beaucoup d'auteurs considèrent que les précurseurs immédiats de la microglie adulte sont des monocytes circulants, provenant de la moelle osseuse, qui pénètrent progressivement le SNC par la circulation sanguine d'une manière comparable par exemple aux macrophages péritonéaux et aux cellules de Langerhans de la peau [8], ces auteurs ne semblent pas tenir compte de l'existence de la barrière hémato-encéphalique que l'on considère cependant imperméable aux cellules sanguines dans les conditions physiologiques [9].

Les résultats de nos expériences montrent, pour la première fois, que des cellules à phénotype macrophagique sont présentes très tôt dans l'ébauche du SNC puisqu'on

TABLEAU 2. — Prolifération des cellules microgliales dans l'encéphale au cours du développement en comparaison avec l'ensemble des cellules cérébrales.

STADE DE DEVELOPPEMENT (en jours)	% de cellules en prolifération dans l'encéphale	% de cellules microgliales en prolifération
GESTATION		
16	43	58
POSTPARTUM		
0	50	45
3	34	39
7	33	37
11	3,2	23
12	1,3	12
14	1	4

Pour déterminer la proportion de cellules microgliales en prolifération, les suspensions de cellules encéphaliques ont été incubées avec l'anticorps F4/80 (spécifique de la microglie) et avec l'anticorps anti-PCNA (qui marque l'ensemble des cellules en prolifération). Seules les cellules microgliales en prolifération sont doublement marquées. Au cours de la phase postnatale du développement, la proportion de cellules en prolifération parmi les cellules microgliales diminue beaucoup plus lentement que dans l'ensemble des cellules encéphaliques.

les détecte, dans les bourrelets neuraux, au 8e jour du développement embryonnaire. Ces premiers progéniteurs potentiels de la microglie proviennent très probablement du sac vitellin, qui, à ces stades précoces, est en continuité directe avec les bourrelets neuraux : en effet, les progéniteurs macrophagiques sont mis en évidence dans le sac vitellin plusieurs heures avant leur apparition dans l'ébauche neurale. Nos résultats sont en accord avec les observations faites par d'autres auteurs chez les oiseaux [10, 11].

L'augmentation rapide du nombre de progéniteurs potentiels de la microglie qui atteint son maximum vers le quinzième jour embryonnaire et leur phénotype — capacité très intense de prolifération *in vitro* et expression de marqueurs macrophagiques/microgliaux — nous ont amenés à formuler l'hypothèse selon laquelle ces progéniteurs donneraient naissance, *in situ*, à la microglie adulte. Nos résultats sont parfaitement en accord avec cette hypothèse puisqu'ils montrent que les cellules microgliales prolifèrent intensément dans l'encéphale. Nos données vont donc à l'encontre de l'opinion des auteurs qui admettent que la microglie dérive des monocytes sanguins circulants.

Récemment, divers auteurs ont abordé la question de l'origine de la microglie avec un paradigme où des animaux irradiés ont été inoculés avec des cellules hémopoïé-

tiques dont le génotype est différent de celui des receveurs. Même un an après la transplantation, seule une très faible proportion de cellules microgliales intraparenchymateuses exprime le phénotype des cellules du donneur. Cependant, dans ces expériences, les cellules macrophagiques périvasculaires expriment, elles, en grand nombre, le phénotype des cellules du donneur, indiquant que, au moins dans les conditions imposées par les protocoles expérimentaux, un certain nombre de cellules circulantes traversent les parois vasculaires et se localisent à la périphérie des vaisseaux cérébraux, suggérant que la microglie périvasculaire pourrait, elle, provenir de monocytes circulants [12, 13].

En conclusion, nous avons montré que, chez la souris, les progéniteurs de la microglie sont présents à un stade très précoce du développement, c'est-à-dire dès l'apparition des bourrelets neuraux. Ceux-ci sont contigus avec le sac vitellin qui lui-même contient déjà de nombreux précurseurs macrophagiques. A ce stade, la circulation sanguine n'est pas encore établie. Le lieu d'origine le plus probable des progéniteurs de la microglie est donc le sac vitellin. Le fait qu'environ la moitié des cellules microgliales est en prolifération pendant la plus grande partie du développement indique clairement que la microglie intraparenchymateuse adulte est le résultat de la multiplication de ces progéniteurs. Ceci n'exclut pas que certaines cellules microgliales intra-parenchymateuses puissent provenir de cellules monocytaires circulantes, comme cela semble être le cas pour la microglie périvasculaire, au moins dans certaines conditions expérimentales. Ainsi, bien que faisant partie du système hémopoïétique, les cellules microgliales auraient une origine plus primitive que les autres types de cellules macrophagiques. Ceci pourrait expliquer le fait que de nombreux auteurs ont montré que certaines des propriétés des cellules microgliales sont différentes de celles d'autres macrophages [14, 15].

Des données comparables à celles mises en évidence chez la souris n'ont pas encore été montrées chez l'Homme, bien que cela paraisse hautement probable. S'il en est ainsi, ces données auraient d'importantes conséquences sur la physiopathologie d'affections cérébrales (telles que le neurosida) ainsi que sur les modalités d'éventuelles thérapies géniques.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Lawson L.J., Perry V.H., Dri P., Gordon S. — Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 1990, *39*, 151-170.

[2] Rio-Hortega P. — Microglia. Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System W. Penfield. New York : Paul bv. Hoeber, 1932, 482-534.

[3] Perry V.H., Hume D.A., Gordon S. — Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 1985, *15*, 313-326.

[4] Godin I., Dieterlen-Lievre F., Cumano A. — Emergence of multipotent hematopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryo, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, *92*, 773-777.

[5] Alliot F., Lecain E., Grima B., Pessac B. — Microglial progenitors with a high proliferative capacity in the embryonic and the adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, *88*, 1541-1545.

[6] Moore Mas., Metcalf D. — Ontogeny of the haematopoietic system : yolk sac origin of *in vivo in vitro* colony forming cells in the developing mouse embryo. *Brit. J. Haematol*., 1970, *18*, 279-296.

[7] Bravo R., Fey S.J., Bellatin J., Larsen P.M., Arevalo J., Celis J.E. — Identification of a nuclear and a cytoplasmic polypeptide whose relative proportion are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. *Expl. Cell. Res*., 1981, *136*, 311-319.

[8] Ling E.A. — Transformation of monocytes into amoeboid microglia in the corpus callosum of postnatal rats, as shown by labelling monocytes by carbon particles. *J. Anat.,* 1979*, 128*, 847-858.

[9] Bauer H.C., Bauer H., Lametschwandtner A., Amberger A., Ruiz P., Steiner M. — Neovascularization and the appearance of morphological characteristics of the blood-brain barrier in the embryonic mouse central nervous system. *Develop. Brain Res.*, 1993, *75*, 269-278.

[10] Cuadros M.A., Martin C., Coltey P., Almendros A., Navascues J. — First appearance, distribution and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 1993, *330*, 113-129.

[11] Kurz H., Christ B. — Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors. *Glia*, 1998, *22,* 98-102.

[12] Hickey W.F., Kimura H. — Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen *in vivo*. *Science*, 1988, *239*, 290-292.

[13] Kennedy D.W., Abbowitz J.L. — Kinetics of Central nervous system microglial and macrophage engraftment : analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood,* 1997, *90*, 986-993.

[14] Eder C., Klee R., Heinemann U. — Distinct soluble astrocytic factors induce expression of outward K^+ currents and ramification of brain macrophages. *Neurosci. Lett.,* 1997, *226*, 147-150.

[15] White C.A., Mccombe P.A., Pender M.P. — Microglial are more susceptible than macrophages to apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis through a mechanism not involving Fas (CD95). *Int. Immunol.*, 1998, *10*, 935-941.

DISCUSSION

M. Michel BOUREL

Quelles affections ont pour origine une anomalie (constitutionnelle ou proliférative) du système microglial ?

Les microgliomes décrits autrefois sont en fait des lymphomes. Cependant, la très grande majorité des affections du système nerveux central, infectieuses telles que le sida ou dégénératives telles les maladies d'Alzheimer ou de Creutzfeldt-Jacob, s'accompagne d'une réaction microgliale, en particulier proliférative.

M. André-Laurent PARODI

Les cellules microgliales sont-elles considérées actuellement comme post-mitotiques définitives, où, à l'inverse, les considère-t-on comme capables de se diviser tout au long de la vie ?

L'immense majorité des cellules microgliales est probablement post-mitotique de façon définitive. Cependant, les progéniteurs potentiels de la microglie, qui persistent tout au long de la vie adulte et représentent environ 1/1000^{e} de la microglie, ont, au moins *in vitro*, une capacité de prolifération considérable, pouvant donner naissance à des clones de 100 000 cellules et plus.

M. Jean-Jacques HAUW

Les morphologistes ont toujours été frappés par le caractère focal, très bien limité, des lésions de la sclérose en plaques. La démyélinisation y est effectuée par des cellules de la lignée microglie macrophage. Connaissez-vous le territoire occupé par les différents clones de cellules microgliales que vous avez décrits ?

Les progéniteurs potentiels de la microglie sont répartis sur l'ensemble du système nerveux central, avec peut-être une plus grande densité dans la substance blanche. Il est possible que le caractère focal des lésions de la sclérose en plaques soit le reflet du territoire occupé par la descendance d'un progéniteur.

M. Gabriel BLANCHER

Les cellules microgliales, dont le développement paraît incontestablement original, ont-elles également un rôle physiologique original ?

Les études sur un rôle physiologique des cellules microgliales sont essentiellement réalisées *in vitro* et leurs résultats sont contradictoires, en particulier quant à leurs effets sur les neurones. Cependant, certains travaux suggèrent que les cellules microgliales pourraient avoir des propriétés différentes de celles des autres types de macrophages.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, n° 2, 349-372, séance du 20 février 2001

Neurostéroïdes, leur rôle dans le fonctionnement du cerveau : neurotrophicité, mémoire, vieillissement...

Neurosteroids, a new function in the brain : neurotrophicity, memory, ageing...

Étienne-Émile BAULIEU *

RÉSUMÉ

Certains stéroïdes, appelés neurostéroïdes, sont synthétisés par des neurones et des cellules gliales dans les systèmes nerveux central et périphérique. L'étude de la synthèse, du métabolisme, du mode d'action et des effets des neurostéroïdes est un domaine de recherche dont les applications cliniques commencent à émerger. Alors que la synthèse des neurostéroïdes dans le cerveau et les nerfs périphériques est maintenant bien établie, sa régulation est mal connue et reste à explorer. Plusieurs études récentes montrent que l'expression et l'activité des enzymes qui interviennent dans la formation des neurostéroïdes sont régulées par des interactions cellulaires, mais les molécules impliquées ne sont pas encore identifiées (par exemple le facteur neuronal qui induit la synthèse de la progestérone dans les cellules de Schwann). Les mécanismes impliqués mettent en jeu des récepteurs intranucléaires de type classique, des récepteurs membranaires, en particulier ceux de plusieurs neurotransmetteurs dont les neurostéroïdes sont des modulateurs du fonctionnement, et, observation toute récente, une protéine des microtubules. Les effets psychopharmacologiques ont été étudiés surtout chez l'animal, en particulier sur la mémoire, l'anxiété et le sommeil, et des activités neurotrophiques mises en évidence dans des processus de régénération nerveuse. Par exemple, le sulfate de prégnènolone a une activité promnésiante chez le rat âgé permettant d'annuler le déficit mnésique (spatial) du vieillissement, la progestérone favorise la formation réparatrice de gaines de myéline après lésion du nerf sciatique, et la prégnènolone stimule la polymérisation de microtubules neuronaux et donc potentiellement la plasticité du système nerveux. Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de neurostéroïdes pour la meilleure compréhension et le traitement de certaines lésions et déficits du système nerveux.

MOTS-CLÉS : FACTEUR ÂGE. STÉROIDES, biosynthèse. PRÉGNÈNOLONE. PROGESTÉRONE. PRASTÉRONE. RÉCEPTEUR GABA-A. MÉMOIRE. PROTÉINE MYÉLINE , génétique. CELLULE SCHWANN. RÉCEPTEUR SUBSTANCES ENDOGÈNES.

* U488 Inserm et Collège de France. 80, rue du Général Leclerc — 94276 Kremlin-Bicêtre.
Tel : 01 49 59 18 82 — Fax : 01 45 21 19 40 — Email : baulieu@kb.inserm.fr.

Tirés-à-part : Professeur Étienne-Émile BAULIEU, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 7 août 2000, accepté le 2 octobre 2000.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 349-372, séance du 20 février 2001

SUMMARY

Some steroids, named neurosteroids, can be synthesized in the central and peripheral nervous system by neurons and glial cells. The study of their synthesis, metabolism, mechanisms of action and effects represents an expanding area of research and important progress has been made over the past few years. Although the synthesis of neurosteroids in the brain and in peripheral nerves is now well established, its regulation has not been explored very much. A few recent studies show that the expression and the activity of enzymes involved in neurosteroid synthesis are regulated by cellular interactions, but the molecules which are involved remain to be identified (as for instance a neuronal factor inducing the synthesis of progesterone in Schwann cells). Research is now turning towards the functions of neurosteroids. Their mechanisms of action involve nuclear receptors, membrane receptors (particularly those affecting the function of neurotransmitters), and a recently discovered direct activity on microtubule-associated protein and tubulin polymerisation. Several recent studies have described psychopharmacological effects of neurosteroids, in particular on memory, anxiety and sleep as well as their role in regeneration. Thus, pregnenolone stimulates polymerisation of neuronal microtubules, pregnenolone sulfate has promnesic effects and progesterone promotes the formation of new myelin sheaths. Neurosteroid and analogues may therefore become useful to treat diseases and lesions of the nervous system.

KEY-WORDS (Index Medicus) : AGE FACTORS. STEROIDS, biosynthesis. PREGNENOLONE. PROGESTERONE. PRASTERONE. RECEPTORS GABA-A. MEMORY. MYELIN PROTEINS, genetics. SCHWANN CELLS. RECEPTORS, CELL SURFACE.

INTRODUCTION

Le terme « neurostéroïdes » a été proposé, pour désigner les stéroïdes qui peuvent être synthétisés dans le système nerveux à partir du cholestérol [1]. Au départ, l'hypothèse d'une biosynthèse locale de stéroïdes dans les tissus nerveux fut basée sur l'observation que la déhydroépiandrostérone (DHEA) et la prégnènolone (PREG), sous leurs formes libres ou ester sulfates, restaient présentes dans le cerveau de rat à des concentrations élevées après suppression de leurs sources classiques potentielles, gonades et surrénales [2-3]. Il a fallu plusieurs années pour démontrer que les enzymes impliquées dans la synthèse des neurostéroïdes sont présentes et actives dans le cerveau et les nerfs périphériques [4]. Le terme « neurostéroïdes » ne réfère pas à une catégorie chimique particulière de stéroïdes, mais seulement à leur lieu de synthèse, le système nerveux. Par exemple, la progestérone (PROG) peut être considérée comme un neurostéroïde lorsqu'elle est synthétisée dans le cerveau ou les nerfs périphériques, alors que c'est une hormone sexuelle lorsqu'elle est produite par les ovaires ou le placenta.

Le concept de neurostéroïdes n'a vraiment émergé que récemment [revues dans 5]. Il y a plusieurs explications à l'évolution lente des recherches :

— bien qu'ils puissent être présents dans le cerveau à des concentrations supérieures à celles du plasma, permettant leur évaluation dans de larges fractions du

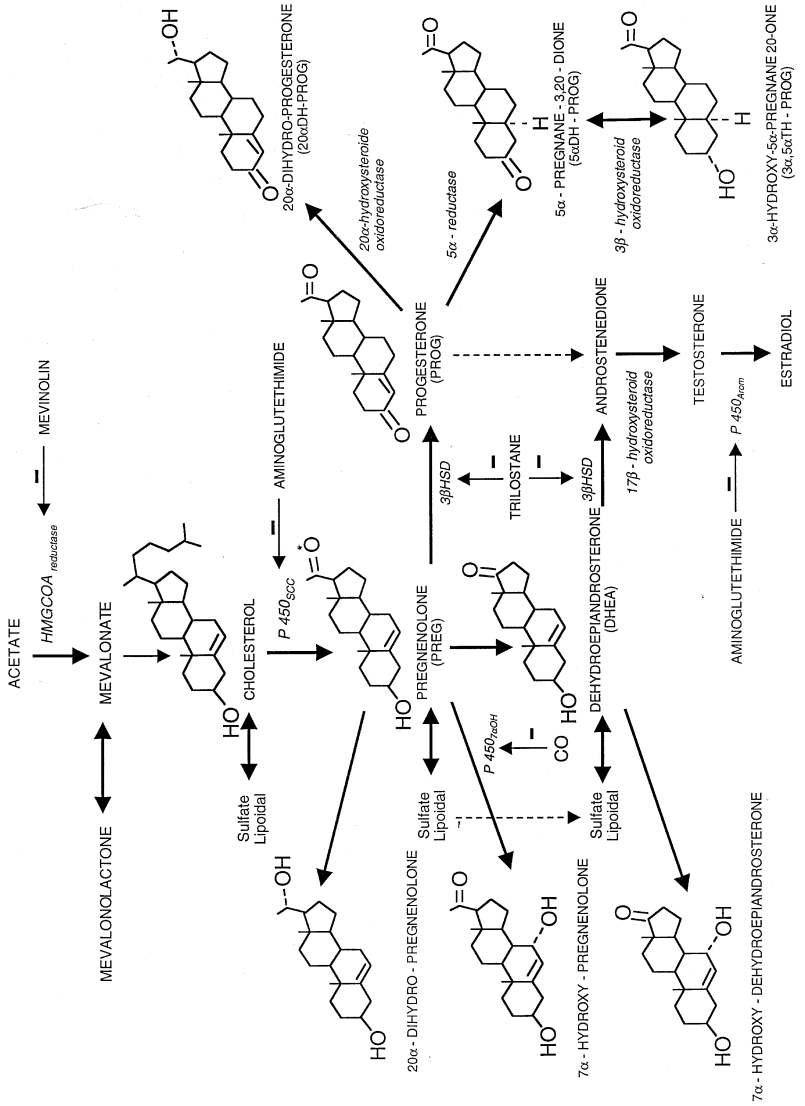


FIG. 1. — *Voies principales de la biosynthèse et du métabolisme des stéroïdes dans le système nerveux*. Tous les stéroïdes sont des dérivés du cholestérol. Le cytochrome P450scc (scc pour *side chain cleavage*) coupe la chaîne latérale de 6 carbones du cholestérol et la prégnènolone ainsi formée est le précurseur de toutes les hormones stéroïdes. La présence dans le système nerveux du cytochrome P450c17, qui peut convertir la prégnènolone en déhydroépiandrostérone et la progestérone en androstènedione est toujours sujet à controverse (3β-HSD : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase ; 3α-HSOR : 3α-hydroxystéroïde oxydoréductase ; 17β-HSOR : 17β-hydroxystéroïde oxydoréductase). Les symboles négatifs (—) indiquent une annulation de la fonction enzymatique correspondante par le produit indiqué. La figure résume de nombreuses transformations métaboliques qui ne sont pas toutes décrites dans le texte.

tissu nerveux par des méthodes radio-immunologiques conventionnelles, les neurostéroïdes sont difficiles à identifier et à mesurer dans les régions discrètes où ils sont censés agir. Une nouvelle méthodologie, basée sur la spectrométrie de masse, permet maintenant d'analyser et de quantifier des stéroïdes dans des régions précises du cerveau [6-7] ;

— les stéroïdes présents dans le système nerveux peuvent provenir d'une synthèse locale ou de la circulation sanguine. En effet, la majorité des stéroïdes sécrétés par les glandes endocrines, à l'exception des esters-sulfates, traversent facilement la barrière hémato-encéphalique. Il est alors difficile de distinguer entre les fonctions des neurostéroïdes synthétisés localement et celles des composés stéroïdes circulant ;

— une fois qu'une « étiquette » a été attribuée à une molécule, il est difficile d'en changer. Les stéroïdes étaient considérés comme des hormones sexuelles (androgènes, oestrogènes et progestogènes) ou d'adaptation de l'organisme au stress (glucocorticostéroïdes), il fallait admettre qu'ils puissent avoir *in situ* un rôle important dans le fonctionnement du système nerveux [8].

BIOSYNTHÈSE DES NEUROSTÉROÏDES

Synthèse de la prégnènolone (PREG) et de la progestérone (PROG)

La première étape dans la biosynthèse des stéroïdes correspond à la formation de PREG à partir du cholestérol. Elle est catalysée par une enzyme située au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, le cytochrome P450scc, qui, associé à l'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase coupe la chaîne latérale de 6 carbones du cholestérol (Fig. 1). La présence du P450scc, caractéristique de toutes les cellules stéroïdogènes, a été démontrée dans le système nerveux de différentes classes de vertébrés : amphibiens [9], oiseaux [10] et mammifères, y compris l'homme [4, 11]. Elle est exprimée et active dans les principaux types cellulaires du système nerveux, incluant les oligodendrocytes, les cellules de Schwann, des astrocytes de type 1 et des neurones [12, 13].

La PREG est ensuite convertie en PROG dans le réticulum endoplasmique par la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3β-HSD) [13-17]. Pour certains auteurs, un complexe P450scc — 3β-HSD peut exister dans la mitochondrie [13, 14, 18]. Si on bloque la conversion de la PREG en PROG en injectant un inhibiteur de la 3β-HSD, le trilostane, on observe une accumulation de la PREG dans le cerveau et dans les nerfs périphériques des animaux [19, 20]. La PROG peut être métabolisée en 5α-dihydroprogestérone (5α-DH PROG) par la 5α-réductase et en 3α,5α-tétrahydroprogestérone (3α,5α-TH PROG), connue également sous le nom d'alloprégnanolone, par la 3α-hydroxystéroïde oxydoréductase (3α-HSOR). L'activité de cette dernière semble restreinte aux cellules gliales [17, 21].

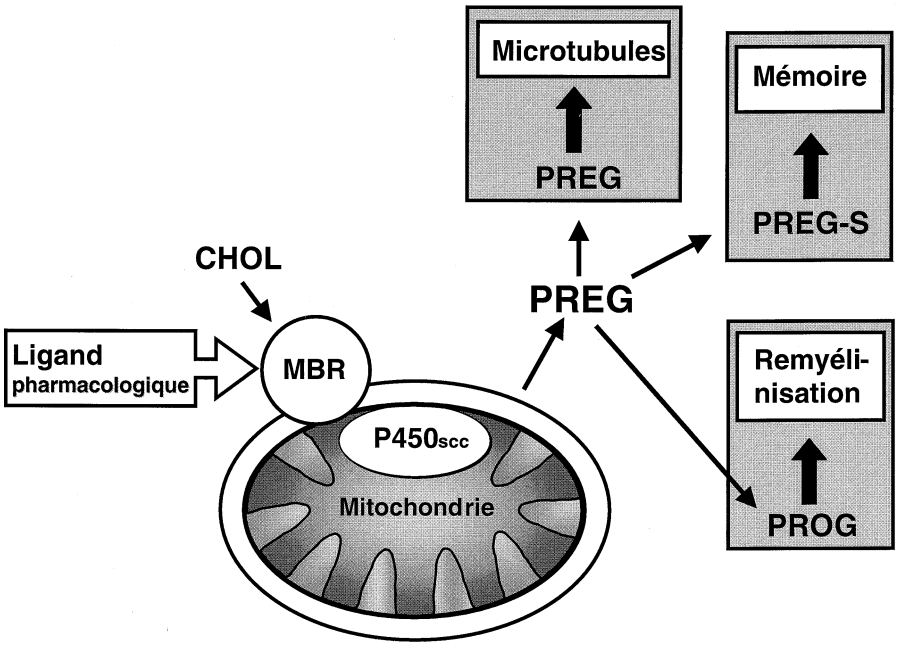


FIG. 2. — *Récepteur périphérique des benzodiazépines* (MBR, mitochondrial benzodiazepin receptor au lieu de PBR, peripheral benzodiazepin receptor employé souvent par les pharmacologistes et dans le texte) *et synthèse de la prégnènolone*. Le MBR permet le passage du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie, où est localisé le cytochrome P450scc au niveau de la membrane interne. Cette enzyme catalyse la conversion du cholestérol en prégnènolone. Des agonistes du MBR augmentent le transport du cholestérol et par conséquent la biosynthèse de la prégnènolone. Cette figure schématise trois types d'activités de la prégnènolone : 1/ *via* la formation de progestérone et le récepteur de celle-ci pour un effet de réparation de la myéline ; 2/ *via* la transformation de sulfate de prégnènolone qui module le fonctionnement des récepteurs du GABA et NMDA avec effet sur la mémoire ; 3/ apparemment direct par interaction avec MAP2 (voir le texte), agissant sur la polymérisation de la tubuline.

Synthèse de la déhydroépiandrostérone (DHEA)

La mise en évidence d'une conversion de la PREG en DHEA dans le système nerveux et de l'enzyme correspondante, le cytochrome P450c17 (Fig. 1), a posé de nombreux problèmes, paradoxalement puisque la DHEA avait été le premier stéroïde dont l'accumulation dans le cerveau en absence de glandes stéroïdogènes avait été démontrée [2, 22]. Plusieurs études récentes proposent une issue à cette impasse. L'une invoque une voie distincte de celle présente dans les glandes endocrines, ne nécessitant pas la présence du P450c17, mais suggérant une réaction chimique faisant intervenir la formation d'hydroperoxydes [23]. Deux autres rapportent la présence d'ARNm codant pour le P450c17 dans le cerveau de rongeurs et dans

plusieurs types cellulaires y compris au cours du développement [24-26]. Une autre étude montre la synthèse à partir de la PREG de DHEA par les astrocytes et les neurones de cortex en culture en l'absence de microglie [27].

Autres voies métaboliques

D'autres dérivés neurostéroïdiens ont été démontrés, 7α-hydroxylés [28-30] et acyl-esters [31], de fonction inconnue. La formation de sulfates (S) est catalysée par une hydroxystéroïde sulfotransférase, décrite en particulier chez l'amphibien [32, 33], ainsi que leur hydrolyse par une sulfatase.

RÉGULATION DE LA BIOSYNTHÈSE DES NEUROSTÉROÏDES

Récepteur périphérique des benzodiazépines

Une étape limitante de la stéroïdogenèse se situe au niveau du passage du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie. Une protéine de la membrane mitochondriale externe a été impliquée dans son transport, il s'agit du récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR pour peripheral benzodiazepine receptor). Celui-ci est distinct du récepteur central des benzodiazépines, car il n'est pas associé aux récepteurs $GABA_A$ et reconnaît des ligands sélectifs différents ; il semble fonctionner comme un canal à cholestérol [35]. Dans les cellules de gliome C6 de rat, il a été montré que des agonistes du PBR, comme le Ro5-4864, stimulent la biosynthèse de la PREG [35] (Fig. 2). Un rôle du PBR dans la synthèse des neurostéroïdes a également pu être démontré *in vivo* : après injection intraveineuse d'un agoniste du PBR à des rats castrés et surrénalectomisés, les concentrations cérébrales de PREG augmentant de 70-100 % en quelques minutes seulement [36].

Les endozépines sont des ligands endogènes du PBR et sont produites en quantités importantes dans le système nerveux. Le terme désigne le *diazepam-binding inhibitor* (DBI) et les peptides dérivés de son clivage, en particulier le triakontatétraneuropeptide (TTN) et l'octadécaneuropeptide (ODN). Plusieurs laboratoires tentent d'identifier d'autres protéines du système nerveux qui lient le PBR, et l'une est appelée *peripheral benzodiazepine receptor-associated protein 1* (PRAX-1), exprimée dans le cerveau, abondamment dans la sous-région CA1 de l'hippocampe [37].

Comme les neurostéroïdes exercent des effets protecteurs et trophiques dans le système nerveux, l'augmentation de leur biosynthèse *via* l'activation du PBR pourrait favoriser les processus de régénération après lésion ou au cours de maladies. Dans les nerfs périphériques, le PBR et les peptides dérivés du DBI sont présents dans les cellules de Schwann [38]. Après lésion, le nombre de sites PBR et les taux d'endozépines sont augmentés dans le nerf sciatique du rat et retournent à des valeurs normales lorsque le processus de régénération est terminé [21]. L'expression du PBR est également augmentée de façon importante dans le cerveau des souris

dysmyéliniques Jimpy et Shiverer au niveau des astrocytes réactifs. Ceci pourrait expliquer les concentrations élevées de PROG chez ces mutants [39]. Il est intéressant de noter que la liaison du [^{3}H]PK11195 aux sites PBR est également augmentée au niveau des lésions démyélinisantes au cours de la sclérose en plaques [40].

Protéine StAR

Une deuxième protéine, qui joue un rôle important dans le transport du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie des cellules stéroïdogènes, est la protéine StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*). Elle joue un rôle dans la synthèse des hormones stéroïdes [41], probablement au niveau de la membrane externe de la mitochondrie [42], et on a montré par hybridation *in situ* que les messagers de StAR et du P450scc sont colocalisés dans plusieurs régions du cerveau, en particulier dans l'hippocampe et le cervelet [43].

Interactions cellulaires

Plusieurs études montrent que des interactions entre cellules influencent la synthèse et le métabolisme des neurostéroïdes : les astrocytes convertissent la [^{14}C]DHEA en [^{14}C]Δ4androstènedione uniquement lorsqu'ils sont cultivés à faible densité, alors que la formation de [^{14}C]7α-hydroxy-DHEA varie peu en fonction de la densité cellulaire [15] ; comme déjà mentionné, la microglie semble inhiber la production de DHEA à partir de la PREG par les astrocytes [27] ; les neurones stimulent la production de métabolites 5α-réduits à partir de la PROG par les cellules gliales [44] ; l'expression et l'activité de la 3β-HSD sont fortement augmentées dans les cellules de Schwann par un signal diffusible provenant des neurones sensoriels [45]. Les facteurs impliqués dans la régulation de la synthèse des neurostéroïdes restent à identifier. Les neurotransmetteurs sont de bons candidats. Ainsi, le muscimol, un agoniste des récepteurs $GABA_A$, et le clonazépam, un agoniste des sites centraux des benzodiazépines, permettent tous les deux de stimuler la synthèse de la PREG par les cellules ganglionnaires de la rétine [46].

MODES D'ACTION DES NEUROSTÉROÏDES

Activités auto/paracrines

Comme les neurostéroïdes ne représentent pas une classe chimique particulière de stéroïdes, on pourrait s'attendre à ce que leurs modes d'action ne diffèrent pas de ceux des hormones stéroïdes circulantes. Pourtant, il existe une différence majeure entre les deux : alors que les stéroïdes produits par les glandes endocrines sont dilués dans la circulation générale et atteignent le cerveau ou les nerfs à des concentrations relativement faibles (mode d'action endocrine), les stéroïdes produits dans les cellules gliales ou neurones agissent localement par des actions auto/paracrines. Il

est donc possible que les neurostéroïdes agissent à des concentrations supérieures à celles considérées comme « physiologiques » pour les hormones circulantes (généralement nanomolaires). En conséquence, les observations pharmacologiques montrant que des récepteurs de neurotransmetteurs sont modulés par des concentrations submicromolaires ou micromolaires de neurostéroïdes pourraient correspondre à une réalité biologique. Ceci reste cependant difficile à prouver, car on ne sait pas mesurer la concentration d'un stéroïde dans un micro-environnement comme l'espace synaptique.

Actions génomiques

Le mécanisme d'action des stéroïdes au niveau des récepteurs intranucléaires est généralement qualifié de « génomique » ou de « classique » [revues 47, 48]. Cependant, très peu d'études détaillées de biologie moléculaire concernent les récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes dans le système nerveux : et jusqu'à présent, ce n'est que dans quelques rares cas que l'action directe d'un stéroïde sur un gène cible a été réellement démontrée. Certains récepteurs des stéroïdes, comme celui de la PROG, peuvent être activés par phosphorylation même en absence de ligand [49, 50]. De telles interactions entre récepteurs des stéroïdes et voies de phosphorylation pourraient jouer un rôle particulièrement important dans le cerveau [51].

Actions membranaires

Les effets membranaires des stéroïdes sont souvent qualifiés de « non-génomiques ». Il est cependant préférable d'éviter ce terme car, tout en agissant au niveau de la membrane cellulaire, les stéroïdes peuvent réguler l'expression de gènes par l'intermédiaire de voies de signalisation intracellulaires. Depuis de nombreuses années, des effets membranaires rapides des stéroïdes ont été décrits, en particulier des modifications de l'excitabilité des cellules nerveuses [52, 53]. Il est donc surprenant qu'aucun récepteur membranaire original n'ait été cloné jusqu'à présent.

Cependant les activités de plusieurs récepteurs de neurotransmetteurs peuvent être modulées par des neurostéroïdes, qui ont de ce fait été qualifiés de « neuroactifs » [54]. L'exemple le mieux étudié est la modulation des récepteurs $GABA_A$ par PREG S, DHEA S et 3α,5α-TH PROG, le GABA étant le neurotransmetteur inhibiteur principal dans le système nerveux central. A des concentrations qui sont compatibles avec celles mesurées dans le cerveau, PREG S et DHEA S inhibent tandis que la 3α,5α-TH PROG potentialise les effets du GABA [55]. Comme pour d'autres récepteurs-canaux, il existe de nombreuses isoformes du récepteur $GABA_A$, composées de différentes sous-unités [56]. Alors qu'on a suggéré que les stéroïdes se fixent sur des sites allostériques des récepteurs $GABA_A$, jusqu'à présent aucune séquence d'acides aminés impliquée dans la liaison des stéroïdes n'a pu être identifiée. De plus, les nombreuses études d'interactions entre stéroïdes et récepteurs $GABA_A$ recombinants n'ont pas permis de localiser un site de fixation des stéroïdes,

même si certaines combinaisons de sous-unités ont plus d'affinité pour les stéroïdes que d'autres [57]. La présence d'une sous-unité δ inhibe la modulation des récepteurs $GABA_A$ par les stéroïdes [58]. En tout cas, si des sites de fixation pour les stéroïdes existent sur les récepteurs $GABA_A$, ce qu'évoquent fortement les actions sélectives de leurs énantiomères [57, 59], ils devraient être distincts pour les stéroïdes inhibiteurs et activateurs. En effet, les liaisons de DHEA S et de 3α,5α-TH PROG au niveau de récepteurs $GABA_A$ recombinants ne sont pas compétitives [60]. Une nouvelle famille de récepteurs-canaux GABA, appelés récepteurs $GABA_C$, a été récemment décrite dans la rétine. Constitués de sous-unités rho, les récepteurs $GABA_C$ sont insensibles aux effets des benzodiazépines et des barbituriques [61], mais ils peuvent être modulés de façon positive ou négative par des neurostéroïdes [62].

Des expériences d'électrophysiologie et de pharmacologie ont également indiqué des effets des neurostéroïdes sur les récepteurs glutamiques à l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA), cholinergiques, nicotiniques et sigma de type 1 (s1) [revues dans 5, 63-66].

Activité au niveau des microtubules

Un mécanisme supplémentaire d'action des stéroïdes vient d'être mis en évidence [67]. La PREG se lie avec une affinité élevée à une protéine principalement observée dans les dendrites, qui est associée aux microtubules (*Microtubule Associated Protein 2*, MAP2) et joue un rôle dans la polymérisation de la tubuline. Nous avons montré que cette interaction provoquait une augmentation de la vitesse et de l'importance de la polymérisation obtenue *in vitro* en utilisant des protéines purifiées qui forment des microtubules apparemment normaux au microscope électronique. La PROG et PREGS se lient également à MAP2, mais s'opposent à l'activité de la PREG (Fig. 3). Dans des neurones en culture, la PREG augmente spécifiquement le marquage obtenu avec un anticorps monoclonal anti-MAP2 et son extension dans les neurites. Ce mécanisme nouveau pourrait jouer un rôle dans la régulation de la formation et de la dynamique des microtubules, que l'on sait altérées au cours du vieillissement cérébral, et de plusieurs affections traumatiques ou neurodégénératives.

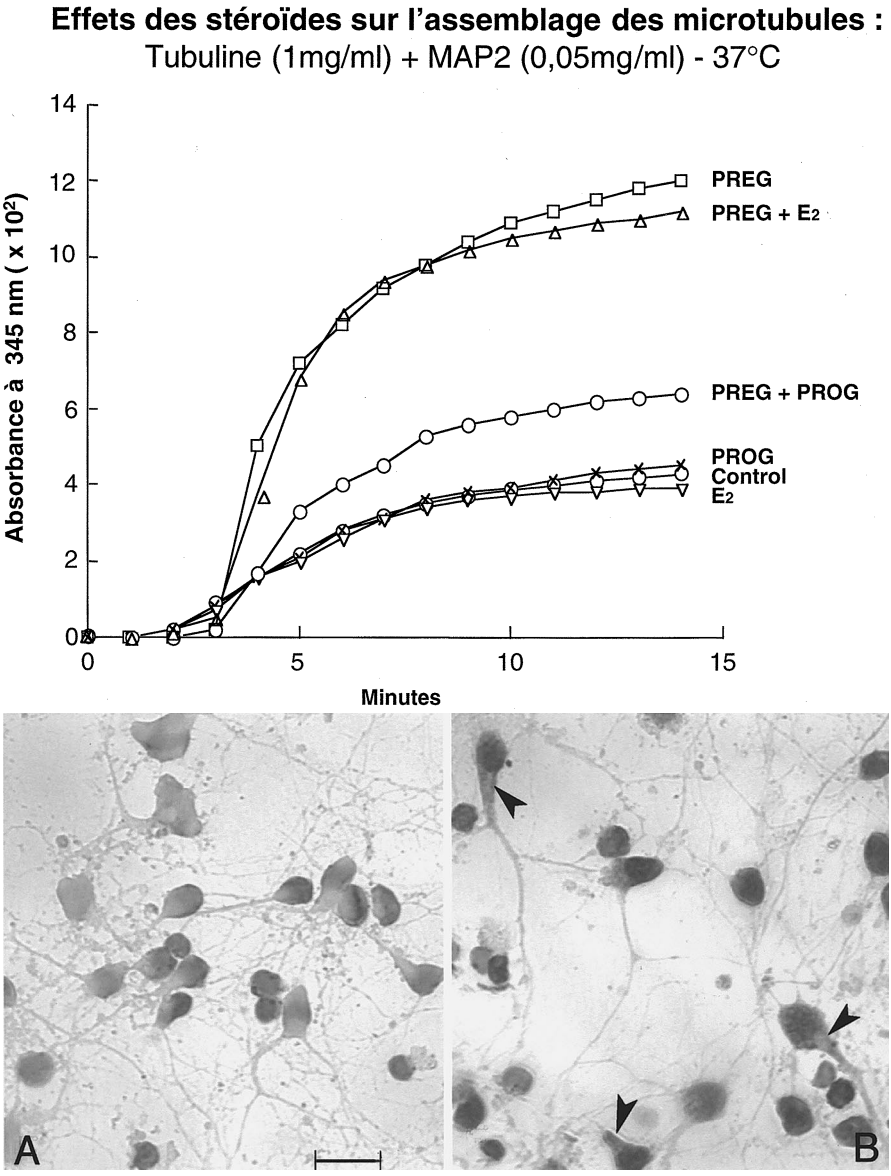


FIG. 3. — *Stéroïdes et assemblage des microtubules*. A/ la prégnènolone stimule la polymérisation de la tubuline en présence de MAP2, ce qu'indique l'augmentation de l'absorbance dans cette étude *in vitro* avec des protéines pures. La progestérone et l'oestradiol sont inefficaces par elles-mêmes, mais la progestérone (au contraire de l'oestradiol) est antagoniste de la prégnènolone. B/ la révélation immunohistochimique de MAP2 par un anticorps monoclonal indique, dans la figure de droite, l'effet de la prégnènolone (flèches) avec expansion dans les neurites [67].

ACTIVITÉS DES NEUROSTÉROÏDES

Actions psychopharmacologiques

La modulation de la neurotransmission par les neurostéroïdes peut expliquer certains de leurs effets psychopharmacologiques. Par exemple, c'est en activant les récepteurs $GABA_A$ que la 3α,5α-TH PROG exerce ses effets anxiolytiques, antidépresseurs, anesthésiques, anticonvulsivants, qu'elle influence les phases du sommeil et qu'elle diminue les capacités mnésiques. La littérature, concernant les effets psychopharmacologiques des neurostéroïdes, est vaste [5, 65]. Nous ne traitons ici que des effets du PREG-S et de la 3α,5α-TH PROG sur la mémoire.

Les effets mnésiques des neurostéroïdes ont été étudiés dans différentes épreuves comportementales, notamment des tests d'évitement actif ou passif et des tests qui mettent en jeu la mémoire spatiale (différents types de labyrinthes). L'action promnésiante du PREG-S a été montrée chez la souris en administrant une dose très faible de ce neurostéroïde directement dans l'hippocampe, une région du cerveau jouant un rôle clé dans certains processus mnésiques [68, 69]. La mise en évidence d'une corrélation entre taux endogènes de PREG-S dans l'hippocampe et performances mnésiques a permis d'établir un rôle physiologique du neurostéroïde dans la mémoire (Fig. 4). Chez des rats âgés présentant des déficits mnésiques, les taux de PREG-S sont sélectivement réduits dans l'hippocampe et l'injection d'une faible dose de PREG-S dans cette structure permettait d'améliorer de façon transitoire leurs performances de mémoire spatiale [69]. L'administration d'une dose promnésiante de PREG-S stimule la libération d'acétylcholine dans la zone de projection des fibres cholinergiques [69-71]. Ainsi peut-on suppléer le déficit d'un composé physiologique chez un animal âgé apparemment normal, cette réversibilité d'un déficit de l'âge étant de bon augure pour la mise au point de molécules efficaces sur les pertes de mémoire associées au vieillissement. En revanche, l'injection de 3α,5α-TH PROG dans le noyau basal magnocellulaire inhibe la mémoire spatiale [72]. Ces observations sont en accord avec un modèle qui propose que le PREG-S et la 3α,5α-TH PROG influencent l'activité des neurones cholinergiques en modulant leurs afférences GABAergiques. En effet, les neurones cholinergiques du cerveau antérieur reçoivent de nombreuses terminaisons GABAergiques et il est bien connu que le GABA et les benzodiazépines inhibent les performances mnésiques. Toutes ces expériences faisaient appel à des traitements aigus avec des neurostéroïdes. Une étude récente a permis de montrer que l'infusion continue pendant plusieurs jours de PREG S dans le troisième ventricule (10 ng/heure) avait également des effets promnésiants chez la souris. En revanche, l'administration continue de 3α,5α-TH PROG diminuait les performances mnésiques [73].

Ce sont les esters sulfates de PREG et de DHEA (PREG S et DHEA S) qui modulent l'activité des récepteurs $GABA_A$. Cependant, comme les formes libres et estérifiées de ces deux neurostéroïdes sont interconvertibles, il est difficile de

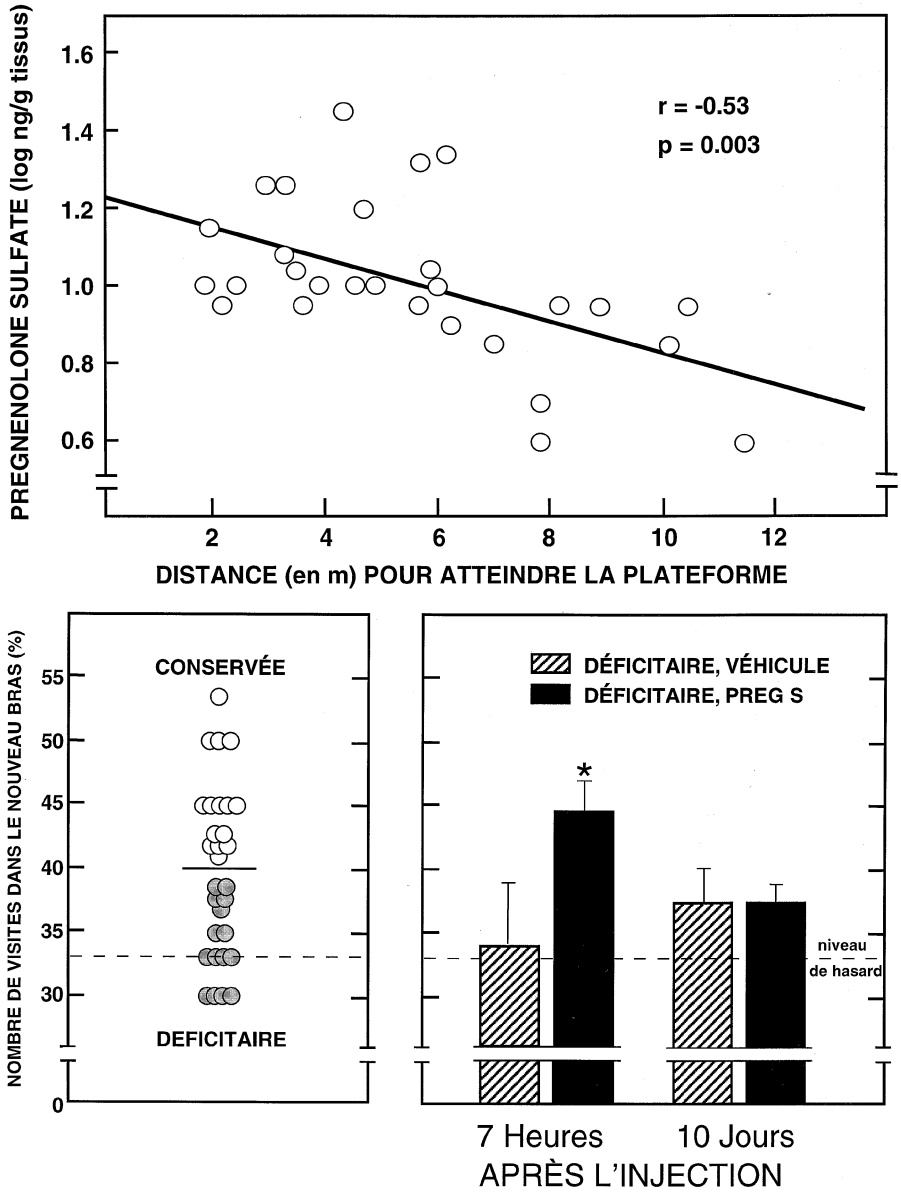


FIG. 4. — *Mémoire et sulfate de prégnènolone*. A/ la concentration de sulfate de prégnènolone dans l'hippocampe de rat âgé (approx. 2 ans) est inversement proportionnelle à la diminution de la mémoire spatiale (mesurée par la distance plus grande parcourue pour atteindre une plateforme dans la « piscine » du test de Morris). B/ chez les animaux déficitaires, le sulfate de prégnènolone restaure la mémoire spatiale, comme l'indique le test du labyrinthe en Y [69].

démontrer expérimentalement un rôle de la sulfatation dans leurs effets promnésiants. C'est seulement au cours des dernières années que plusieurs inhibiteurs de la sulfatase des stéroïdes, comme l'oestrone-3-O-sulfamate et la p-O-sulfamoyl-N-tetradecanoyl tyramine (DU-14), ont été développés. Ils ont permis de confirmer l'hypothèse d'un rôle important direct des esters sulfates de la PREG et de la DHEA. Ainsi, l'administration d'oestrone-3-O-sulfamate augmente les performances mnésiques des souris et renforce les effets promnésiants du DHEA S dans un test d'évitement passif [74]. L'administration du DU-14 bloque l'amnésie induite par la scopolamine chez des rats et provoque une augmentation des taux de l'acétylcholine au niveau de l'hippocampe [75].

On a montré que les récepteurs s1 jouent également un rôle majeur dans les effets mnésiques des neurostéroïdes [63, 76, 77]. Des études de la potentialisation à long terme (LTP *pour long-term potentiation*), considérée comme un mécanisme synaptique mis en jeu dans certaines formes de mémoire [78], indique aussi des effets du DHEA S [79-81].

Actions trophiques

Des effets neurotrophiques ou neuroprotecteurs ont été décrits pour la PREG, la DHEA et la PROG par des expériences *in vivo* et *in vitro*. Chez le rat, l'injection de PREG immédiatement après une lésion par compression de la moelle épinière, diminue les modifications histologiques du tissu nerveux, préserve le tissu de traumatismes secondaires et facilite la récupération des fonctions motrices [82]. Il reste à déterminer si la PREG agit directement ou par l'intermédiaire d'un de ses métabolites comme la PROG. L'administration de celle-ci réduit en effet la formation d'œdème, la dégénérescence neuronale secondaire, et favorise la récupération des fonctions cognitives après une lésion par contusion du cortex frontal de rat [83]. Cette observation pourrait permettre d'expliquer pourquoi, après un traumatisme cérébral, les femelles ont moins d'œdème que les mâles et ne développent pratiquement pas d'œdème lors de la gestation, lorsque les taux de PROG sont élevés. Il a été montré que la PROG favorise la survie des motoneurones après section du nerf facial [84].

Des concentrations nanomolaires de DHEA-S ou de DHEA favorisent la survie et la différenciation des neurones de souris embryonnaires en culture [85]. Récemment la DHEA ou son sulfate ont pu protéger les neurones de l'hippocampe [86] contre les effets cytotoxiques du glutamate et de la protéine β-amyloïde, et il a été proposé que la diminution des taux de DHEA observée au cours du vieillissement pourrait contribuer à une augmentation de la vulnérabilité des cellules nerveuses [87]. En revanche, le PREG-S augmente la mort des neurones de l'hippocampe induite par le NMDA et pourrait donc aggraver les altérations excitotoxiques suite à une lésion [88]. Dans des cultures primaires de neurones de cortex d'embryons de souris, DHEA et DHEA-S favorisent la croissance des neurites. Tandis que la DHEA augmente la longueur des axones, le DHEA-S stimule la croissance des dendrites

[89]. Ces résultats sont en accord avec un rôle de la sulfoconjugaison dans la spécificité de l'action de la DHEA.

Les neurostéroïdes agissent également sur les astrocytes en culture et affectent leur plasticité [90, 91]. Les cellules gliales myélinisantes, oligodendrocytes et cellules de Schwann, sont une autre cible des neurostéroïdes. Dans des cultures d'explants de ganglions spinaux de rats embryonnaires, contenant des neurones sensoriels et des cellules de Schwann, une faible concentration de PROG permet d'augmenter de façon importante le nombre des neurites myélinisés. Dans ces conditions expérimentales, la PROG agit sur le processus de myélinisation, car elle augmente le nombre de segments myélinisés sans affecter le nombre de cellules de Schwann et la longueur des neurites [92]. On a montré par la suite que la PROG accélère l'initiation de la myélinisation dans des co-cultures de neurones et de cellules de Schwann, avec augmentation de l'ARNm du cytochrome P450scc et de la 3β-HSD au moment de la formation des gaines de myéline [93]. La PROG synthétisée dans les nerfs périphériques est impliquée dans la formation de nouvelles gaines de myéline dans le nerf sciatique de la souris en régénération (Fig. 5) [92]. Si on bloque la synthèse ou l'action locale de la PROG, en appliquant sur le nerf en régénération du trilostane ou du RU486 respectivement, on inhibe la remyélinisation des axones régénérés. Le concept d'une formation et action locale de la progestérone est renforcé par la mise en évidence d'un récepteur intracellulaire pour ce neurostéroïde [94], et de l'activation par la PROG dans les cellules de Schwann, de l'expression de gènes codant pour les protéines de la myéline [95]. Notons que chez le rat âgé, l'administration prolongée de 5α-DH PROG permet de rétablir les taux d'expression des gènes de la myéline observés chez des animaux jeunes au niveau du nerf sciatique [96]. Les effets de PREG détectés au niveau des microtubules font actuellement l'objet d'études sur leur importance pour la plasticité neuronale, compte tenu de l'altération du cytosquelette au cours des altérations traumatiques ou neurodégénératives du cerveau.

CONCLUSIONS

La formation des neurostéroïdes dans le cerveau et dans les nerfs périphériques est maintenant bien établie. Cependant, l'étude de leurs voies biosynthétiques est loin d'être achevée. Jusqu'à présent, seules la DHEA, la PREG et leurs esters sulfates, la PROG et plusieurs de ses métabolites réduits sont considérés comme des neurostéroïdes *bona fide*, qui restent présents dans le cerveau et dans les nerfs en absence de glandes endocrines et dont la biosynthèse dans le système nerveux peut être démontrée. Ceci les distingue des hormones stéroïdes sexuelles, androgènes et oestrogènes, qui ne sont plus détectables dans les tissus nerveux après castration et surrénalectomie, alors qu'on a pu mettre en évidence les enzymes qui pourraient catalyser leur formation (i.e. aromatase) (Fig. 1). D'ailleurs, la synthèse de stéroïdes dits « sexuels » dans le cerveau serait en contradiction avec une observation fondamentale en neuroendocrinologie : les fonctions reproductrices et les comportements sexuels disparaissent après castration, et ne sont réactivés qu'après administration

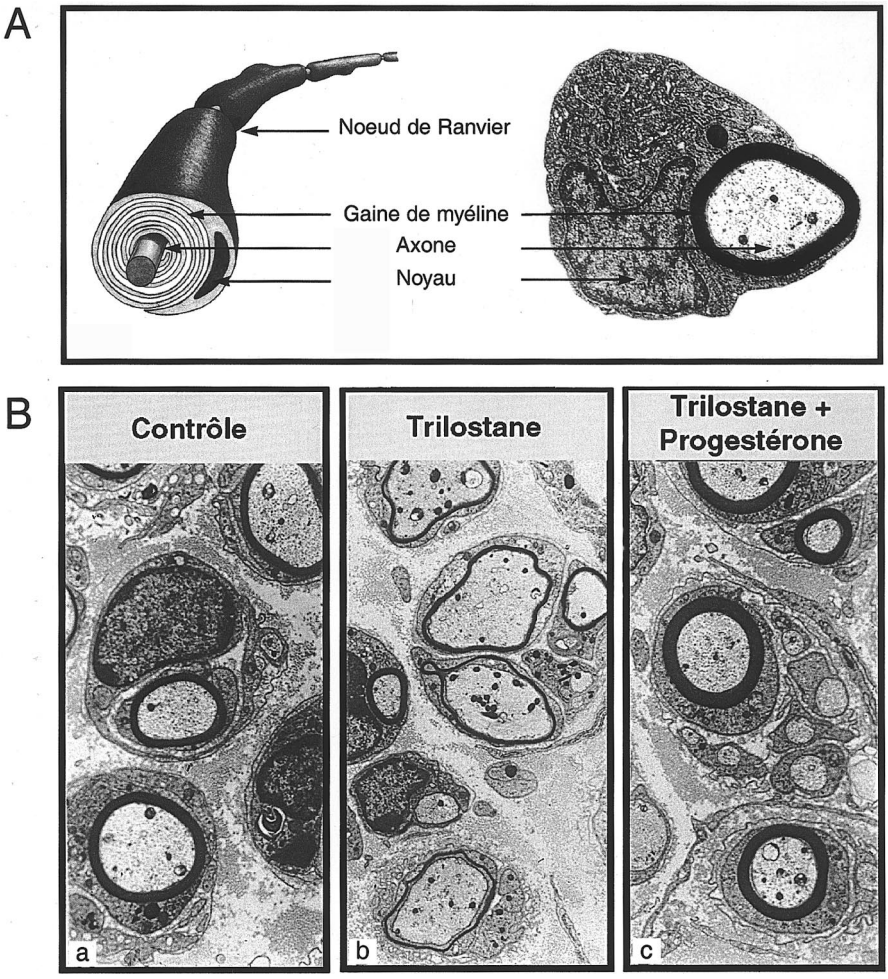


FIG. 5. — *Rôle de la synthèse locale de progestérone dans la myélinisation*. (A) Dans les nerfs périphériques, les cellules de Schwann forment les gaines de myéline en synthétisant une large couche de membrane plasmique qui s'enroule en spirale autour de l'axone. A droite : photographie au microscope électronique d'un axone myélinisé du nerf sciatique de souris. (B) Photographie au microscope électronique montrant la formation de nouvelles gaines de myéline autour des axones régénérés dans le nerf sciatique de souris 15 jours après une lésion par congélation.

— régénération spontanée ;
— effet de l'administration locale de trilostane, un inhibiteur de la synthèse de la progestérone ;
— l'effet inhibiteur du trilostane est bloqué par l'administration simultanée de progestérone.

Le RU 486, antagoniste de la progestérone au niveau du récepteur, donne les mêmes résultats que le trilostane qui bloque la formation de la progestérone. Des résultats semblables peuvent être obtenus *in vitro*, dans des cultures de neurites de ganglion de la racine postérieure (DRG) [92].

d'hormones exogènes. Il s'agit donc de déterminer si toutes ces voies enzymatiques sont réellement fonctionnelles dans le système nerveux, si leurs activités sont quantitativement signifiantes, si leur présence est éventuellement restreinte à certaines régions du cerveau, à certaines populations de cellules et si elle dépend de conditions physiologiques précises. C'est pourquoi nous attachons beaucoup de valeur à des expériences comme celles qui démontrent l'activité physiologique de stéroïdes endogènes comme le PREG-S dans la mémoire et celles de PROG dans la remyénilisation. Au plan physio-pharmacologique, les effets expérimentaux de ces stéroïdes ouvrent la voie à de nouvelles recherches thérapeutiques. Des observations toutes récentes suggèrent la possibilité de concevoir des dérivés administrés par voie générale et actifs, spécifiquement dans le système nerveux.

REMERCIEMENTS

Je remercie particulièrement Michael Schumacher et Paul Robel, pour leur aide éditoriale et, plus important encore à l'évidence, leurs contributions scientifiques. Les noms de nos collaborateurs apparaissent au niveau des références. Je remercie aussi Dominique Diop pour son aide au niveau du manuscrit. Les travaux ont été principalement soutenus par l'INSERM, les Fondations F. Gould et G. H. et L. Mathers (New-York) et le Collège de France.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Baulieu E.E.. — Steroid hormones in the brain : several mechanisms ? *In* : Steroid hormone regulation of the brain (Fuxe K., Gustafsson J.A., Wetterberg L. eds), Oxford : Pergamon Press, 1981, pp 3-14.

[2] Corpéchot C., Robel P., Axelson M., Sjövall J, Baulieu E.E. — Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1981, *78,* 4704-4707,

[3] Corpéchot C., Synguelakis M., Talha S., Axelson M., Sjövall J., Vihko R., Baulieu E.E., Robel P. — Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res,* 1983, *270*, 119-125.

[4] Robel P., Schumacher M., Baulieu E.E. — Neurosteroids : From definition and biochemistry to physiopathologic function. *In* : Neurosteroids. A new regulatory function in the nervous system. (Baulieu E.E., Robel P., Schumacher M. eds), Totowa, New Jersey : Humana Press, 1999, 1-25.

[5] Baulieu E.E., Robel P., Schumacher M. — Neurosteroids. A new regulatory function in the nervous system. Totowa, New Jersey : Humana Press, 1999.

[6] Cheney D.L., Uzunov D., Costa E., Guidotti A. — Gas chromatographic-mass fragmentographic quantification of 3a-hydroxy-5a-pregnan-20-one (allopregnanolone) and its precursors in blood and brain of adrenalectomized and castrated rats. *J Neurosci,* 1995, *15*, 4641-4650.

[7] Liere P., Akwa Y., Weill-Engerer S., Eychenne B., Pianos A., Robel P., Sjövall J., Schumacher M., Baulieu E. — alidation of an analytical procedure to measure trace amounts of neurosteroids by Gas Chromatography — Mass Spectrometry. *J Chromatogr. B*., 2000, *739*, 301-312.

[8] Bock G.R., Goode J.A. — Non-reproductive actions of sex steroids. Chichester : John Wiley and Sons, 1995.

[9] Takase M., Ukena K., Yamazaki T., Kominami S., Tsutsui K. — Pregnenolone, pregnenolone sulfate, and cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the amphibian brain and their seasonal changes. *Endocrinology,* 1999, *140*, 1936-1944.

[10] Tsutsui K., Yamazaki T. — Avian neurosteroids. I. Pregnenolone biosynthesis in the quail brain. *Brain Res,* 1995, *678*, 1-9.

[11] Le Goascogne C., Robel P., Gouézou M., Sananès N., Baulieu E.E., Waterman M. — Neurosteroids : cytochrome P450scc in rat brain. *Science*, 1987, *237*, 1212-1215.

[12] Schumacher M., Robert F., Baulieu E.E. — Neurostéroïdes : effets trophiques dans le système nerveux. *J Soc Biol*, 1999, *193*, 285-292.

[13] Zwain I. H., Yen S.S.C. — Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology,* 1999, *140*, 3843-3852.

[14] Jung-Testas I., Hu Z.Y., Robel P., Baulieu E.E. — Biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology*, 1989, *124*, 2083-2091.

[15] Akwa Y., Sananés N.G., Robel P., Baulieu E.E., Le Goascogne C. — Astrocytes and neurosteroids : metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density. *J Cell Biol*, 1993, *121*, 135-143.

[16] Guennoun R., Fiddes R.J., Gouézou M., Lombès M., Baulieu E.E. — A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4-isomerase (3β-HSD), is expressed in rat brain. *Mol Brain Res,* 1995, *30*, 287-300.

[17] Guennoun R., Schumacher M., Robert F., Delespierre B., Gouézou M., Eychenne B., Akwa Y., Robel P., Baulieu E.E. — Neurosteroids : expression of functional 3b-hydroxysteroid dehydrogenase by rat sensory neurons and Schwann cells. *Eur J Neurosci*, 1997, *9*, 2236-2247.

[18] Cherradi N., Chambaz E.M., Defaye G. — Organization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase and cytochrome P450scc into a catalytically active molecular complex in bovine adrenocortical mitochondria. *J Steroid Biochem Mol Biol,* 1995, *55*, 507-514.

[19] Young J., Corpéchot C., Perche M., Haug M., Baulieu E.E., Robel P. — Neurosteroids : pharmacological effects of a 3 β-hydroxy-steroid dehydrogenase inhibitor. *Endocrine J,* 1994, *2*, 505-509.

[20] Lacor P., Gandolfo P., Tonon M.C., Brault E., Dalibert I., Schumacher M., Benavides J., Ferzaz B. — Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration : a role for PBR in neurosteroidogenesis. *Brain Res,* 1999, *815*, 70-80.

[21] Krieger N.R., Scott R.G. — Nonneuronal localization for steroid converting enzyme : 3a — hydroxysteroid oxidoreductase in olfactory tubercle of rat brain. *J Neurochem,* 1989, *52*, 1866-1870.

[22] Robel P., Akwa ., Corpechot C., Hu Z.Y., Jung-Testas I., Kabbadj., Le Goascogne C., Morfin R., Vourc'h C., Young I., Baulieu E.E. — Neurosteroids : biosynthesis and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. *In* : Brain Endocrinology (Motta M. ed.), New York : Raven Press, 1991, pp. 105-132.

[23] Cascio C., Prasad V.V.K., Lin Y.Y., Lieberman S., Papadopoulos V. — Detection of P450c17-independent pathways for dehydroepiandrosterone (DHEA) biosynthesis in brain glial tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, *95,* 2862-2867.

[24] Strömstedt M., Waterman M.R. — Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Brain Res Mol Brain Res,* 1995, *34,* 75-88.

[25] Compagnone N.A., Bulfone A., Rubenstein J.L., Mellon S.H. — Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology,* 1995, *136,* 5212-5223.

[26] Kohchi C., Ukena K., Tsutsui K. — Age — and region-specific expressions of the messenger RNAs encoding for steroidogenic enzymes P450scc, P450c17 and 3beta-HSD in the postnatal rat brain. *Brain Res*, 1998, *801*, 233-238.

[27] Zwain I. H., Yen S.S.C — Dehydroepiandrosterone (DHEA) : biosynthesis and metabolism in the brain. *Endocrinology*, 1999, *140*, 880-887.

[28] Akwa Y., Morfin R.F., Robel P., Baulieu E.E. — Neurosteroid metabolism. 7a-hydroxylation of dehydroepiandrosterone and pregnenolone by rat brain microsomes. *Biochem J*, 1992, *288*, 959-964.

[29] Stapleton G., Steel M., Richardson M., Mason J.O., Rose K.A., Morris R.G., Lathe R. — A novel cytochrome P450 expressed primarily in brain. *J Biol Chem,* 1995, *270*, 29739-29745.

[30] Rose K.A., Stapleton G., Dott K., Kieny M.P., Best R., Schwarz M., Russell D.W., Björkhem I., Seckl J., Lathe R. — Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7alpha-hydroxy dehydroepiandrosterone and 7alpha-hydroxy pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1997, *94,* 4925-4930.

[31] Jo D.H., Ait Abdallah M., Young J., Baulieu E.E., Robel P. — Pregnenolone, dehydroepiandrosterone, and their sulfate and fatty acid esters in the rat brain. *Steroids*, 1989, *54*, 287-297.

[32] Rajkowski K., Robel P., Baulieu E.E. — Hydroxysteroid sulfotransferase activity in the rat brain and liver as a function of age and sex. *Steroids,* 1997, *62*, 427-436.

[33] Beaujean D., Mensah-Nyagan A.G., Do-Rego J.L., Van Luu-The, Pelletier G., Vaudry H. — Immunocytochemical localization and biological activity of hydroxysteroid sulfotransferase in the frog brain. *J Neurochem,* 1999, *72*, 848-857.

[34] Compagnone N.A., Salido E., Shapiro L.J., Mellon S.H. — Expression of steroid sulfatase during embryogenesis. *Endocrinology,* 1997, *138*, 4768-4773.

[35] Culty M., Li H., Boujrad N., Amri H., Vidic B., Bernassau J.M., Reversat J.L., Papadopoulos V. — In vitro studies on the role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenesis. *J Ster Biochem Mol Biol,* 1999, *69*, 123-130.

[36] Korneyev A., Pan B.S., Polo A., Romeo E., Guidotti A., Costa E. — Stimulation of brain pregnenolone synthesis by mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor ligands *in vivo*. *J Neurochem,* 1993, *61*, 1515-1524.

[37] Galiègue S., Bilo O., Combes T., Bribes E., Carayon P., Le Fur G., Casellas P. — Cloning and characterization of PRAX-1. A new protein that specifically interacts with the peripheral benzodiazepine receptor. *J Biol Chem,* 1999, *274*, 2938-2952.

[38] Lacor P., Benavides J., Ferzaz B. — Enhanced expression of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) and its endogenous ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the regenerating adult rat sciatic nerve. *Neurosci Lett*, 1996, *220*, 61-65.

[39] Le Goascogne C., Eychenne B., Tonon M-C., Lachapelle F., Baumann N., Robel P. — Neurosteroid progesterone is up-regulated in the brain of Jimpy and shiverer mice. *Glia,* 2000, *29,* 14-24.

[40] Vowinckel E., Reutens D., Becher B., Verge G., Evans A., Owens T., Antel J.P. — PK1195 binding to the peripheral benzodiazepine receptor as a marker of microglia activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosc Re*s, 1997, *50*, 345-353.

[41] Stocco D.M. — A Star search : implications in controlling steroidogenesis. *Biol Reprod,* 1997, *56*, 328-336.

[42] Miller W.L., Strauss J.F. — III Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J Ster Biochem Mol Biol,* 1999, *69*, 131-141.

[43] Furukawa A., Miyatake A., Ohnishi T., Ichikawa Y. — Steroidogenic acute regulatory protein (Star) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system : colocalization of Star, Cytochrome P-450$_{scc}$ (CYP XIA1), and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem,,* 1998*, 71,* 2231-2238.

[44] Melcangi R.C., Cavarretta I., Magnaghi V., Ballabio M., Martini L., Motta M. — Crosstalk between normal and tumoral brain cells. Effect on sex steroid metabolism. *Endocrin,* 1998, *8*, 65-71.

[45] Robert F., Guennoun R., Désarnaud F., Do Thi A.N., Benmessahel Y., Baulieu E.E., Schumacher M. — Synthesis of progesterone in Schwann cells : regulation by neurons. Soumis pour publication.

[46] Guarneri P., Guarneri R., Cascio C., Piccoli F., Papadopoulos V. — Gamma-Aminobutyric acid type A/benzodiazepine receptors regulate rat retina neurosteroidogenesis. *Brain Res,* 1995, *683,* 65-72.

[47] Evans R.M. — The steroid thyroid hormone receptor superfamily. *Science,* 1988, *240*, 889-895.

[48] Truss M., Beato M. — Steroid hormone receptors : Interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev,* 1993, *14,* 459-479.

[49] Schumacher M., Robert F., El-Etr M. — Actions de la progestérone dans le cerveau : comportement reproducteur et libération de l'hormone lutéinisante. *Reprod Hum Horm,* 1999, *22*, 277-294.

[50] Power R.F., Conneely O.M., O' Malley B.W. — New Insights into Activation of the Steroid Hormone Receptor Superfamily. *Trends Pharmacol Sci,* 1992, *13*, 318-323.

[51] Apostolakis E.M., Garai J., Fox C., Smith C.L., Watson S.J., Clark J.H., O'Malley B.W. — Dopaminergic regulation of progesterone receptors : brain D5 dopamine receptors mediate induction of lordosis by D1-like agonists in rats. *J Neurosci,* 1996*, 16,* 4823-4834.

[52] Schumacher M. — Rapid membrane effects of steroid hormones : an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci,* 1990, *13,* 359-362.

[53] Wehling M. — Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol*, 1997, *59*, 365-393.

[54] Paul S.M., Purdy R.H. — Neuroactive Steroids. *FASEB J*, 1992, *6*, 2311-2322.

[55] Majewska M.D. — Neurosteroids : Endogenous bimodal modulators of the $GABA_A$ receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol*., 1992, *38*, 379-395.

[56] Smith G.B., Olsen R.W. — Functional domains of $GABA_A$ receptors. *Trends Pharmacol Sci,* 1995, *16*, 162-167.

[57] Lambert J.J., Belleli D., Shepherd S.E., Pistis M., Peters J.A. — The selective interaction of neurosteroids with the $GABA_A$ receptor. *In* : Neurosteroids. A new regulatory function in the nervous system (Baulieu E.E., Robel P., Schumacher M eds), Totowa, New Jersey : Humana Press, 1999, 125-142.

[58] Zhu W.J., Wang J.F., Krueger K.E., Vicini S. — Delta subunit inhibits neurosteroid modulation of $GABA_A$ receptors. *J Neurosci,* 1996*, 16*, 6648-6656.

[59] Purdy R.H., Paul S.M. — Potentiation of GABAergic neurotransmission by steroids. *In* : Neurosteroids. A new regulatory function in the nervous system (Baulieu E.E., Robel P., Schumacher M. eds), Totowa, New Jersey : Humana Press., 1999, 143-153.

[60] Park-Chung M., Malayev A., Purdy R.H., Gibbs T.T., Farb D.H. — Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Re*s, 1999, *830,* 72-87.

[61] Johnston G.A. — $GABA_c$ receptors : Relatively simple transmitter-gated ion channels ? *Trends Pharmacol Exp Ther,* 1996, *17,* 319-323.

[62] Morris K.D.W., Moorefield C., Amin J. — Differential modulation of the γ-aminobutyric acid type C receptor by neuroactive steroids. *Mol Pharmacol,* 1999, *56*, 752-759.

[63] Monnet F.P., Mahé V., Robel P., Baulieu E.E. — Neurosteroids via 6 receptors, modulate the [^{3}H]norepinephrine relase evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1995*, 92*, 3774-3778.

[64] Bastianetto S., Monnet F., Junien J.L., Quirion R. — Steroidal modulation of sigma receptor function. *In* : Neurosteroids. A new regulatory function in the nervous system (Baulieu E.E., Robel P., Schumacher M. eds), Totowa, New Jersey : Humana Press, 1999, 191-205.

[65] Rupprecht R., Holsboer F. — Neuroactive steroids : mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci,* 1999, *22*, 410-416.

[66] Phan V.L., Su T.P., Privat A., Maurice T. — Modulation of steroidal levels by adrenalectomy/castration and inhibition of neurosteroid synthesis enzymes affect signal receptor-mediated behaviour in mice. *Eur J Neurosci,* 1999, *11*, 2385-2396.

[67] Murakami K., Fellous A., Baulieu E.E., Robel P. — Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA,* 2000, *97*, 3579-3584.

[68] Flood J.F., Morley J.E., Roberts E. — Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures : the amygdala is by far the most sensitive. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995*, 92*, 10806-10810.

[69] Vallée M., Mayo W., Darnaudery M.C.C., Young J., Koehl M.L.M.M., Baulieu E.E., Robel P., Simon H. — Neurosteroids : deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1997, *94*, 14865-14870.

[70] Pallarés M., Darnaudéry M., Day J., Le Moal M., Mayo W. — The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the nucleus basalis increases both acetylcholine release in the frontal cortex or amygdala and spatial memory. *Neuroscience*, 1998*, 87*, 551-558.

[71] Darnaudéry M., Koehl M., Pallarés M., Le Moal M., Mayo W. — The neurosteroid pregnenolone sulfate increases cortical acetylcholine release : a microdialysis study in freely moving rats. *J Neurochem*, 1998, *71,* 2018-2022.

[72] Mayo W., Dellu F., Robel P., Cherkaoui J, Le Moal M., Baulieu E.E., Simon H. — Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat. *Brain Res,* 1993, *607,* 324-328.

[73] Ladurelle N., Eychenne B., Denton D., Blair-West J., Schumacher M., Robel P., Baulieu E.E. — Prolonged intracerebroventricular infusion of neurosteroids affects cognitive performances in the mouse. *Brain Res,* 2000, *858* , 371-379.

[74] Li P.K., Rhodes M.E., Jagannathan S., Johnson D.A — Reversal of scopolamine induced amnesia in rats by the steroid sulfatase inhibitor estrone-3-O-sulfamate. *Brain Res Cogn Brain Res*, 1995, *2*, 251-254.

[75] Rhodes M.E., Pui-Kai L., Burke A.M., Johnson D.A. — Enhanced plasma DHEAS, brain acetylcholine and memory mediated by steroid sulfatase inhibition. *Brain Res,* 1997, *773*, 28-32.

[76] Maurice T., Su T.P., Privat A. — Sigma 1 receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience*, 1998, *83*, 413-428.

[77] Urani A., Privat A., Maurice T. — The modulation by neurosteroids of the scopolamine-induced learning impairment in mice involves an interaction with sigma 1 receptors. *Brain Res,* 1998, *799,* 64-77.

[78] Bliss T.V.P., Collingridge G.L. — A synaptic model of memory : long-term potentiation in the hippocampus. *Nature,* 1993, *361,* 31-39.

[79] Yoo A., Harris J., Dubrovsky B. — Dose-response study of dehydroepiandrosterone sulfate on dentate gyrus long-term potentiation. *Exp Neurol*, 1996, *137*, 151-156.

[80] Pavlides C., Ogawa S., Kimura A., McEwen B.S. — Role of adrenal steroid mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in long-term potentiation in the CA1 field of hippocampal slices. *Brain Res,* 1996, *738*, 229-235.

[81] Ito K., Skinkle K.L., Hicks T.P. — Age-dependent, steroid-specific effects of oestrogen on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *J Physiol (Lond)*, 1999*, 515*, 209-220.

[82] Guth L., Zhang Z., Roberts E. — Key role for pregnenolone in combination therapy promotes recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1994*, 91*, 12308-12312.

[83] Stein D.G., Fulop Z.L. — Progesterone and recovery after traumatic brain injury : an overview. *The Neuroscientist,* 1998*, 4*, 435-442.

[84] Yu W.H. — Survival of motoneurons following axotomy is enhanced by lactation or by progesterone treatment. *Brain Res,* 1989, *491*, 379-382.

[85] Bologa L., Sharma J., Roberts E. — Dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative reduce neuronal death and enhance astrocytic differentiation in brain cell cultures. *J Neurosci, Res*, 1987, *17*, 225-234.

[86] Kimonides V.G., Khatibi N.H., Svendsen C.N., Sofroniew M.V., Herbert J. — Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1998, *95*, 1852-1857.

[87] Cardounel A., Regelson W., Kalimi M. — Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death : mechanism of action. *Soc Exp Biol Med,* 1999, *222,* 145-149.

[88] Weaver C.E.J., Wu F.S., Gibbs T.T., Farb D.H. — Pregnenolone sulfate exacerbates NMDA-induced death of hippocampal neurons. *Brain Res,* 1998*, 803*, 129-136.

[89] Compagnone N.A., Mellon S.H. — Dehydroepiandrosterone : a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, *95*, 4678-4683.

[90] Del Cerro S., Garcia-Estrada J., Garcia-Segura L.M. — Neuroactive steroids regulate astroglia morphology in hippocampal cultures from adult rats. *Glia,* 1995, *14*, 65-71.

[91] Garcia-Estrada J., Del Rio J.A., Luquin S., Soriano E., Garcia-Segura L.M. — Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after penetrating brain injury. *Brain Res,* 1998, *628,* 271-278.

[92] Koenig H., Schumacher M., Ferzaz B., Do Thi A.N., Ressouches A., Guennoun R., Jung-Testasobel I., Robel P., Akwa Y., Baulieu E.E. — Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science*, 1995, *268*, 1500-1503.

[93] Chan J.R., Phillips L.J., Glaser M. — Glucocorticoids and progestins signal the initiation and enhance the rate of myelin formation. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1998, *95,* 10459-10464.

[94] Jung-Testas I., Schumacher M., Robel P., Baulieu E.E. — Demonstration of progesterone receptors in rat Schwann cells. *J Steroid Biochem Mol Biol,* 1996, 58, 77-82.

[95] Désarnaud F., Do Thi A.N., Brown A., Lemke G., Suter U., Baulieu, E.E., Schumacher M. — 6 Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and P0 genes in Schwann cells. *J Neurochem*, 1998, *71*, 1765-1768.

[96] Melcangi R.C., Magnaghi V., Cavarretta L., Martin, L., Piva F. — Age-induced decrease of glycoprotein P0 and myelin basic protein gene expression in the rat sciatic nerve. Repair by steroid derivatives. *Neuroscience,* 1998, *85*, 569-578.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 349-372, séance du 20 février 2001

DISCUSSION

M. René MORNEX

La découverte des neurostéroïdes qui a été faite par Etienne Baulieu et ses collaborateurs a des implications très importantes et garde encore des zones mystérieuses. À côté des localisations dans le noyau caudé, dans le cervelet et l'hippocampe qui ont été citées, a t-on réalisé une cartographie dans l'encéphale des stéroïdes et de l'enzyme contrôlant leur synthèse ? La deuxième question est suscitée par les images montrant la polymérisation des microtubules et le développement des neurites sous l'effet de la prégnènolone. Cela rappelle l'influence des hormones thyroïdiennes au cours du processus de maturation postnatal du système nerveux. A-t-on des informations sur l'ontogenèse de la production des neurostéroïdes ?

Nous finissons actuellement la cartographie des stéroïdes dans le cerveau de souris et de rats, et avons entrepris un travail sur le cerveau humain dont on conçoit qu'il progressera plus lentement. La cartographie de certains enzymes indique, chez le rat et l'homme, la présence majoritaire du Cytochrome $P450_{scc}$ dans la substance blanche et précisément les oligodendrocytes. Nous n'avons pas encore d'information sur l'ontogenèse des neurostéroïdes si ce n'est une belle corrélation avec la myélinogenèse de la production de prégnènolone, précurseur de la progestérone qui a des propriétés myélinisantes.

M. Raymond ARDAILLOU

Comment sont régulées l'expression et l'activité de l'enzyme transformant le cholestérol en prégnènolone dans le cerveau ? La structure des récepteurs de la progestérone dans le cerveau est-elle la même ou différente de celle des récepteurs périphériques ?

On ne connaît pas la régulation du Cytochrome $P450_{scc}$ dans le cerveau. Nous avons détecté « un récepteur » de la progestérone dans les cellules gliales, qui pourrait être un isoforme du récepteur « sexuel ». Les clonages de contrôle sont en cours.

M. Claude JAFFIOL

La présence de neurostéroïdes dans le SNC et leurs implications physiologiques s'observent-elles dans l'évolution phylogénétique ? Quelle peut être l'implication des neurostéroïdes dans la régulation du sommeil ? Parmi les mécanismes régulateurs, que sait-on de l'action des hormones thyroïdiennes et de l'insuline ?

Il y a des neurostéroïdes chez les amphibiens et les oiseaux, avec des essais concluants sur le comportement de ces derniers. L'administration de DHEA entraîne une augmentation du sommeil paradoxal. Je ne sais rien de l'action des hormones thyroïdiennes et de l'insuline sur la neurostéroïdogenèse.

M. Roger NORDMANN

Vous avez décrit le rôle essentiel probable des neurostéroïdes dans la régénération neuronale. Étant donné que, chez l'homme adulte, un renouvellement se poursuit activement au niveau des neurones impliqués dans l'olfaction, contrairement à la plupart des autres neurones, avez-vous étudié comparativement l'importance de la synthèse de la prégnènolone au niveau du bulbe olfactif et d'autres régions cérébrales ? Une synthèse plus importante au niveau olfactif représenterait, me semble-t-il, un argument de poids en faveur du rôle évoqué des neurostéroïdes dans la plasticité neuronale. D'autre part, pourriez-vous préciser les caractéristiques du cytochrome P450 impliqué dans la biosynthèse de la prégnènolone au point de vue de sa régulation, de sa spécificité et de son éventuelle inductibilité ?

Oui, il y a relativement beaucoup de prégnènolone au niveau du bulbe olfactif chez les rongeurs. A ma connaissance, on n'a pas séquencé ou cloné ou étudié la régulation du Cytochrome 450 cérébral.

M. Jacques POLONOVSKI

Est-il possible de distinguer un effet paracrine de l'effet autocrine de ces stéroïdes ? Y a t-il un système de transport de ces neurostéroïdes, des protеïnes transporteuses ?

A présent, on ne sait pas distinguer expérimentalement un effet paracrine d'un effet autocrine. Je ne connais pas de protéines de transport des neurostéroïdes.

M. Georges DAVID

Vous avez eu l'occasion, dans une réponse à M. Mornex, d'envisager les effets des neurostéroïdes avant la naissance. Qu'en est-il de leurs effets après la naissance, sachant que le processus de la myélinisation se poursuit encore très activement après la naissance ?

Certainement, la myélinogenèse postnatale chez le rongeur est en partie sous le contrôle des neurostéroïdes, progestérone en particulier.

M. Bernard HILLEMAND

Les troubles mnésiques de l'alcoolisme pourraient-ils être liés à des perturbations de la genèse des neurostéroïdes ?

Nous avons observé, après administration « aiguë » d'éthanol, une chute transitoire de la DHEA cérébrale chez le rat. On n'en sait pas plus.

M. Jean-Luc de GENNES

A t-on étudié l'effet des inhibiteurs de la synthèse de la prégnènolone sur les effets imputés à cette hormone que vous avez présentée ?

Nous avons bloqué la synthèse de la prégnènolone dans le système de remyélinisation du nerf sciatique décrit dans l'exposé. Le résultat confirma le concept de synthèse locale des neurostéroïdes à partir du cholestérol et de son implication dans la réparation de la myéline.

M. Gabriel BLANCHER

Ces neurostéroïdes diffusent-ils hors du système nerveux ?

Peut-être diffusent-ils, mais leur faible abondance ne modifie pas les taux circulants des stéroïdes correspondants.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, n° 2, 373-385, séance du 20 février 2001

Le don d'ovocytes depuis la loi de bioéthique. Implications médicales, éthiques et juridiques déduites d'une série de 300 cas à l'hôpital Tenon

Ovocyte donation since the application of the so called bioethical laws. Medical, ethical and legal implications posed by the study of a series of 300 cases at Tenon Hospital

Jacques SALAT-BAROUX *, Dominique CORNET *,
Jacqueline MANDELBAUM **, Yan WATANABE *, Philippe MERVIEL*,
Jean-Marie ANTOINE*

RÉSUMÉ

Il s'agit de l'exemple type des problèmes posés par la médecine moderne. Nous avons mené à l'Hôpital Tenon à Paris, entre 1994 et 1999, une étude rétrospective intéressant 177 transferts d'embryons congelés puis décongelés chez 139 patientes parmi les 300 demandeuses d'un don d'ovocytes pendant cette même époque. Ceci nous conduit à bien souligner les difficultés éthiques créées par la promulgation des lois de bioéthique de 1994. C'est ainsi que deux conséquences sont devenues évidentes : la pénurie de plus en plus grande de donneuses et la nécessité de ne transférer que des embryons congelés/décongelés due au décret de 1996 sur la Sécurité Sanitaire, qui impose une quarantaine des dits embryons pendant 6 mois. En contrepartie, l'emploi de cette méthode a apporté de nouvelles informations sur l'implantation et souligne l'importance de la qualité de l'embryon qui est très étroitement corrélée à l'âge de la donneuse.

MOTS-CLÉS : DON OVOCYTE. TRANSPLANTATION. EMBRYON.

* Service de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction. Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine — 75020 Paris.

** Laboratoire Fécondation *In Vitro* et Biologie de la Reproduction. Service du professeur Dadoune. Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine — 75020 Paris.

Tirés-à-part : Professeur Jacques SALAT-BAROUX, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 28 novembre 2000, accepté le 4 décembre 2000.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 373-385, séance du 20 février 2001

SUMMARY

This is the perfect example of the problems which are the consequences of the actual medicine. We carried out an ovocyte donation study at the Tenon Hospital, in Paris, between 1994 and 1999 involving 177 cryopreserved thawed embryo transfers among 300 recipients. This study enables us to stress the ethical difficulties posed by the so called bioethical laws of 1994. Simultaneously two consequences became clearly evident : a paucity of donors, and the necessity to only transfer frozen embryos due to decree of 1996 upon sanitary security that imposes the quarantine of embryos for six months. On the other hand, the use of this method has yielded important new information regarding embryo implantation and the importance of ovocyte quality that is closely correlated to donor age.

Key-words (Index Medicus) : Ovoocyte donation. Transplantation. Embryo.

INTRODUCTION

Historique

Alors que le premier transfert d'embryon d'une donneuse à une receveuse chez le lapin était effectué avec succès par W. Heage en 1891 [1], et que cette méthode chez l'animal devait prendre une extension industrielle en 1970 [2], c'est en 1983 [3, 4] qu'une équipe australienne de la Monach University obtient une première grossesse chez la femme après un don d'ovocyte. Depuis, cette technique s'est développée et répond aux recommandations du rapport de l'Académie nationale de médecine de 1996 [5]. Elle a permis d'obtenir, dans notre équipe, un taux de grossesses cliniques par transfert de 30 % et d'implantation par embryons de 19 % [6]. On dénombre d'autre part aux États-Unis, pour la seule année 1994, 929 enfants vivants nés par don d'ovocytes [7], et le groupe d'étude pour le don d'ovocytes en France (GEDO) [8] publie un bilan sur la période comprise entre 1994 et 1997, de 154 transferts pour 1 360 demandes avec 127 enfants nés chez 99 couples. Le nombre de centres pratiquant le don d'ovocytes a progressé de 9 à 17, et le nombre de receveuses de 191 à 503 entre 1994 et 1997, montrant l'intérêt pour cette technique dont les indications principales sont les dysgénésies gonadiques, les ménopauses précoces, les réponses ovariennes insuffisantes, les ovariectomies bilatérales le plus souvent après traitement pour cancer, les anomalies génétiques congénitales.

Certes, cette méthode reste marginale au sein de l'Assistance médicale à la procréation qui compte pour l'ensemble des tentatives de fécondation *in vitro*, avec ou sans injection intra-ovocytaire des spermatozoïdes, plus de 40 000 ponctions par an ; mais les répercussions juridiques, éthiques et sociales qu'elle entraîne méritent qu'on s'y arrête. En effet, alors qu'avant 1994, le don d'ovocyte pouvait, comme c'est le cas encore dans beaucoup de pays dont les États-Unis [7], être anonyme ou non anonyme et conduisait dans la grande majorité des cas à un transfert

d'embryons frais, l'anonymat rendu obligatoire depuis la loi dite de Bioéthique de 1994 a entraîné *ipso facto* une pénurie des donneuses (40 % de diminution dans notre équipe) et le décret de 1996 sur la Sécurité Sanitaire a rendu nécessaire la congélation des embryons pendant une période dite de « quarantaine » de 6 mois minimum, réduisant pour la plupart des équipes les taux de succès de cette méthode. De plus, les risques qu'elle comporte, à la fois pour la donneuse d'ovocytes, la mère et l'enfant [5], doivent être soulignés ainsi que les problèmes d'ordre purement médicaux qu'elle soulève concernant l'implantation de l'œuf [9] et ses facteurs de succès impliquant, chez la femme receveuse du don, une véritable greffe allogénique.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Nous ne reviendrons pas sur les méthodes de stimulations hormonales, les techniques d'aspiration sous échographie et de synchronisation hormonale et endométriale entre donneuse et receveuse, déjà décrites par nos soins [10].

L'étude de notre population de femmes ayant reçu ou étant en attente d'un don d'ovocytes est relativement complexe. En effet, entre 1986 et 1994, c'est-à-dire avant la promulgation de la loi de Bioéthique, il y a eu à la fois des dons anonymes et non anonymes [10] et les transferts se sont faits pour la majorité des femmes receveuses en embryons frais et une minorité en embryons congelés.

Depuis 1994 jusqu'en 1996, date de la parution du décret sur la Sécurité Sanitaire, les dons n'ont plus été qu'anonymes, et les transferts ont intéressé soit des embryons frais, soit plus tard des embryons congelés.

Enfin, de 1996 à 1999, tous les dons ont non seulement été anonymes et relationnels, mais en plus ont souscrit à la quarantaine obligatoire et n'ont plus comporté que des embryons congelés.

Cependant, pour apprécier les résultats globaux et actuels, nous avons considéré une population plus homogène, entre mai 1995 et mai 1999, de femmes receveuses n'ayant eu que des transferts d'embryons congelés : soit 177 transferts chez 139 receveuses parmi les 300 couples demandeurs.

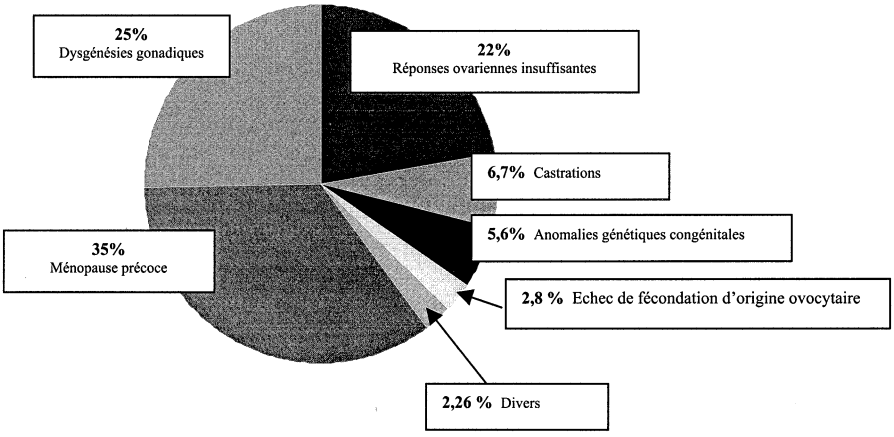
LES INDICATIONS

Pour les femmes ayant eu un transfert d'embryons après dons, elles ont été les suivantes :

— 63 ménopauses précoces (35 % de l'ensemble),
— 43 dysgénésies gonadiques (25,4 %),
— 39 réponses ovariennes insuffisantes (22 %),
— 13 castrations chirurgicales ou radiothérapiques (6,7 %),
— 10 anomalies génétiques congénitales (5,6 %),

— 5 troubles de la fécondation d'origine ovocytaire (2,83 %),
— 4 indications diverses (2,26 %).

Il est à remarquer, sans que cela soit significatif, que le nombre de réponses ovariennes insuffisantes augmente avec l'âge des receveuses. Ceci se retrouve dans les indications du GEDO [8] : les échecs répétés de fécondation *in vitro* passent, entre 1994 et 1997, de 13 % à 21 %.



LES RÉSULTATS

Les résultats exprimés dans le Tableau I sont les suivants :

— un taux de grossesses cliniques par transfert de 26,5 % avec une différence significative entre les femmes de moins de 35 ans (30,2 %) et de plus de 35 ans (13,2 % $p<0,01$) ;
— un taux de grossesses multiples de 9,5 % pour les femmes de moins de 35 ans ;
— un taux d'avortements comparable dans les deux populations, soit 20 %.

Il faut souligner enfin que le taux d'implantation par embryon transféré est plus élevé chez les femmes de moins de 35 ans (19,2 %) comparé aux femmes plus âgées (8,2 % $p< 0,05$).

Les résultats sont comparables à ceux des autres séries : 30 % de grossesses cliniques, transfert en 1997, pour le GEDO [8], et 38,5 % pour Abdalla et *al*, alors qu'il s'agissait d'embryons frais transférés.

TABLEAU 1. — Résultats globaux et effets de l'âge de la donneuse

Age des Donneuses	**< 35 ans (30,1 +/- 3,38)[a] %**	**> 35 ans (36,8 +/- 0,65)[b] %**	**Total (%) (31.5 +/- 4.08)**
Age des Receveuses	35.8 +/- 5.02[c]	36.0 ± 4.25[d]	35.9 ± 4.86
Nombre de Transferts	139	38	177
Nombre d'embryons transférés	1.72 +/- 0.61[e]	1.61 ± 0.50[f]	1.70 ± 0.59
Grossesse clinique / Transfert	42 (30,2)[g]	5 (13.2)[ht]	47 (26.6)
Grossesses multiples / Grossesse	4 (9.52)[i]	0 (0)[j]	4 (8.51)
Grossesse clinique	8 (19.0)[k]	1 (20.0)[i]	9 (19.1)
Naissances / transferts	34 (24.5)[m]	4 (10.5)[n]	38 (21.5)
Taux d'implantation / E. Transférés	46/239 (19.2)[o]	5/61 (8.20)[p]	51/300 (17.0)
Taux d'enfants nés vivants / E. Transférés	37/239 (18.8)[q]	4/61 (7.41)[r]	41/300 (13.7)

Mann Whitney's test, a.b : p<0 ; 01, c.d, e.f : non significatif
Fisher's Test, g.h : p< 0 ; 05, o.p : p= 0.054, i.j, k.l, m.n, q.r : non significatif
Y. Watanabe et *al*., Hôpital Tenon, 1999

Dans notre étude, un certain nombre de résultats partiels méritent d'être rapportés, car ils illustrent bien les conséquences de la loi sur la pratique du don.

L'évolution exprimée dans le Tableau 2 montre la diminution du nombre de donneuses à partir de 1994, et ce jusqu'en 1998.

TABLEAU 2. — Évolution des proportions de donneuses relationnelles. Hôpital Tenon

	87/88	**89/90**	**91/92**	**93/94**	**95/96**	**97**	**01.06/98**	**07.12/98**
Couples receveurs R	21	25	21	72	104	86	40	37
Donneuses D	4	11	15	58	55	39	21	9
D/R	19 %	44 %	71 %	80 %	52 %	45 %	52 %	24 %

Conséquences de la congélation des embryons rendue obligatoire par le décret de 1996

C'est un problème important dont les développements ne sont pas tout à fait clarifiés. En effet, s'il est certain que la congélation fait perdre à la décongélation jusqu'à 21 % des embryons (c'est le cas de toutes les séries) [8.10], il n'est pas prouvé qu'en terme de naissance par don effectué, les résultats souffrent de la congélation. Dans notre service, le taux de naissance cumulatif par don est comparable à celui des transferts d'embryons frais à partir du moment où la receveuse a profité de 5 ovocytes ou plus [24].

DISCUSSION

L'ensemble de ces résultats conduit à des analyses sur le plan législatif, éthique et plus proprement médical.

Sur le plan législatif

En effet, les articles L 673 du *Code de la Santé Publique* issus des lois dites de Bioéthique du 29.7.94, largement inspirés du *Code des CECOS* [12] établi sous la présidence de Monsieur le professeur Georges David, visent à préserver l'anonymat des donneuses, le principe du consentement éclairé et écrit devant un notaire ou un juge, des membres des deux couples, donneur et receveur, la finalité du don réservé en premier aux femmes stériles, et enfin le transfert chez les receveuses qui ne doit pas être subordonné à l'apport d'un tiers donneur.

L'ensemble de ces dispositions législatives a entraîné une limitation du nombre de donneuses qui, dans notre série, a commencé à chuter à partir de 1994, passant de 58 à 9 en 1998. L'anonymat dans ces cas n'est pas seul en cause (9 % des donneuses potentielles sont récusées en raison de leur âge, d'une contre-indication médicale ou génétique, ou parce qu'elles ne vivent pas en couple). De plus, 17 % d'entre elles ne poursuivent pas leur démarche, surtout pour des raisons psychologiques [8].

En revanche, le nombre de receveuses ne fait que croître, passant de 21 à 104 entre 1988 et 1996 dans notre centre, car la loi offre une égalisation des chances pour les couples n'ayant pas ou plus l'opportunité de trouver une donneuse. Le délai d'attente est en moyenne de 18 mois à 2 ans et plus, comme le souligne l'ensemble des équipes du GEDO [8], avec pour corollaire une augmentation de l'âge des receveuses, ce qui n'est pas sans conséquences sur les résultats.

Ainsi l'anonymat rendu obligatoire par la Loi de 1994 a conduit les équipes à modifier l'organisation du don et à instaurer un « don croisé » [14] : 92 % des donneuses sont dites « relationnelles », c'est-à-dire qu'elles sont recrutées par des receveuses qui ne leur donnent pas leurs ovocytes ; ceux-ci sont attribués à une autre receveuse.

Une autre disposition, celle du décret du 12 novembre 1996, conduit au titre de la Sécurité Sanitaire (infection et virus) à une quarantaine de 6 mois des embryons faute de pouvoir congeler les ovocytes [15], ce qui est possible actuellement mais n'a pas fait la preuve d'une efficacité égale au moins au transfert d'embryons congelés. Les conséquences en sont multiples :

— une prolongation du délai d'attente de 6 mois,
— une perte d'embryons à la décongélation qui, dans notre service, a atteint 21 %,
— une diminution du taux de succès par rapport aux transferts d'embryons frais, qui impose de donner au moins 5 ovocytes à chaque receveuse pour optimiser le résultat du don.

Pour clore ce chapitre de la législation des dons, signalons que les lois des pays européens sont différentes, passant de l'interdiction formelle en Norvège, Suède, Allemagne, Autriche et certains cantons de Suisse, à l'autorisation de don direct sans respect de l'anonymat comme en Espagne, en Grande-Bretagne, au Danemark ou en Belgique. Si bien que ce constat incite les couples de plus en plus nombreux et qui en ont les moyens, à se faire prendre en charge à l'étranger (Tableau 3), d'autant que dans certains pays il n'y a pas obligation de gratuité.

C'est la raison pour laquelle M. le professeur Jean Bernard, Président du Comité National consultatif d'Éthique a proposé, dès 1991 lors de son audition pour la rédaction du rapport de M^me^ Noelle Lenoir *Aux Fonctions de la Vie*, la création d'un Comité Européen d'Éthique [16].

TABLEAU 3. — Comparaison des différentes législations européennes sur le don d'ovocytes

Interdisant le don	Autorisant le don
Norvège (loi nº 68 du12/06/1987)	**Espagne** (loi nº 35 du 22/11/1988)
Suède (loi nº 711 du 14/06/1988)	**Grande Bretagne** (loi de 1990)
Allemagne (loi du 24/10/1990)	**Danemark** (loi nº 503 du 24/06/1992 et loi nº 650 du 22/07/1992)
Autriche (loi nº 275 du 01/06/1992)	**Suisse, selon les cantons** (loi du 13/08/1992)
Suisse, selon les cantons (loi du 13/08/1992)	**France** (loi nº 94653 et 94654 du 29/07/1994)

D. Cornet — Grand Débat : Don de sperme et d'ovocyte.

Sur le plan de l'Éthique

On conçoit aisément les problèmes éthiques qui se trouvent ainsi posés et dont nous n'aborderons que les points fondamentaux.

L'Assistance Médicale à la Procréation crée une situation où la médecine, comme le souligne M. Georges David [17], n'est plus sollicitée pour guérir, mais pour contourner « une infertilité », dont le résultat est la naissance d'un enfant. Le médecin n'est plus seulement « un simple technicien », il doit intégrer la notion sacrée de l'enfant et les conséquences de cet acte. Ainsi Jean-François Mattei [18] précise bien dans son rapport que « dans l'Assistance Médicale à la Procréation, ce n'est plus tant le problème technique que celui de la valeur de l'enfant pour lui même qui est essentielle ». Cette ambiguïté est bien plus préoccupante quand il y a nécessité de recourir à un donneur, et encore plus à une donneuse. Dans ce cas, le médecin doit protéger les intérêts de la receveuse, mais aussi de la donneuse d'ovocyte, dans le strict respect de l'anonymat. Et même si le don croisé qui, pour certains, n'est qu'un simple habillage de la loi, a permis sur le plan pratique la poursuite de cette technique, celle-ci ne manque pas de poser des problèmes éthiques et psychologiques majeurs sur la motivation des donneuses.

Enfin, ce sont certainement les problèmes de l'anonymat et du secret par rapport à l'enfant qui posent problème. Le récent rapport du Conseil d'État [19], sur les lois de 1994, précise bien que la « moins mauvaise solution » serait de conserver l'anonymat des donneuses, comme cela est le cas dans la plupart des pays européens. Pourtant *la Convention Internationale des Droits de l'Enfant* de 1990 prévoit « le Droit de l'enfant de connaître ses parents » mais ajoute prudemment « dans la mesure du possible ». Ce rapport insiste bien sur la nécessité de distinguer l'anonymat du secret, alors que ces deux notions peuvent, pour certains, être liées. En effet, de nombreux psychologues et psychanalystes se sont penchés sur ce sujet, car pour certains d'entre eux le secret véhicule avec lui un caractère pathogène vis-à-vis de l'enfant. Dans la revue de la littérature qu'à récemment conduite Eva Weil [20], seuls 45 % des couples receveurs seraient décidés à vouloir révéler les circonstances de l'AMP à leur enfant. Mais dans aucune de ces publications, il n'est dit clairement à quel moment cette décision est prise (au moment de la signature, avant la procédure d'AM ou à la naissance de l'enfant) ; de plus rien n'est précisé de ce que les parents auront à dire, et enfin l'âge auquel ils devraient révéler les circonstances du don. Et si certaines institutions comme la *Human Fertilisation and Embryology Authority* [21], qui recueille une fiche d'information en Grande Bretagne sur le sujet depuis 1990, affirme : un enfant qui a des raisons de penser qu'il ou qu'elle peut être issu(e) d'AMP pourra le vérifier auprès de la HFEA, et ce à partir de 2008, cela ne veut pas dire qu'il pourra avoir des détails précis sur ses origines. Ceci est la conséquence des difficultés méthodologiques à recueillir des données, au moins descriptives, auprès des principaux concernés par le don, en premier lieu l'enfant, mais aussi receveuse et donneuse.

A tous ces problèmes s'ajoutent les risques d'une hyperstimulation ovarienne [13] encourus par la donneuse dans la mesure où on essaie, chez une femme jeune, d'obtenir un nombre important d'ovocytes en vue de leur fécondation. Et dans ce cas, se posent les problèmes des embryons surnuméraires, comme on les retrouve dans toute technique d'AMP : abandon possible, mais rare ici, des embryons congelés et dilemme posé par le transfert *post mortem* d'embryons appartenant au couple.

Ces difficultés ont conduit M^me^ Françoise Shenfield et M. le professeur Claude Sureau [22], dans leur ouvrage sur *Les aspects éthiques de la reproduction humaine,* à définir ce qu'ils appellent « une voie étroite » qui louvoie entre la personnalité embryo-fœto-néonatale, le droit de la femme, celui de la structure familiale et le concept qui lui est étroitement associé, celui de la filiation, c'est-à-dire entre le respect de la liberté et la protection de la vie. Fort heureusement, dans son récent rapport [23], le Conseil d'État propose d'autoriser ce transfert dans la mesure où le projet parental a bien été défini avant le décès du mari.

Sur le plan médical

Ces épineux problèmes à la fois juridiques, éthiques, et culturels expliquent l'interdiction formulée par certains pays concernant le don d'ovocyte et la tendance de plus en plus marquée à reconsidérer l'adoption. Cependant, cette technique étant réalisable et reproductible [23], il reste à en tirer les enseignements d'un point de vue pragmatique sur le plan de la recherche médicale.

En effet, elle présente une particularité puisque l'implantation intéresse non plus une greffe semi allogénique comme c'est le cas dans les grossesses normales, mais une greffe allogénique pure, car le contingent chromosomique provenant du don d'ovocyte est étranger à la mère ; de plus, cette implantation se fait en dehors de toute sécrétion ovarienne endogène. Il n'empêche que les bases moléculaires de l'implantation [9] (molécules informatives sécrétées par l'embryon pour la *decidua*), favorisant la reconnaissance du trophoblaste par l'endomètre et son invasion contrôlée par le système immunitaire local, sont parfaitement semblables, ce qui se traduit par un taux d'avortement (15 à 18 %) qui n'est guère différent dans les cas d'implantation des embryons au cours des fécondations *in vitro* classiques.

Du reste, deux arguments militent en faveur de la prééminence de l'action de l'embryon sur l'endomètre, même s'il est totalement étranger à la mère sur le plan génétique : c'est que le taux d'implantation dépend surtout de sa qualité, comme l'a démontré dans notre équipe M^me^ Jacqueline Mandelbaum [24], et que les grossesses sont possibles même chez des femmes ménopausées au-delà de 50 ans [25], si elles sont suppléées sur le plan hormonal.

Néanmoins, l'état de l'endomètre conserve son importance car le succès dépend aussi du transfert de l'embryon lors d'une période qualifiée de « fenêtre d'implantation » [26] : il existe en effet, dans les cycles substitués, comme nous l'avons démontré, une ou deux journées précises qui sont favorables à l'implantation de

l'embryon, c'est-à-dire 2 et 3 jours après l'administration de la progestérone, ou dans les cycles normaux après l'ovulation, soit 4 jours après le début de la montée de la LH endogène. Et cet état correspond parfaitement à une image biopsique sécrétoire de l'endomètre ainsi qu'à une concentration équilibrée de ses récepteurs à l'œstradiol et à la progestérone.

Mais l'âge du couple [27], donneuse surtout et pour certaines receveuse, influence très largement les taux d'implantation. C'est ainsi que dans notre étude, en 1999, le taux d'implantation d'embryons diffère significativement ($p < 0,05$) quand on compare le groupe des donneuses de moins de 35 ans et celui des plus de 35 ans, alors que l'âge des receveuses et le nombre d'embryons replacés ne sont pas significativement différents (Tableau 2). Ces données se retrouvent dans d'autres publications. Mais si une différence apparaît dans notre série sur les taux d'implantation suivant que les receveuses, à leur tour, ont moins ou plus de 36 ans, cette constatation n'est pas confirmée par d'autres études [28], et ne serait due qu'au taux plus élevé d'avortements dans la deuxième série. Ces résultats illustrent, de façon significative, l'importance de l'âge de la donneuse, c'est-à-dire de la qualité de l'ovocyte et expliquent très bien les mauvais taux d'implantation quand ces donneuses approchent de la quarantaine. Mais dans notre étude, cette différence apparaît déjà dès 36 ans, et devrait inciter les femmes à chercher à concevoir plus précocement, sans que pour autant, sur le plan scientifique, on ait pu démontrer à ce jour une différence évidente sur le plan biologique entre les ovocytes de femmes de plus ou moins 36 ans.

En conclusion, même si le don d'ovocyte ne représente qu'une pratique très minoritaire au sein de l'AMP, il soulève de tels problèmes sur les plans juridique et éthique, qu'un encadrement législatif très strict, en tout cas en France, a rendu son recours pour les couples infertiles très difficile, pour ne pas dire de plus en plus impossible, alors que sa réalisation sur le plan pratique reste une technique aisée et reproductible. Serait-il possible, par souci d'efficacité, d'être conduits à changer les principes « intangibles » que sont la gratuité et l'anonymat qui s'appliquent à tous les dons, sachant qu'il existe une restriction pour l'anonymat des dons d'organes dans des conditions exceptionnelles : dans une même famille et pour une raison vitale ? La question se pose alors de savoir si un autre choix est possible.... pour les couples, pour.... la société.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Heage W. — Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova in a foster mother. *Proc. R. Soc. London*, 1890, *48*, 457.

[2] Seidel E.G. Jr. — Superovulation and embryo transfer in cattes. *Science*, 1981, *211*, 351-357.

[3] Trounson A., Letton J., Beranko M., Wooc Conti A. — Pregnancy established in an infertile patient after transfer of a donated embryo fertilized *in vitro*. *Br. Med. J.,* 1983, *286*, 835.

[4] Lutjen P., Trounson A., Leeton J., Findlay J., Wood C., Renon P. — The establishment and maintenance of pregnancy using *in vitro* fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature*, 1984, *307*, 174-175.

[5] Laplane R., David G., Henrion R., Sureau C., Tubiana M. — Rapport de l'Académie nationale de médecine sur l'Assistance Médicale à la Procréation. *Bull. Acad. Natle Med.*, 1996*, 180*, nº 2, 397-417.

[6] Sauer M.V., Paulson R.J., Ary B.A., Lobo R.A. — Three hundred cycles of ovocyte donation at the University of Southern California : assessing the effect of age and infertility diagnosis on pregnancy and implantation rates. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 1994, *11*[2], 92-96.

[7] Society for Assisted Reproductive Technology. American Society for Reproductive Medecine. Assisted reproductive technology in the United States and Canada. *Fertil. Steril*., 1996, *66*, 697-705.

[8] Letur Konirsch H., Martin Pont B., Thepot F., Fenichel P. — Bilan du don d'ovocytes en France (GEDO, Groupe d'Étude du Don d'Ovocytes*). Contracept. Fertil. Sex.,* 1998, *26*, nº 7 et 8, 481-484.

[9] Merviel PH., Salat Baroux J., Uzan S. — Mécanismes moléculaires de l'implantation embryonnaire dans l'espèce humaine. *Genesis*, 1998, *33*, 9-15.

[10] Salat-Baroux J., Cornet D., Alvarez C., Mandelbaum J. — Pregnancies after replacement of Frozen thawed embryo in a donation program. *Fertil. Steril.*, 1998*, 49*, 817.

[11] Abdalla H., Baber R., Kirleland A., Leonard T., Power M., Studd J. WW. — A report of 100 cycles of ovocyte donation ; factors affecting the outcome. *Hum. Reprod.*, 1990, *5* [8], 1018-1022.

[12] Salat-Baroux F., Salat-Baroux J. — Les Lois de la Bioéthique. Collection Dalloz, 1998, 69-72.

[13] Antoine J.M., Salat-Baroux J. — Les syndromes d'Hyperstimulation ovarienne, 1993, *21*, nº 3, 201-207.

[14] Frydman R., Letur Kornisch H., de Ziegler D., Bydlowski M., Raoul Duval. Selva J. — A protocol for satisfying the ethical issues raised by ovocyte donation : the free, anonymous, and fertile donnors. *Fertil. Steril.,* 1990, *53*, 666.

[15] Salat-Baroux J. — La congélation d'ovocytes ou d'ovaires : perspectives d'application aux ménopauses précoces. *La Revue du Praticien Gynécologie Obstétrique*, 1999, *36*, 22-25.

[16] Rapport au Premier Ministre. Aux Frontières de la vie : une éthique biomédicale à la Française. Tome II. La Documentation Française, 1991, p. 323.

[17] David G. — Introduction à l'Éthique. *Les Cahiers de l'AP-HP*. Assistance Médicale à la Procréation et Filiation. Doin Éditeurs, 1999, p. 3.

[18] Mattei J.F. — Lois dites de Bioéthique et droits de l'Homme : droits de l'homme et pratiques soignantes ». Direction Emmanuel Hirsch et Paulette Ferlender. Paris : AP/HP Dom Édition, 1998.

[19] Les Lois de Bioéthique : cinq ans après. La Documentation Française. Paris, 1999, AMP, avec tiers donneurs, 48-52.

[20] Weil E. — Le Don d'Ovocytes : ce que les parents disent aux enfants. *Reprod. Hum. et Hormones,* 2000, *XIII*, nº 5, p. 533.

[21] Abdalla H., Shenfield F., Latarche E. — Statutory information for the children born of ovocyte donation : in the UK. What will they be told in 2008 ? *Hum. Reprod*., 1998, *13*, nº 4. 1106-1109.

[22] Sureau C., Shenfield F. — Aspects éthiques de la Reproduction Humaine. Collection éthique et sciences. Directeur G. Hubert J. Libley. Eurotext, Paris, 1995, p. 375.

[23] Salat-Baroux J., Mandelbaum J., Merviel PH., Siffroi J.P. — Évolution de l'AMP depuis 1993. Annexe 7 du Rapport de Conseil d'État. Les Lois de Bioéthique : cinq ans après. La Documentation Française, Paris, 1999, 265-280.

[24] Mandelbaum J., Belaisch Allart J., Junca A.M., Antoine J.M., Plachot M., Alvarez S., Alnot M.O., Salat-Baroux J. — Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for ovocyte. *Human. Reprod.*,1998, *13* [3], 161-17.

[25] Sauer M.V., Parlson R.J., Lobo R.A. — Pregnancy in women 50 or more yearts of age : outcome of 22 consecutively established pregnancies from ovocyte donation. *Fertil. Assist.*, 1995, *64* [1], 111-115.

[26] De Ziegler O., Franchin R., Massounneau M., Bergeron C., Frydman R., Bouchard P. — Hormonal control of endometrial receptivity. *Ann N Y Acad. Sci*, 1994, *734,* 209.

[27] Faber M., Mercan R., Hamacher P., Muasher S., Toner J. — The impact of an egg donnor's age and her prior fertility on recipient pregnancy outcome. *Fertil. Steril.*, 1997, *68*, 370-2.

[28] Navot D., Drews MR., Berghs P.A et *al.* — Age related decline in femals fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertil. Steril.,* 1994, *61*, 97.

DISCUSSION

M. Claude SUREAU

Comment s'effectue actuellement la prise en charge des divers aspects techniques du don d'ovocyte ? Compte tenu du faible nombre d'ovocytes disponibles, que faut-il penser de deux éventualités qui furent évoquées et finalement rejetées en Grande-Bretagne : le prélèvement d'ovocytes sur des femmes décédées accidentellement voire sur des fœtus avortés ?

Il n'y avait pas jusqu'en septembre 2000 de prise en charge, par les Caisses d'Assurance maladie, des dépenses concernant les donneuses d'ovocytes. Depuis, cette prise en charge est assurée par le budget de l'hôpital dans lequel se font les dons d'ovocytes. Effectivement la Grande-Bretagne a déjà rejeté le prélèvement d'ovocytes sur des femmes décédées accidentellement et encore plus sur des fœtus avortés. Cette attitude est évidemment celle de la France. Mais la pénurie d'ovocytes disponibles, non seulement pour le don, mais aussi pour le future clonage thérapeutique, si celui-ci est autorisé, amène à la solution du prélèvement d'ovocytes immatures par biopsie chez la femme ou au cours d'interventions chirurgicales, le problème est ensuite de les congeler puis de les maturer *in vitro*, technique qui n'est pas encore passée dans la pratique courante chez la femme. Le recours aux ovocytes d'animaux comme la vache est éthiquement difficilement acceptable et de plus physiologiquement aberrant, car le cytoplasme de la vache demande une température de 39°5 pour s'exprimer alors qu'il est à 37° pour la femme.

M. Jean-Paul GIROUD

Ou en est-on des problèmes de congélation des ovocytes ?

Comme je l'ai montré, la congélation des ovocytes matures est dangereuse chez les femmes car elle peut affecter, à la décongélation, le fuseau et avoir une répercussion sur la migration des chromosomes. Ce qui n'est pas le cas des ovocytes immatures, primordiaux

ou primaires, qui résistent bien à la décongélation, ce que nous avons bien démontré avec M^me^ Jacqueline Mandelbaum. En revanche, reste le problème de la maturation *in vitro* qui n'est résolu que chez l'animal, en particulier la souris (EPPIG). Seules quelques grossesses allant à terme ont été décrites chez la femme, par des équipes japonaises ou italiennes.

M. Georges DAVID

Le don d'ovocytes permet de dissocier les facteurs ovocytaires, c'est-à-dire génétiques, et les facteurs utérins qui conditionnent la gestation. Vous avez donné des indications concernant l'âge des donneuses qui intervient sur les résultats, traduisant le poids des facteurs ovocytaires. Qu'en est-il de l'influence de l'âge des receveuses ? La congélation de fragments ovariens n'est-elle pas susceptible de permettre secondairement une meilleure maturation ovocytaire ? Au plan éthique, on a trop souvent assimilé les problèmes de filiation pour la femme avec ceux de la filiation masculine. Or, depuis le 1^er^ cas, le lien biologique est double, avec un poids particulier de la gestation puisque la mère est désignée par l'accouchement. Ainsi devrait-on reprendre la réflexion, dans le don d'ovocyte, portant sur la possibilité de supprimer l'anonymat. Quelles en seraient les conséquences pour l'enfant ? De telles pratiques se faisant à l'étranger (et s'étant faites un moment en France, particulièrement dans votre service) quelles sont les données psychologiques observées à moyen et long terme ?

Nous avons bien démontré l'importance de l'âge des donneuses, mais en ce qui concerne l'âge des receveuses, il n'y a pas de consensus sur son importance : dans notre équipe cette influence ne semble se dessiner que sur le nombre d'avortements, à l'approche de la quarantaine. Pour d'autres équipes, si elles ont démontré l'influence néfaste de l'âge avancé des donneuses, leurs résultats restent entachés d'un biais, car elles ne l'ont pas vérifié à âge de donneuses égal. La congélation de fragments ovariens pourrait être une solution, comme l'ont publié Gosden et son équipe, en greffant ensuite ces fragments d'ovaire chez la brebis, ce qui a permis d'obtenir des ovocytes fécondables et la naissance de petits normaux. La suppression de l'anonymat, dans le cas de don d'ovocytes, a été longtemps discutée mais finalement rejetée, dans le rapport du Conseil d'État du mois d'avril dernier : il a été considéré comme la moins mauvaise solution. En ce qui nous concerne et compte tenu de notre expérience avant l'instauration de la Loi de 1994 sur les dons anonymes et non anonymes, et bien que nous n'ayons remarqué aucune différence dans les comportements des couples donneurs et receveurs, nous restons fidèles tout de même à l'anonymat. En effet, le recul n'est pas assez grand concernant l'avenir psychologique des enfants, puisque les premiers succès en France ne datent que de 1987.

M. Gabriel BLANCHER

Une révision de la loi de bioéthique est à l'étude. Quelle modification souhaiteriez-vous dans ce domaine précis en fonction de votre expérience ?

Nous ne souhaitons pas la levée de l'anonymat, nous souhaitons en revanche que l'on favorise au maximum la recherche sur la congélation des ovocytes et leur maturation *in vitro*. En revanche, en ce qui concerne la congélation des embryons rendue nécessaire par le décret de 1996, il faudrait une étude bactériologique et épidémiologique plus précise, notamment en ce qui concerne le sida et l'hépatite C, pour vérifier si l'attitude actuelle est la meilleure. Cette étude prospective est actuellement menée sous l'égide du Ministère de la Santé. Enfin grâce à la détection par la PCR de la virémie, nous pourrions peut-être être autorisés à revenir au transfert d'embryon frais.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 387-404, séance du 20 février 2001

Chirurgie des cancers bronchiques après radiochimiothérapie ou chimiothérapie. Risques et bénéfices

Surgical treatment of lung cancer after radiochemotherapy or chemotherapy. Risks and benefits

Pierre FUENTES *, Christophe DODDOLI, Pascal THOMAS, Roger GIUDICELLI

RÉSUMÉ

Le but de ce travail était d'évaluer les conditions et les résultats de la chirurgie des cancers bronchopulmonaires après radio et/ou chimiothérapie par une analyse rétrospective sur la période de janvier 1990 à janvier 1998 de 69 malades, atteints d'un cancer bronchique primitif et opérés en seconde intention, en raison d'une tumeur d'extirpabilité douteuse (n=40), de la présence d'adénopathies médiastinales (n=25) ou d'une contre-indication fonctionnelle temporaire (n=4). Une radiochimiothérapie avait été pratiquée chez 43 malades qui avaient reçu de 2 à 4 cures (moy 2,9 ± 0,8 cures) et 43 ± 8 Gy (de 20 à 60 Gy). Vingt-six malades avaient eu une chimiothérapie exclusive (3 ± 0,7 cures). Le taux de résécabilité a été de 94 %. Il y a eu 33 pneumonectomies, 1 bilobectomie, 23 lobectomies et 8 résections conservatrices. La mortalité intra-hospitalière a été de 9 % (n=6), toujours d'origine respiratoire. Il y a eu 4 réinterventions immédiates (6 %), pour hémorragie ou fistule bronchique. Trente-cinq malades (51 %) ont eu une transfusion sanguine péri-opératoire, d'en moyenne 4,5 ± 3,8 unités de concentré globulaire. Le taux de fistule bronchique après pneumonectomie a été de 15 % (n=5). Treize malades ont eu une pneumopathie postopératoire (19 %). La probabilité de survie à 5 ans de la série globale a été de 22 %. La survie à 5 ans dans le groupe de patients ayant eu une résection complète a été de 31 % pour les N0-1 et de 8 % pour les N2 (p=0.19). La chirurgie après radio et/ou chimiothérapie d'induction est justifiée en l'absence d'une atteinte ganglionnaire N2, quand une résection complète est possible. Toutefois cette chirurgie est associée à un risque postopératoire élevé.

MOTS-CLÉS : TUMEUR POUMON, chirurgie. TUMEUR POUMON, chimiothérapie. TUMEUR POUMON, radiothérapie. ADJUVANT MÉDICAMENTEUX.

* Service de Chirurgie Thoracique, Hôpital Sainte-Marguerite, 270 bld Sainte-Marguerite, BP 29 — 13274 Marseille cedex 09.

Tirés-à-part : Professeur Pierre FUENTES, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 22 mars 2000, accepté le 22 mai 2000.

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate the conditions and results of lung cancer surgery, following chemo and/or radiotherapy. This retrospective study included 69 patients treated from January 1990 to January 1998 for a primary lung cancer in whom surgery had been performed after induction treatment. Surgery had not been considered initially for the following reasons : N2 disease (n=25), temporary functional impairment (n=4) ; doubtful resectability (n=40). The medical regimen resulted in combined radio-chemotherapy in 43 patients who received 2 to 4 sessions of chemotherapy (average=2.9 ± 0.8 sessions) and 43 ± 8 Gy (20 to 60 Gy), or chemotherapy alone in 26 patients (3 ± 0.7 sessions). Exploratory thoracotomy was performed in 4 patients (6 %). There were 33 pneumonectomies, 1 bilobectomy, 23 lobectomies and 8 lung sparing resections. The in-hospital mortality was 9 % (n=6) from respiratory origin in all cases. There were 4 reoperations (6 %) : 3 for bronchial fistula and 1 for bleeding. Thirty five patients (51 %) required blood transfusion (4.5 ± 3.8 cell packs). The incidence of early and delayed bronchial fistula after pneumonectomy was 15 %. Thirteen patients had a postoperative pneumonia (19 %). The overall 5 years survival was 22 % [19-32]. In the group of patients who had a complete resection, five-years survival for patients classified pathologically as N0 or N1 was 31 % and, for those classified as N2, 8 % (p=0.19). Surgical management after induction chemo and/or radiotherapy of NSC lung cancer should be considered, in the absence of N2 disease, when a complete resection is achievable. However this surgery is associated with an increased risk.

KEY-WORDS (Index Medicus) : LUNG NEOPLASMS, surgery. LUNG NEOPLASMS, drug therapy. LUNG NEOPLASMS, radiotherapy. ADJUVANTS, PHARMACEUTIC.

INTRODUCTION

La chirurgie est la pierre angulaire du traitement du cancer bronchopulmonaire non microcellulaire, dès lors que l'exérèse complète de la tumeur et des ganglions est techniquement et fonctionnellement possible.

Cependant les résultats de la chirurgie isolée des cancers non à petites cellules (CNPC) localement avancés (stade III) sont médiocres, notamment lorsque les ganglions du médiastin sont envahis [1] puisque la grande majorité des patients succombe de leur maladie dans les 2 ans (85 %) qui suivent la chirurgie. Ce stade regroupe en effet des tumeurs dont les caractéristiques, souvent associées, sont une extirpabilité complète rarement possible de la tumeur et des ganglions, et une fréquente présence de métastases viscérales infracliniques.

C'est dans ce groupe qu'un grand nombre d'essais de phase II et III ont été entrepris [2-6] , utilisant une combinaison de chimiothérapie, radiothérapie, et chirurgie. Les efforts actuels portent sur l'évaluation de traitements néoadjuvants [7-10], visant à induire une réduction du volume tumoral afin d'autoriser une exérèse, et à traiter les métastases infracliniques afin d'améliorer la survie. Les résultats de ces études sont controversés. Les études de phase II [11-12] sont limitées par des problèmes méthodologiques tels que l'hétérogénéité des populations étudiées, ou la difficulté d'un « staging » clinique rigoureux. Les trois études de phase III publiées à ce jour [9, 10,

13] connaissent les mêmes limites et comportent en outre des effectifs très réduits, de l'ordre de 30 patients par groupe. Très schématiquement, on peut illustrer l'efficacité de tels traitements par les taux suivants : réponse complète 10 %, réduction tumorale 50 %, stabilité 30 %, progression de la maladie [14, 15] 10 %.

Bien que la corrélation entre la réponse au traitement et la survie soit loin d'être parfaite, une tendance en faveur d'une augmentation de la survie est observée chez les patients répondeurs, en particulier lorsque la chimiothérapie associe plusieurs drogues synergiques. L'ampleur du bénéfice à long terme est cependant modeste et pourrait être complètement annulée par une augmentation des risques immédiats associés à ces traitements.

Peu de données sur les conséquences chirurgicales de ces traitements sont disponibles. Néanmoins, certains travaux suggèrent une augmentation sensible des risques opératoires [16, 17].

Nous avons donc entrepris cette étude afin d'évaluer les risques et les bénéfices de cette chirurgie réalisée après traitement oncologique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Il s'agit d'une analyse rétrospective d'une base de données saisies prospectivement. Ont été inclus tous les malades ayant eu une chirurgie thoracique pour une néoplasie bronchopulmonaire après traitement néoadjuvant pour la période du 1er janvier 1990 au 30 juin 1998 (n=69). Cette série représente 5 % de l'ensemble des patients opérés d'un cancer du poumon durant cette même période. Il y avait 60 hommes et 9 femmes. L'âge moyen était de 57 ans (± 11). Trente patients avaient un carcinome épidermoïde, 25 un adénocarcinome et 14 un carcinome indifférencié. Une radiochimiothérapie avait été pratiquée chez 43 patients qui avaient reçu de 2 à 4 cures (moy 2.9 ± 0.8 cures), et 43 ± 8 Gy (de 20 à 60 Gy). Vingt-six malades avaient eu une chimiothérapie exclusive (3 ± 0.7 cures). Cinq combinaisons de chimiothérapie avaient été répertoriées (Tableau 1). La chirurgie n'avait pas été retenue en première intention dans le plan du traitement en raison d'une tumeur jugée d'extirpabilité douteuse (stade IIIB ; n=40), de la présence d'adénopathies médiastinales (stade IIIA ; n=25) ou d'une contre-indication fonctionnelle temporaire (2 stades IIIA, 2 stades I ; n=4). L'extension médiastinale et l'envahissement ganglionnaire avaient été précisés principalement sur des données tomodensitométriques. Dix-sept patients (25 %) avaient eu une médiastinoscopie dans le bilan pré-thérapeutique. Parmi les 40 patients dont la tumeur avait été jugée d'extirpabilité douteuse, cet avis avait été porté en dehors de toute consultation chirurgicale chez 18 patients (45 %).

L'analyse a porté sur les circonstances ayant amené à poser l'indication chirurgicale, le type d'intervention réalisée (importance de l'exérèse pulmonaire, élargissement à d'autres structures, curage ganglionnaire, couverture du moignon bronchique), les résultats de la chirurgie (morbimortalité postopératoire, en appréciant tout parti-

TABLEAU 1. — Protocoles de chimiothérapie associée ou non à une radiothérapie.

Combinaisons	Nombre patients
Cisplatine/VP16	47
Cisplatine/Mitomycine/Navelbine	15
Cisplatine/Mitomycine/Vindésine	4
Cisplatine/5FU	2
Cisplatine/5FU/VP16	1

culièrement le risque infectieux, hémorragique et de fistule bronchique, survie éloignée). Une analyse critique de la survie a été faite dans le groupe de patients ayant subi une exérèse jugée complète.

L'étude descriptive fait appel aux paramètres usuels : médiane, moyenne, écart type, fréquence. La mortalité opératoire a compris tous les décès dans les 30 jours suivant l'intervention, et les décès plus tardifs s'ils étaient survenus au cours de la même hospitalisation. Il en était de même pour la morbidité opératoire non létale.

Les survies ont été calculées au 30 juin 1999 et exprimées en mois à partir de la date de l'intervention. Il n'y a pas de patient perdu de vue. La méthode de Kaplan-Meyer a été retenue pour le calcul de la probabilité de survie. La survie a été calculée, par l'intervalle de temps entre la date du décès et la date opératoire. La survie des malades, dont l'exérèse a été jugée curative, a été étudiée en fonction de deux variables (N postopératoire, réponse anatomoclinique), et la comparaison entre les courbes de survie a été effectuée grâce au test du Log Rank. Le seuil de 5 % ($p<0,05$) a été retenu comme seuil de significativité pour tous les tests statistiques.

RÉSULTATS

Quatre malades ont été opérés dans un contexte de sauvetage en raison d'une complication directement en rapport avec le traitement oncologique médical. Il s'agissait d'un pneumothorax par fonte nécrotique tumorale et de 3 pneumopathies suppurées itératives (Tableau 2).

Les nouvelles explorations fonctionnelles cardiorespiratoires des 4 patients considérés comme relevant d'une contre-indication permettaient d'effectuer le geste d'exérèse envisagé.

Pour les 61 autres patients, la chirurgie a représenté le volet adjuvant de la chimio et/ou radiothérapie. Vingt-sept patients n'avaient pas répondu au traitement oncologique. Trente-quatre patients avaient eu une réponse objective, dont 11 avec une

TABLEAU 2. — Données des 4 patients ayant eu une chirurgie de sauvetage.

	Age	TNM	RT±CT	Type CT	Complication
Obs 1	43	IIIB	0 4 cures	Cis Mito Nav	Pneumopathie *klebsielle*
Obs 2	63	IIIA	0 2 cures	Cis Mito Nav	Pneumopathie *pneumocoque* *+ herpès virus*
Obs 3	70	IIIB	45Gy ; 3cures	Cis Mito Nav	Pneumopathie *pneumocoque*
Obs 4	67	IIIB	45Gy ; 3cures	Cis VP16	Pneumothorax

Cis (cisplatine), Mito (mitomycine), Nav (navelbine)

réponse majeure, laissant un doute radiologique quant à un résidu tumoral. La chirurgie a été effectuée entre 4 et 8 semaines après l'arrêt du traitement oncologique médical, excepté pour les quatre malades opérés en urgence.

Il y a eu 4 thoracotomies exploratrices (6 %). La résection a été jugée incomplète (R1-R2) sur le plan micro et/ou macroscopique chez 6 patients. Cinquante-neuf patients ont eu une résection curative (R0). Il y a eu 33 pneumonectomies, 23 lobectomies, 1 bilobectomie et 8 résections conservatrices.

L'analyse des comptes-rendus opératoires a montré que la dissection avait été jugée souvent difficile et hémorragique en raison des tissus inflammatoires, avec une certaine difficulté à distinguer les résidus tumoraux des lésions fibreuses séquellaires. Parmi les 65 patients ayant subi une exérèse pulmonaire, 42 (soit 65 %) ont eu une résection élargie et 23 une exérèse standard (soit 35 %). Les élargissements ont concerné le péricarde dans 25 cas, la paroi thoracique dans 11 cas, la carène dans 3 cas et les vaisseaux sous-claviers dans 3 cas (tumeurs de Pancoast-Tobias).

Trente-trois pneumonectomies ont été pratiquées. Elles ont été effectuées 22 fois du côté droit et 11 fois du côté gauche. Une couverture bronchique a été réalisée 19 fois du côté droit (soit 90 %) et deux fois du côté gauche (soit 18 %). Le type de protection était un lambeau pleural dans 16 cas (76 %) ou un lambeau musculaire intercostal dans 5 cas (24 %).

Un curage médiastinal radical a été entrepris chez tous les malades dont l'exérèse était jugée complète, y compris lorsqu'il existait un envahissement ganglionnaire

extracapsulaire résécable. En revanche, en cas de doute sur le caractère complet de l'exérèse, un simple échantillonnage ganglionnaire à visée de stadification postopératoire était réalisé.

Alors que 67 patients étaient de stade III initialement (97 %), il n'y en avait plus que 36 au stade III postopératoire (53 %). Onze patients (16 %) n'avaient plus de processus tumoral sur la pièce opératoire (réponse histologique complète). Douze patients étaient de stade II et 10 de stade I.

Mortalité opératoire

Six patients (9 %) sont décédés au terme d'un délai moyen de 18,7 jours. La cause a toujours été d'origine respiratoire. Il y a eu 3 pneumopathies infectieuses, 2 syndromes de détresse respiratoire aiguë, et une insuffisance respiratoire aiguë d'origine indéterminée (Tableau 3). Les taux de mortalité postopératoire des lobectomies et des pneumonectomies ont été respectivement de 6 et 9 %. Le type d'exérèse (lobectomie [*vs*] pneumonectomie) et le type de traitement protoadjuvant (RTCT [*vs*] CT) n'ont pas été des facteurs prédictifs de mortalité postopératoire (p=0.65 et p=0.59 respectivement).

TABLEAU 3. — Données des 6 patients décédés en postopératoire.

	Age	RT±CT Type CT	Extir-pabilité	Cause decès
Obs 1	48	45Gy ; 3cures Cis/VP16	TE	Pneumopathie
Obs2	67	45Gy ; 3cures Cis/VP16	PD	Pneumopathie
Obs3	64	45Gy ; 3cures Cis/VP16	LSD	SDRAA
Obs4	61	0 ; 3cures Cis/Mito/Nav	PD	SDRAA
Obs5	70	45Gy ; 2cures Cis/VP16	PD	Insuffisance Respiratoire Aiguë
Obs6	67	0 ; 3cures Cis/VP16	LSD	Pneumopathie

Cis (cisplatine), Mito (mitomycine), Nav (navelbine), TE (thoracotomie exploratrice), LSD (lobectomie supérieure droite, PD (pneumonectomie droite), SDRAA (syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'adulte).

Morbidité immédiate non létale

Trente-quatre patients ont eu des suites opératoires considérées comme simples. Vingt-neuf (42 %) ont présenté une ou plusieurs complications de gravité très variable mais non létales. Elles ont été distinguées en complications majeures et mineures. Les complications majeures sont survenues chez 12 patients (17 %) et représentaient 41 % de l'ensemble des complications. Il y eut 4 complications chirurgicales qui ont nécessité une réintervention : 3 pour fistule bronchique, et 1 pour hémothorax.

Huit patients ont eu une complication majeure liée au terrain, traitée médicalement. Il s'agissait d'une pneumopathie infectieuse (n=6), d'une embolie pulmonaire et d'une insuffisance rénale.

Le type d'exérèse (lobectomie [*vs*] pneumonectomie) et le type de traitement proto-adjuvant (RTCT [*vs*] CT) n'ont pas été des facteurs prédictifs de complication majeure (p=0.61 et p=0.76 respectivement).

Les complications mineures sont survenues chez 17 patients (25 %). A noter que quatre patients ont eu deux complications différentes. Il y a eu 5 bullages prolongés de plus de 8 jours (16 %), 5 encombrements bronchopulmonaires dont 2 atélectasies (16 %) ayant nécessité une fibroaspiration, 4 troubles du rythme supra ventriculaires, 4 pneumopathies infectieuses, 2 parésies récurrentielles et 1 allergie à l'héparine.

Risque hémorragique

Le risque hémorragique a été évalué en quantifiant le nombre de patients transfusés en *per* et/ou postopératoire et le nombre de culots érythrocytaires. Trente-cinq patients ont été transfusés (51 %), en moyenne de 4,5 ± 3,8 unités de concentrés globulaires.

Il y a eu significativement plus de transfusions dans le groupe de patients ayant eu une chimiothérapie exclusive (p=0.001).

Fistules bronchiques

Cinq malades ont eu une fistule bronchique : 3 précoces et 2 tardives soit 15 % des malades ayant eu une pneumonectomie (Tableau 4*)*. Ces fistules sont toutes survenues du côté droit, soit une fréquence de fistules de 23 % après pneumonectomie droite, et toutes en dépit d'une couverture bronchique.

Les deux fistules précoces traitées par myoplastie intercostale ont cicatrisé. Le malade traité par une thoracostomie est décédé d'une insuffisance respiratoire au 10e mois.

Le patient traité d'une fistule tardive par une thoracostomie est décédé 40 jours plus tard en raison d'une érosion de la veine cave supérieure par les pansements itératifs.

TABLEAU 4. — Données des patients compliqués d'une fistule bronchique.

	RT±CT Gy ;Nb cure	Couverture moignon	Fistule Délai (jours)	Traitement Fistule
Fistule précoce	45Gy 3 cures	Plèvre	21	Thoracostomie
	0 2 cures	Plèvre	11	Myoplastie
	45Gy 3 cures	Myoplastie	21	Myoplastie
Fistule tardive	60Gy 4 cures	Plèvre	90	Drainage
	60Gy 4 cures	Plèvre	50	Thoracostomie

Le malade drainé en raison d'une fistule en rapport avec une récidive locale est décédé 6 mois après.

Le taux de fistule a été plus important dans le groupe de patients ayant eu une radiochimiothérapie (24 %), mais la différence n'a pas été significative (p=0.36).

Risque infectieux pulmonaire

Treize pneumopathies postopératoires (19 %) ont été observées, 9 sévères (13 %) dont 3 ayant conduit au décès, et 4 mineures (6 %). Trois étaient d'origine virale en rapport avec une infection à cytomégalovirus, une d'origine fongique et les autres d'origine bactérienne (n=6) ou non documentée (n=3) (Tableau 5).

Le type d'exérèse (lobectomie [*vs*] pneumonectomie) et le type de traitement proto-adjuvant (RTCT [*vs*] CT) n'ont pas été des facteurs prédictifs de pneumopathie infectieuse postopératoire (p=0.41 et p=0.40 respectivement).

Survie

La probabilité de survie globale des 69 patients, estimée selon la méthode de Kaplan Meyer, a été de 22 % à 5 ans avec des intervalles de confiance à 95 % [19-32] (Fig. 1).

La probabilité de survie globale des 59 patients qui ont eu une résection jugée complète (R0) a été de 24 % à 5 ans avec des intervalles de confiance à 95 % [20-35]. Au 30 juin 1999, 14 patients étaient vivants, 1 perdu de vue et 44 décédés (y compris

TABLEAU 5. — Données des patients ayant eu une pneumopathie postopératoire.

	Age	RT±CT Gy ;nb cure Type CT	Extir-pabilité	Germe Trt Devenir
Obs 1	48	45 Gy ; 3 Cis VP16	TE	Empirique Réanimation VA Décès
Obs 2	67	45 Gy ; 3 Cis VP16	PD	Empirique Réanimation VA Décès
Obs 3	67	0 ; 3 Cis VP16	LSD	*Cytomégalovirus* Réanimation Décès
Obs 4	64	0 ; 3 Cis Nav mito	LID	*Pneumocoque* Réanimation VA Vivant
Obs 5	75	45 Gy ; 3 Cis VP16	PG	Levures Réanimation Vivant
Obs 6	47	0 ; 3 Cis Nav mito	PD	Empirique Réanimation Vivant
Obs 7	66	60 Gy ; 4 Cis VP16	PD	*Cytomégalovirus* Réanimation VA Vivant
Obs 8	54	45 Gy ; 3 Cis VP16	LSD	*Staphylocoque* Réanimation Vivant
Obs 9	57	0 ; 3 Cis Nav mito	TE	*Pneumocoque* Service Vivant
Obs 10	56	30 Gy ; 4 Cis VP16	LID	*Haemophilus* Service Vivant
Obs 11	65	60 Gy ; 4 Cis Nav mito	PG	*Cytomégalovirus* Service Vivant
Obs 12	71	45 Gy ; 3 Cis VP16	LSD	*Pneumocoque* Service Vivant
Obs 13	62	45 Gy ; 3 Cis VP16	WLSD	*Pneumocoque* Service Vivant

Cis (cisplatine), Mito (mitomycine), Nav (navelbine), TE (thoracotomie exploratrice), LSD (lobectomie supérieure droite, PD (pneumonectomie droite), LID (lobectomie inférieure droite), PG (pneumonectomie gauche), W (wedge), VA (ventilation assistée).

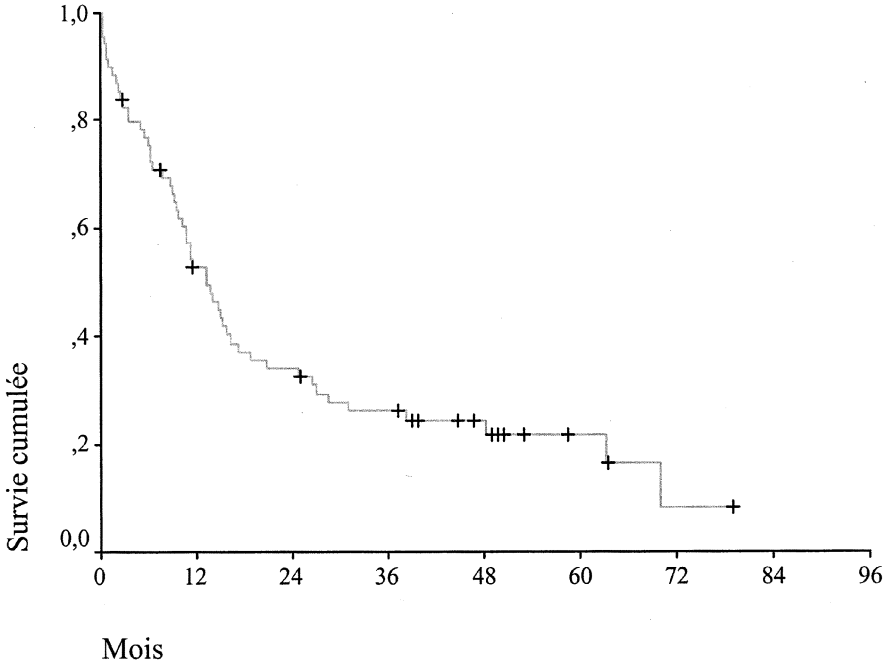


FIG. 1. — Survie globale des 69 patients.

les 4 décès postopératoires). La maladie initiale est à l'origine du décès de 26 patients par récidive locale et/ou générale.

Quatorze patients sont décédés d'une cause non néoplasique. Les causes étaient les suivantes : deux pneumopathies, deux insuffisances respiratoires chroniques, deux insuffisances cardiaques congestives, deux hémorragies digestives, une insuffisance respiratoire aiguë indéterminée, un accident vasculaire cérébral, et trois décès non documentés.

Parmi les 14 patients vivants, 10 ont eu une évolution sans récidive avec un recul moyen de 49,2 mois et 4 sont vivants avec une récidive. Le délai moyen d'apparition de la récidive a été de 4,3 mois.

La survie à 5 ans dans ce groupe de patients (R0) n'a pas été significativement influencée par le statut ganglionnaire (8 % N2 vs 31 % N0-1 ; p=0.19) (Fig. 2) ni par l'importance de la réponse anatomo-clinique (18 % réponse complète vs 26 % réponse incomplète ; p=0.81 ; Fig. 3). La survie n'a pas été également affectée par le type histologique.

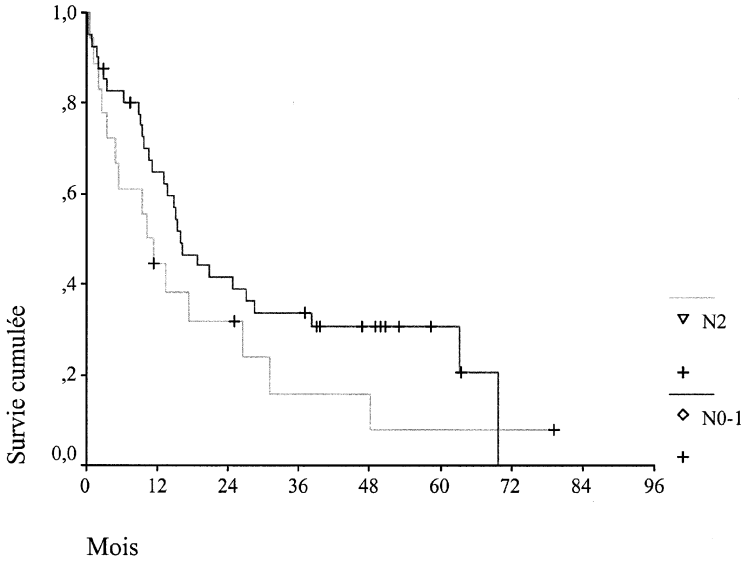


FIG. 2. — Survie selon le N postopératoire.

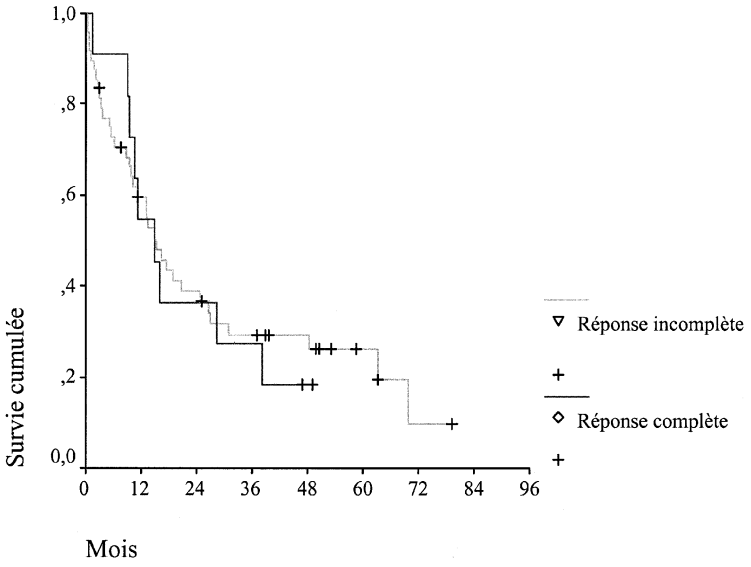


FIG. 3. — Survie en fonction de la réponse.

DISCUSSION

Le taux global de mortalité observé dans cette série est de 9 %. Ce taux est « acceptable » puisque dans les travaux portant sur les traitements d'induction, la mortalité postopératoire varie de 5,2 à 11 % [3, 4, 15, 17-19]. Il est cependant supérieur à ce qui est actuellement observé après une chirurgie de première intention [20, 21], suggérant une majoration par le traitement oncologique préopératoire [22]. Nous avons observé une mortalité postopératoire de 6 % après lobectomie. Mathisen [4] et Rice [15] rapportent également des taux plus élevés, de 7,4 % et 10 % respectivement. Il est en effet communément admis une mortalité inférieure à 2 % dans des conditions standard. En revanche, pratiquement toutes les séries font état d'une surmortalité de la pneumonectomie, variant de 10 à 17,5 % [3, 15, 17, 18, 23, 24]. Notre taux a été de 9 %, ce qui confirme les données de la littérature. Sur une série de 13 patients, Fowler [16] signale 3 décès (43 %) et met en garde contre les traitements d'induction associant RT et CT. Cet excès de mortalité de la pneumonectomie est habituellement expliqué par les risques de fistule bronchique et d'œdème lésionnel [3, 16, 18, 24, 25]. Macchiarini [24] et Martini [18] estiment que cet œdème est essentiellement lié à la toxicité pulmonaire de la mitomycine. Dans notre expérience, seul un patient avait eu un protocole utilisant de la mitomycine. L'effet pneumotoxique de la mitomycine est probablement potentialisé par une ventilation en O2 pur en *per* opératoire, ainsi que par l'association d'une RT dépassant 45 Gy [26, 27]. D'autres facteurs interviennent probablement comme l'interruption du drainage lymphatique du poumon restant par un curage ganglionnaire extensif, expliquant pourquoi ces œdèmes lésionnels se rencontrent plus fréquemment après pneumonectomie droite dont le curage associé est facilement plus complet qu'à gauche. Des facteurs infectieux, en particulier viraux, peuvent aussi être en cause [28]. Dans l'expérience de Macchiarini [24], les complications ont été plus fréquentes après RTCT (42 %) qu'après CT isolée (9 %). Dans notre série le type d'exérèse (lobectomie [*vs*] pneumonectomie) et le type de traitement néoadjuvant (RTCT [*vs*] CT) n'ont pas été des facteurs prédictifs de mortalité opératoire. Deux séries ayant utilisé des irradiations de 60 Gy en préopératoire signalent une mortalité prohibitive après pneumonectomie, atteignant 33 % [11] et 43 % [16] .

Le taux de fistule bronchique de cette série (15 %) est important et représente en fait 23 % des pneumonectomies droites puisqu'elles sont toutes survenues du côté droit. Sugarbaker et coll. [14] rapportent 3 cas compliquant un total de 17 pneumonectomies, soit 15 %.

Fowler [16] et Deutsch [11] ont reporté également un taux élevé de fistule bronchique lorsque des irradiations de 60 Gy en préopératoire avaient été effectuées. Tous ces taux sont nettement supérieurs à ceux observés après chirurgie standard, qui varient entre 4 et 7 % [20, 21] . Il semble que cet excès de fistule bronchique soit corrélé au traitement préopératoire et que le risque est d'autant plus élevé que la CT a été associée à une RT lorsque celle-ci a dépassé 45 Gy.

Il n'a pas été possible, d'un point de vue statistique, de dégager des facteurs prédictifs de fistule bronchique pour des raisons d'échantillonnage. Néanmoins nos données descriptives sont éloquentes. Il faut souligner que toutes ces fistules bronchiques sont survenues en dépit d'une protection bronchique. Cet échec trouve deux explications : d'une part, le curage ganglionnaire radical pratiqué par notre équipe et qui majore la dévitalisation du tissu bronchique et péribronchique, déjà altéré par le traitement préopératoire, et d'autre part la qualité du tissu utilisé pour couvrir la bronche (plèvre ou muscle intercostal) dont on peut supposer qu'elle était insuffisante soit du fait du traitement préopératoire (tissu irradié) soit d'un point de vue anatomique ne permettant pas de couvrir assez largement [29] (muscle intercostal) et solidement (plèvre) la suture bronchique. Alertés par ces résultats, nous utilisons maintenant de façon préférentielle le muscle diaphragmatique, donc prélevé hors d'un éventuel champ d'irradiation, qui permet de couvrir très largement la suture bronchique avec un résultat anatomique très satisfaisant [30].

L'utilisation du muscle grand dentelé a été également rapportée [29], néanmoins on peut lui opposer le handicap fonctionnel qu'elle entraîne (*scapula alata)*. En outre, il est toujours dans le volume irradié. Enfin nous réservons l'utilisation du grand épiploon pour une éventuelle complication postopératoire à type d'empyème avec ou sans fistule [17] . En effet, nécessitant une laparotomie qui majore l'altération de la fonction ventilatoire due à la thoracotomie, son utilisation de première intention [29] nous semble discutable.

Un patient sur deux (51 %) a dû être transfusé avec pour la plupart entre 3 et 5 culots érythrocytaires. Ce risque hémorragique a été répertorié dans d'autres travaux [3,16,19,24,31] portant sur la chirurgie d'exérèse après traitement néoadjuvant.

Dans notre étude, le recours à des transfusions est significativement plus fréquent dans le groupe de malades traités par CT isolée par rapport au groupe traité par RTCT. Il convient de préciser que la nécessité de transfusion était plus dictée par l'hématocrite préopératoire que par les pertes *per* et postopératoires.

Le taux de pneumopathie dans cette série est de 19 %. Ce taux est très élevé lorsqu'on le compare aux taux habituellement rapportés dans la littérature [3,11,14-17,19,24,31] qui varient de 0 à 9 %. Cette différence est probablement expliquée par le problème des critères de définition de la pneumopathie postopératoire et par le recueil des données. Il apparaît, dans notre travail, que le type d'exérèse (lobectomie [*vs*] pneumonectomie) et le type de traitement néoadjuvant (RTCT [*vs*] CT) ne sont pas des facteurs prédictifs de pneumopathie postopératoire.

Dans notre série, 4 malades avaient eu une pneumopathie virale ou fongique, agents non communément rencontrés. Ces causes ne sont pas communes après une chirurgie « conventionnelle ». Ce fait est vraisemblablement en rapport avec l'effet immunosuppresseur du traitement néoadjuvant. Cette morbidité spécifique n'avait jusqu'alors jamais été mentionnée. Aussi, ces agents devraient être systématiquement recherchés, dans ce contexte, lorsque les documentations bactériologiques usuelles font défaut. Le diagnostic de pneumopathie à cytomégalovirus reste diffi-

cile, et nécessite, en règle, un diagnostic histologique en complément d'une éventuelle virémie positive ou encore de cultures positives à partir du lavage bronchio-loalvéolaire. Cette confirmation histologique peut être obtenue à partir d'une biopsie transbronchique, ou d'une biopsie pulmonaire chirurgicale qui seule fournit une quantité de matériel suffisant pour de multiples recherches microbiologiques [32].

Le taux de réintervention précoce observé dans cette série (6 %) a été directement lié aux risques hémorragiques et de fistule bronchique précoce. Le risque d'une réintervention précoce est rarement mentionné dans les travaux portant sur les traitements d'induction. Néanmoins des taux de 17 % [11, 24] et 33 % [17] ont été rapportés.

Trois patients ont eu une fistule précoce. L'un d'eux a été traité par thoracostomie en raison d'un pyothorax associé à un sepsis général. Les deux autres ont pu cicatriser grâce à un lambeau musculaire intercostal qui a été réalisé précocement avant la survenue d'un pyothorax. Nous n'avons pas observé d'empyème sans fistule bien que le risque en soit *a priori* élevé dans ce contexte.

La probabilité de survie à 5 ans observée dans cette série (22 %) est remarquablement élevée. Depierre [22] rapporte un taux de survie à 3 ans de 49 % chez des patients porteurs d'une tumeur de stade I (excepté T1N0), II, IIIA opérés après une chimiothérapie d'induction. On aurait pu s'attendre à un chiffre beaucoup plus faible en raison du stade clinique initial. Cette survie globale n'est cependant pas informative. Elle n'est en fait qu'une résultante grossière recouvrant des taux correspondant à des stades de la maladie très différents. En outre, il est difficile de savoir si elle résulte d'un effet thérapeutique ou d'un processus de sélection des malades qui avaient les plus grandes chances statistiques de survivre [33].

Ce taux de probabilité de survie est supérieur à ce que l'on aurait pu attendre d'un traitement médical ou chirurgical exclusif. Il est cependant spéculatif de supposer que renoncer à la chirurgie aurait conduit à un ratio risque/bénéfice différent. Des lors, est-il possible d'identifier dans cette situation les patients qui pourraient tirer bénéfice de la chirurgie ?

L'analyse des courbes de survie comparées selon le pN (N postopératoire) montre qu'il existe une différence avec un taux de survie de 31 % pour les N0-1 et de 8 % pour les N2. Même si cette différence n'est pas significative (p=0.19), l'évaluation du N préopératoire permettrait de sélectionner les candidats pouvant tirer un meilleur bénéfice à long terme de l'exérèse. Cette réévaluation préopératoire (rN) pourrait se faire par une (re)médiastinoscopie voire une vidéothoracoscopie chirurgicale. Cette dernière permettrait également d'éviter le risque d'une thoracotomie exploratrice dans certains cas.

La réponse anatomoclinique complète n'augmente pas la probabilité de survie de ces patients, ce qui fait dire que le pronostic reste au stade initial de la maladie.

CONCLUSION

La chirurgie après traitement oncologique néoadjuvant est associée à une augmentation de la morbimortalité postopératoire puisque le risque de décès est de 1/10, le risque de développer une pneumopathie de 1/5, d'être transfusé de 1/2 et d'avoir une fistule bronchique après pneumonectomie de 1/7. Toutefois, le taux de survie observé reste supérieur à ce que l'on peut attendre d'un traitement médical ou chirurgical exclusif.

Afin de diminuer cette morbimortalité, il serait peut-être souhaitable de réévaluer les drogues et les techniques de radiothérapie utilisées en préopératoire.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Van Raemdonck D.E., Schneider A., Ginsberg R.J. — Surgical treatment for higher stage non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg,* 1992, *54*, 999-1013.

[2] Kirn D.H., Lynch T.J., Mentzer S.L. et coll. — Multimodality therapy of patients with stage IIIA N2 non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1993*, 106*, 696-702.

[3] Rusch V.W., Albain K.S., Crowley J.J. et coll. — Surgical resection of stage IIIA and stage IIIB non-small cell lung cancer after concurrent induction therapy. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1993, *105*, 97-106.

[4] Mathisen D.J., Wain J.C, Wright C. et coll. — Assessment of preoperative accelerated radiotherapy and chemotherapy in stage IIIA (N2) non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg,* 1996, *111*, 123-33.

[5] Edelman M.J., Gandara D.R., Roach M. et coll. — Multimodality therapy in stage III non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg,* 1996, *61*, 1564-72.

[6] Granone P., Margarritora S., Cesario A. et coll. — Concurrent radio-chemotherapy in N2 non-small cell lung cancer : interim analysis. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery,* 1997, *12*, 366-71.

[7] Vansteenkiste J., de Leyn P., Deneffe G., Menten J. et coll. — Present status of induction treatment in stageIIIA-N2 non-small cell lung cancer : a review. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 1998, *13*, 1-12.

[8] Marino P., Preatoni A., Cantoni A. — Randomized trials of radiotherapy alone versus combined chemotherapy and radiotherapy in stages IIIa and IIIb non-small cell lung cancer. A meta-Analysis. *Cancer,* 1995, *76*, 593-601.

[9] Rosell R., Gomez-Codina J., Camps C. et coll. — A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-small cell lung cancer. *N Engl J Med*, 1994, *330*, 153-8.

[10] Roth J.A., Fosella F., Komaki R. et coll. — A randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst,* 1994, 86, 673-80.

[11] Deutsch M., Crawford J., Leopold K. et coll. — Phase II study of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy with thoracotomy in the treatment of clinically staged IIIA non-small cell lung cancer. *Cancer*, 1994, *74*, 1243-52.

[12] Wagner H., Lad T., Piantadosi S., Ruckdeschel J.C. — Randomized phase 2 evaluation of preoperative radiation therapy and preoperative chemotherapy with mitomycin, vinblastine, and cisplatin in patients with technically unresectable stage IIIA and IIIB non-small cell lung cancer of the lung. LCSG 881. *Chest*, 1994, *106*, 348S-353S.

[13] Pass H.I., Pogrebniak H.W., Steinberg S.M. et coll. — Randomized trial of neoadjuvant therapy for lung cancer : interim analysis. *Ann Thorac Surg*, 1992, *53*, 992-8.

[14] Sugarbaker D.J., Herndon J., Kohman L.J. et coll. — Results of cancer and leukemia group B protocol 8935. A multiinstitutional phase II trimodality trial for stage IIIA (N2) non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg,* 1995, *109*, 473-85.

[15] Rice T.W., Adelstein D.J., Koka A. et coll. — Accelerated induction therapy and resection for poor prognosis stage III non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 1995, *60*, 586-92.

[16] Fowler W.C, Langer C.J., Curran W.J., Keller S.M. — Postoperative complications after combined protoadjuvant treatment of lung cancer. *Ann Thorac Surg,* 1993, *55*, 986-90.

[17] Regnard J.F, Icard P., Deneuville M. et coll. — Lung resection after high doses of mediastinal radiotherapy (sixty grays or more). Reinforcement of bronchial healing with thoracic muscle flaps in nine cases. *J Thorac Cardiovasc Surg,* 1994, *107*, 607-10.

[18] Martini N., Kris M.G., Flehinger B.J. et coll. — Preoperative chemotherapy for stage IIIA (N2) : the Sloan-Kettering experience with 136 patients. *Ann Thorac Surg*, 1993, *55*, 1365-74.

[19] Rusch V.W., Albain K.S., Crowley J.J. et coll. — Neoadjuvant therapy : a novel and effective treatment for stage IIIB non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 1994, *58*, 290-5.

[20] Thomas P., Massard G., Sielezneff I., Morati N., Giudicelli R., Garbe L., Reboud E., Fuentes P. — Résultats de la chirurgie des cancers bronchiques primitifs non microcellulaires. *Rev. Mal. Resp,* 1992, *9*, 531-7.

[21] Roeslin N., Chalkiadakis G., Dumont P. et coll. — Résultats de la chirurgie du cancer bronchique non anaplasique. Analyse critique de la survie. *Ann Chir,* 1987*, 41*, 469-73.

[22] Depierre A., Milleron B., Moro D. et coll. — Phase III trial of neoadjuvant chemotherapy in resectable stage I (except T1N0), II, IIIA non small cell lung cancer : the French experience. *Proc Am Soc Clin Oncol,* 1999, *18*, 465 (abstract 1792).

[23] Rusch V.W., Benfield J.R. — Neoadjuvant therapy for lung cancer : a note of caution. *Ann Thorac Surg*, 1993, *55*, 820-1.

[24] Macchiarini P., Chevalier A.R., Monnet I. et coll. — Extended operations after induction therapy for stage IIIB (T4) non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 1994, *57,* 966-73.

[25] Albertucci M., de Meester T.R, Rothberg M. et coll. — Surgery and the management of peripheral lung tumors adherent to the parietal pleura. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1992, *103*, 8-15.

[26] Twohig K.J., Matthay R.A. — Pulmonary effects of cytotoxic agents other than bleomycin. *Clin Chest Med*, 1990, *11*, 31-54.

[27] Burkes R.L., Ginsbeerg R.J., Shepherd F.A. et coll. — Induction chemotherapy with mitomycine, vindesine and cisplatin for Stage III unresectable non-small cell lung cancer : results of the toronto phase II trial. *J Clin Oncol,* 1992, *10*, 580-5.

[28] Papazian L., Fraisse A., Garbe L. et coll. — Cytomegalovirus. An unexpected cause of ventilator-associated pneumonia. *Anesthesiology,* 1996, *84*, 280-7.

[29] Grunenwald D., Baldeyrou P., Dennwald G. et coll. — Epiplooplasties et myoplasties préventives de couverture bronchique en chirurgie d'exérèse pulmonaire. Aspects techniques et résultats. *Ann Chir : chir thorac cardio-vasc,* 1994*, 48*, 248-52.

[30] Petrovsky B.V. — The use of diaphragmatic grafts for plastic operations in thoracic surgery. *J Thorac Cardiovasc, Surg*, 1969, *41*, 348-55.

[31] Massard G., Sohier B., Jung G.M. et coll. — Apport d'un traitement d'induction dans le traitement chirurgical des cancers non microcellulaires localements avancés. *Ann Chir : Chir thorac cardio-vasc*, 1995, *49*, 841-8.

[32] Papazian L., Thomas P., Bregeon F. et coll. — Open-lung biopsy in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology*, 1998, *88*, 935-44.

[33] Massard G., Kessler R., Wihlm J.M. — Improved selection of winners : a working hypothesis for neoadjuvant chemotherapy. *Ann Thorac Surg*, 1998, *66*, 300-1.

DISCUSSION

M. André VACHERON

La majorité de vos patients devait être des tabagiques invétérés. Avez-vous vérifié l'état de leurs coronaires avant l'intervention ? Avez-vous observé des infarctus myocardiques postopératoires dans votre série et quelle en a été l'évolution ?

L'état du réseau coronarien ne fait pas l'objet d'une vérification anatomique systématique avant toute intervention pour cancer bronchique. Une évaluation clinique, électrocardiographique et écho-cardiographique permet déjà une excellente approche ; ce n'est que si l'un des éléments précédents est perturbé qu'une coronarographie est réalisée. Il n'y a pas eu d'infarctus myocardique postopératoire dans cette série.

M. Pierre GODEAU

Avez-vous observé une différence de pronostic en fonction du type histologique : épidermoïde, adénocarcinome ou indifférencié ?

Aucune différence de pronostic n'a été observée en fonction du type histologique ; le paramètre histologique influençant péjorativement la survie est l'envahissement microscopique des ganglions médiastinaux.

M. Michel ARSAC

Ma première question rejoint celle posée par M. Godeau. Parmi les onze patients revenus au stade 0, y a t-il une corrélation avec le type histologique ?La deuxième question concerne le curage ganglionnaire médiastinal. Y a t-il eu une hémorragie nettement plus importante qu'en l'absence de radiochimiothérapie préopératoire ?

Parmi les 11 observations pour lesquelles aucune cellule tumorale n'a été retrouvée sur la pièce opératoire d'exérèse (parenchyme pulmonaire et ganglions médiastinaux) aucun type histologique préférentiel n'a été trouvé, les malades se répartissant de façon indifférente entre les trois types histologiques. Tous les comptes rendus opératoires font état d'une difficulté de dissection du hile pulmonaire ou du médiastin lorsqu'il est le siège d'adénopathies ; ces difficultés de dissection sont en rapport avec la sclérose cicatricielle survenant après radiothérapie et chimiothérapie, ces difficultés de dissection n'occasion-

nent pas véritablement de saignement peropératoire important mais sont la cause d'une suffusion « hémorragique » postopératoire, source indiscutable d'une augmentation des pertes sanguines.

M. Jacques ROCHEMAURE

Compte tenu des résultats actuellement publiés, ne pensez-vous pas que la chimiothérapie néoadjuvante devrait n'être proposée qu'après une évaluation très précise du stade de la tumeur et avec un recours plus fréquent à la médiastinoscopie ?

Vous trouverez dans le texte les détails du bilan effectué pour chaque malade et que, faute de temps, je n'ai pas développé au cours de cette communication. Bien sûr, une évaluation très précise du stade tumoral doit être un préalable à toute décision quant à la stratégie thérapeutique et en particulier à la prescription d'un traitement d'induction préopératoire. Les études publiées sont encore trop peu nombreuses et les séries de malades trop courtes pour que l'on puisse formellement et définitivement conclure qu'un traitement d'induction pré chirurgical chez les malades porteurs d'un cancer du poumon de stade III améliore notablement la survie ; par ailleurs, l'évaluation précise du stade passe nécessairement par l'appréciation de l'état des ganglions médiastinaux ; celui-ci ne peut être réellement effectué que par l'intermédiaire d'une médiastinoscopie, qui est un préalable incontournable à tout traitement d'induction ; dans cette série, beaucoup de malades n'ont pas bénéficié d'une médiastinoscopie, leur dossier ayant été apprécié uniquement sur des critères radiologiques et n'ayant pas fait l'objet, préalablement à toute décision, d'un avis chirurgical.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 405-416, séance du 27 février 2001

Les maladies humaines familiales à prions

Inherited human prion diseases

Jean-Marie WARTER *

RÉSUMÉ

Les maladies familiales à prions, même si elles sont rares, sont un des chapitres les plus fascinants de la pathologie neurologique en raison de leur double transmissibilité. Ce sont des maladies héréditaires de l'adulte à transmission autosomique dominante, à pénétrance presque complète : la maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale (CJ familiale), la maladie de Gerstmann Sträussler Scheinker (GSS), l'insomnie familiale fatale (IFF). Elles se caractérisent, le plus souvent, par une mutation ponctuelle du gène de la protéine prion (PrP), responsable d'une modification de la séquence primaire de la PrP donc de sa conformation. La PrP mutée acquiert-elle une nouvelle fonction ou perd-elle une fonction qui est encore inconnue ? Cette question reste actuellement sans réponse. La PrP mutée peut parfois être transmise de l'homme à l'animal. Si toutes les mutations ponctuelles de la PrP s'accompagnent d'un effet pathogène vis-à-vis des neurones, seules certaines d'entre elles sont transmissibles. Comprendre comment la PrP mutée acquiert ou non la propriété d'être transmissible peut être une étape fondamentale dans la compréhension des maladies à prions.

MOTS-CLÉS : PRION, MALADIES. MALADIES HÉRÉDITAIRES. TRANSMISSION MALADIE.

SUMMARY

Familial prion diseases (familial Creutzfeldt-Jakob disease : Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease, Fatal familial insomnia) are rare, but are also at present one of the most fascinating chapters of Neurology because of their double transmissibility. They are hereditary diseases of adults with a dominant autosomal transmission and an almost complete penetrance. They result most often of a point mutation of the gene of PrP with a consequent change in its primary sequence and conformation. Does the mutated PrP acquire a novel function or lose a still unknown function ? At present there is no answer tho these question. The mutated PrP may sometimes be transmitted from man to animals. All PrP point mutations appear to have a noxious effect on neurons, but only some of them are

* Service des Maladies du Système Nerveux et du Muscle. Hôpitaux Universitaires, 1 place de l'Hôpital, BP 426 — 67091 Strasbourg.

Tirés-à-part : Professeur Jean-Marie WARTER, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 7 septembre 2000, accepté le 9 octobre 2000.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 405-416, séance du 27 février 2001

transmissible. How mutated PrP acquires or does not acquire transmissibility may represent a fundamental progress in our understanding of prion diseases.

KEY-WORDS (Index Medicus) : PRION DISEASES. HEREDITARY DISEASES. DISEASE TRANSMISSION.

Les formes familiales des maladies à prions [1] : maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale (CJ), maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) et insomnie familiale fatale (IFF), partagent avec les formes sporadiques : maladie de CJ et Kuru (qui initialement a été considéré comme une maladie héréditaire) les mêmes caractéristiques cliniques, histologiques et évolutives. Elles touchent de façon sélective le système nerveux central ; la symptomatologie s'explique par le siège des lésions caractérisées par une perte neuronale, une spongiose intracellulaire et une gliose astrocytaire d'où la dénomination d'encéphalopathie spongiforme pour définir ces affections. Elles se traduisent parfois par un symptôme spécifique, une insomnie invincible, parfois par des syndromes moins caractéristiques, cérébelleux, démentiel, mais qui dans un contexte d'affection familiale prennent toute leur valeur. Enfin l'évolution est progressive, inexorable pour le moment, au-dessus de toute ressource thérapeutique.

Ces formes familiales débutent toujours à l'âge adulte et sont rares (10 % environ de l'ensemble des maladies à prions). Pourtant, elles ont eu et ont un intérêt majeur. Elles ont permis d'asseoir la théorie de la protéine prion dans la genèse des encéphalopathies spongiformes. Elles sont à transmission autosomique dominante, à pénétrance presque complète. Leur diagnostic reposait avant 1986 sur l'examen neuropathologique et depuis lors sur l'étude du gène du prion.

L'histoire de ces affections a évolué en deux périodes. La première fut anatomoclinique : individualisation d'une entité particulière puis démonstration de son appartenance aux encéphalopathies spongiformes. Ainsi, Gerstmann, Sträussler et Scheinker (1936) individualisèrent sur l'aspect des lésions neuropathologiques : dépôts de substance amyloïde de distribution multicentrique, l'affection qui porte leur nom [2], mais c'est en 1962 seulement que Seitelberger évoqua une possible relation entre cette affection et le Kuru [3]. De même, pour l'IFF, Lugaresi et *al*. décrivirent cette affection en 1966 [4], mais ce n'est qu'en 1992 en raison de la présence de discrètes lésions de spongiose dans les noyaux antérieurs du thalamus qu'un lien entre cette entité et les maladies à prions fut établi [5]. La seconde période fut génétique. Elle débuta en 1982, date à laquelle S. Prusiner proposa le concept novateur qui allait à l'encontre de tous les dogmes de la biologie moléculaire, d'une protéine infectante, le prion, (*proteinaceous infectious particle*) (PrP) [6]. Plusieurs arguments expérimentaux vinrent conforter la théorie de Prusiner : localisation du gène de la PrP sur le bras court du chromosome 20 [7] démonstration d'une liaison entre une mutation faux-sens P102L de ce gène et la maladie de GSS [8], réalisation d'un modèle de souris transgénique portant la mutation P101L et développant une

encéphalopathie spongiforme [9]. Dès 1989, Doh-Hura et *al*. montrèrent dans une famille française vivant en Alsace, que nous suivons, que d'autres mutations du gène de la PrP pouvaient être responsables d'un syndrome de GSS [10]. Depuis toutes les encéphalopathies spongiformes familiales ont pu être associées à une mutation de ce gène.

La séquence de la protéine PrP connue, il a été possible de développer des anticorps dirigés contre cette protéine et ainsi d'établir de façon irréfutable par des méthodes immunohistochimiques que les dépôts de substance amyloïde présents dans certaines formes d'encéphalopathie spongiforme étaient constitués de PrP. Ainsi la dénomination d'encéphalopathie spongiforme a pu être remplacée par celle de maladie à prions, terme que nous utiliserons même si la preuve absolue du rôle pathogène de la PrP n'a pas encore été rapportée.

Les formes héréditaires sont-elles, comme les formes sporadiques, transmissibles de l'homme à l'animal ? La plupart le sont, en particulier la mutation P102L du GSS, l'IFF et certaines formes de CJ familiales [11-12]. En revanche, la mutation A117V de la maladie de GSS n'est pas transmissible [12].

Les formes familiales des maladies à prions sont définies par une mutation du gène de la PrP. La protéine PrP est une protéine de 253 acides aminés [13]. Sa fonction est encore discutée. Des expériences de transgenèse sur différentes souches de souris n'ont pas permis d'apporter une réponse univoque à sa fonction. La PrP est une protéine qui est normalement présente dans toutes les cellules de l'organisme. Elle est fixée dans la membrane cellulaire par une ancre glypiée [14]. Elle est indispensable à la survenue de l'affection car une souris dépourvue du gène de la PrP ne développe pas de maladie après inoculation par des agents pathogènes de type scrapie [15], à savoir agent de la tremblante ou encéphalopathie spongiforme ovine. Treize mutations ponctuelles ont été décrites à ce jour, une mutation stop du codon 145 et des insertions d'un nombre augmenté, variable d'octapeptides entre le codon 51 et le codon 91. Le gène de la PrP est le siège de plusieurs polymorphismes, notamment aux codons M129V (valine-méthionine) et E219K (acide glutamique-lysine). Le rôle du codon 129 dans l'expression phénotypique de la mutation 178, sur laquelle nous reviendrons, est la démonstration de l'existence de gènes modificateurs intragéniques [16]. Quelle que soit la forme familiale, nous adopterons une classification génotypique, à savoir l'utilisation d'une abréviation à une lettre des acides aminés normal et muté entourant le codon muté. L'individualisation de différentes entités peut parfois prêter à controverse, car les critères phénotypiques retenus sont inconstants. Ainsi le GSS est classiquement défini par l'aspect des lésions neuropathologiques mais une des mutations a été décrite en l'absence de tout examen neuropathologique (mutation H187R) [17]. De même, dans l'IFF, l'insomnie constitue le critère diagnostique mais peut parfois être au second plan, absente ou objectivée uniquement par les enregistrements polysomnographiques et être présente au contraire dans d'autres formes de maladie du prion, acquise ou héréditaire [18].

Le syndrome de GSS est défini par la présence de plaques amyloïdes marquées par les anticorps anti-PrP, d'aspect multicentrique, formées de nombreux amas globulaires ou d'un centre amyloïde, entouré de petits dépôts globulaires localisés essentiellement dans le cortex cérébral, le cervelet et les ganglions de la base. La spongiose est inconstante, de sévérité et de distribution extrêmement variables. Des dégénérescences neurofibrillaires, marquées par les anticorps anti-protéine Tau, sont présentes dans certaines mutations. Actuellement sept mutations ponctuelles et une mutation stop ont été décrites [19].

La mutation P102L est la plus anciennement identifiée, la plus fréquente, elle est de distribution mondiale. La famille princeps décrite par Gerstmann et *al.* en était porteuse [20]. Elle a fait l'objet d'une description détaillée : 220 membres suivis sur 9 générations. Sur les 36 membres atteints, l'âge de début était très variable, de même la durée d'évolution. Le tableau clinique relativement homogène était dominé par un syndrome cérébelleux d'où la dénomination ancienne de forme ataxique de GSS ; au syndrome cérébelleux s'associent secondairement une démence et des signes pyramidaux. Le codon 129 sur l'allèle muté codait toujours pour une méthionine [21].

La mutation P105L se manifeste par une tétraparésie spastique suivie d'une démence. Elle est associée à un génotype valine du codon 129 sur l'allèle muté. Elle touche de façon exclusive la population japonaise. Son âge de début se situe après 40 ans et sa durée d'évolution est longue, supérieure à 7 ans [22].

La mutation A117V est toujours associée à un génotype valine du codon 129 sur l'allèle muté. Une famille alsacienne que nous suivons depuis plus de 20 ans est atteinte de cette affection ; quinze membres ont été ou sont actuellement atteints. L'âge de début se situe entre 19 et 64 ans, et la durée d'évolution est de 2 à 15 ans [23]. Pour les premières générations, le tableau clinique a été celui d'une démence du sujet âgé mais au fur et à mesure des générations, selon la branche de la famille touchée, le tableau clinique a été extrêmement variable. Dans certains cas, il pouvait débuter par un déficit pyramidal progressif évoluant sur des années ou parfois par un syndrome pseudobulbaire, la démence étant d'apparition tardive ; dans d'autres cas, la symptomatologie a été inaugurée par un syndrome démentiel (troubles du comportement orientant vers une atteinte frontale). Les lésions neuropathologiques au sein de cette famille étaient particulières par l'importance des dépôts de substance amyloïde, par la variabilité de l'intensité des lésions de spongiose et enfin par la présence de dégénérescences neurofibrillaires sans dépôt de substance amyloïde βA4 dans le cas le plus âgé [24]. Une autre caractéristique était la sensibilité des dépôts de substance amyloïde aux protéases chez le membre de la famille dont l'évolution fut la plus longue alors que dans les autres variétés de maladie à prions sporadiques ou héréditaires les dépôts protéiques restent résistants aux agents protéolytiques [25].

La mutation Y145 stop associée à un génotype méthionine du codon 129 n'a été décrite que dans un cas isolé. La maladie a débuté à 38 ans, a évolué pendant 21 ans, se manifestant essentiellement par un syndrome démentiel. La particularité histo-

pathologique était la présence d'une angiopathie amyloïde sévère en plus des lésions caractéristiques du GSS [26-27].

La mutation H187R a été décrite chez trois membres d'une même famille d'origine italienne atteints d'un syndrome démentiel avec ataxie, dysarthrie, myoclonies. Aucune étude neuropathologique n'a été rapportée [27].

La mutation F198S a été rapportée dans une famille nord-américaine et était associée à un génotype valine du codon 129 sur l'allèle muté. Les signes cliniques associaient un syndrome démentiel, un syndrome cérébelleux et des signes extrapyramidaux. A l'examen neuropathologique, la présence de dégénérescences neurofibrillaires en quantité importante en était la principale caractéristique. Cette famille est connue sous la dénomination de Indiana kindred [28, 29].

La mutation Q217R a été décrite dans une fratrie de Suédois qui a développé après 60 ans un syndrome démentiel, un syndrome cérébelleux, pyramidal et extrapyramidal. La présence de dégénérescences neurofibrillaires et de dépôts de substance β A4 ne permet pas d'exclure une possible association entre une maladie à prions et une maladie d'Alzheimer [29].

Dans l'IFF les troubles du sommeil ou de la vigilance sont les principales caractéristiques cliniques. Une insomnie intraitable a donné son nom à la maladie, mais un état stuporeux peut parfois masquer l'insomnie. Des épisodes oniriques avec hallucinations, des rêves éveillés ou un état confusionnel sont fréquents. Ils peuvent inaugurer la maladie, mais peuvent apparaître à un stade tardif chez les patients dont le tableau clinique initial évoque plutôt une maladie de CJ. L'IFF est une affection de transmission autosomique dominante, dont la relation avec les encéphalopathies à prion n'a été démontrée qu'en 1992 par Médori et *al*, qui ont mis en évidence une mutation du gène de la PrP D178N associée à un génotype du codon 129 de type méthionine sur l'allèle muté [5]. Cette mutation est présente dans toutes les familles décrites à ce jour. La transmissibilité de l'IFF a été clairement établie en 1995 [11]. Plus de 25 familles ont été rapportées, l'âge d'apparition des symptômes varie entre 35 et 62 ans, la durée d'évolution est de 8 à 72 mois. Des troubles dysautonomiques sont constants, témoins le plus souvent d'une hyperactivité sympathique, troubles de la régulation de la tension artérielle, de la sudation, de la température. Les autres signes neurologiques sont variés et non spécifiques : signes pyramidaux, myoclonies spontanées ou réflexes, dysarthie, dysphagie, signes cérébelleux ; en revanche, le syndrome démentiel est plus exceptionnel, mais des troubles cognitifs et du comportement sont fréquents en rapport avec l'insomnie. Les troubles du sommeil peuvent être au second plan et parfois même passer inaperçus en l'absence d'enregistrement polysomnographique. Ces enregistrements sont indispensables pour montrer une réduction du temps total de sommeil, une désorganisation des cycles conduisant à une abolition des phases de sommeil lent et une persistance de brèves périodes de sommeil paradoxal associées à des troubles moteurs comportementaux [30]. Les études des corrélations génotype-phénotype montrent que les patients homozygotes méthionine au codon 129 ont une durée

d'évolution plus courte et des troubles du sommeil et dysautonomiques précoces, alors que les patients hétérozygotes méthionine-valine ont une durée d'évolution plus longue et souvent débutent leur maladie par des troubles moteurs [31]. Les lésions histologiques prédominent sur les noyaux médio-dorsal et antéro-ventral du thalamus, et s'étendent parfois à l'olive bulbaire surtout lorsqu'il existe des myoclonies. Les lésions corticales sont plus rares et variables dans leur intensité.

La maladie de CJ familiale a été individualisée en 1992 par Goldfard et *al* qui montrèrent que la mutation D178N associée sur l'allèle muté à un génotype valine du codon 129 se traduisait par une maladie de CJ [32, 33]. En dehors d'un début à un âge plus jeune, d'une durée d'évolution plus prolongée et de l'absence d'anomalie EEG caractéristique, le tableau clinique n'est guère différent d'un CJ sporadique [34]. La mutation E200K est la plus fréquente [35]. Elle a été décrite initialement chez des israélites d'origine lybienne après que l'hypothèse d'une contamination alimentaire par la cervelle de mouton atteint de scrapie ait été éliminée. La pénétrance semble complète après 85 ans mais cette donnée reste discutée [36]. La particularité de cette forme est la possibilité d'une atteinte du système nerveux périphérique [37]. Un certain nombre d'autres mutations ponctuelles ont été décrites, la mutation M232R [38], mais apparemment sans antécédents familiaux chez trois patients japonais, la mutation T183M affectant une famille brésilienne dont le tableau clinique se résumait à une démence d'allure fronto-temporale survenant chez des sujets de plus de 45 ans et évoluant sur une période de 4 ans environ [39], la mutation V210L dans plusieurs familles [40, 41], la mutation R208H dans une famille américaine [42], une double mutation V180L et N232R chez un patient [43].

Les formes familiales avec insertion de répétitions d'octapeptides, dont une dizaine de familles ont été décrites à travers le monde à ce jour, doivent être isolées des autres formes familiales de maladies à prions. Elles se caractérisent par une démence associée à des troubles cérébelleux et extrapyramidaux. La durée d'évolution est variable de deux mois à quinze ans. L'aspect des lésions neuropathologiques, en particulier la présence de dépôts amyloïdes, semble en corrélation avec le nombre des répétitions d'octapeptides. Dans tous les cas, la spongiose dans le cortex cérébral et/ou dans les noyaux gris centraux est d'intensité modérée [44].

Enfin des délétions du gène de la PrP ont été rapportées. Elles n'ont pas de traduction clinique connue.

Ainsi les formes familiales des maladies à prions en dehors de la mutation P102L, de l'IFF et de la mutation E 200K sont exceptionnelles. A chaque famille ou presque sa mutation. Pourtant à une mutation donnée ne correspond pas un phénotype spécifique. Bien au contraire, au sein d'une même famille le tableau anatomoclinique peut même être extrêmement différent, conduisant à évoquer le rôle de gènes modificateurs [16]. Dans la mutation D178N, le codon 129 joue un rôle majeur non seulement dans l'expression anatomoclinique de l'affection mais aussi dans la gravité de la maladie. Néanmoins, le génotype du codon 129 ne permet pas d'expliquer toutes les variations d'expression phénotypique d'une même mutation.

D'autres facteurs modulateurs pourraient être impliqués, sont-ils d'origine génétique ou environnementale ? Cette question est encore sans réponse et dépasse le cadre des seules maladies à prions.

Un des intérêts fondamentaux de l'étude des formes familiales des maladies neurologiques dégénératives est de permettre d'aborder leur pathogénie. En effet, reconnaître le gène muté permet d'identifier la protéine anormale, sa localisation dans la cellule et la création de modèles animaux transgéniques surexprimants ou dépourvus de cette protéine. Les informations ainsi obtenues permettent d'essayer de reconstituer le puzzle de la pathogénie des maladies neurodégénératives. A titre d'exemple, l'apport des formes familiales dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer est exemplaire. Les mutations des gènes de l'APP (amyloïde protéine précurseur) et des présénilines 1 et 2 sont à l'origine des formes familiales de maladie d'Alzheimer. Or l'APP est la protéine dont est issu le peptide βA4, le principal composant des plaques séniles et les présénilines sont des enzymes impliqués dans le métabolisme de l'APP. Dans les maladies à prions, ce sont les formes familiales qui ont permis de conforter l'hypothèse du rôle de la protéine prion.

Les maladies à prions occupent une place particulière au sein des maladies neurodégénératives en raison de leur double transmissibilité, héréditaire selon un mode mendelien et infectante. Depuis que Prusiner a formulé son hypothèse, il y a 18 ans, un début de réponse a pu être apporté à ce paradoxe de la double transmission encore jamais observée en pathologie humaine. Dans les formes sporadiques, un certain nombre de molécules de PrP changent de conformation tridimensionnelle. La PrP ainsi modifiée inter-réagit avec la PrP normale ; elle en modifie la conformation de proche en proche, soit directement par nucléation ou dimérisation, soit indirectement sous l'effet de l'intervention d'une autre protéine. Dans les formes familiales, on admet que la substitution d'un acide aminé par un autre modifie la conformation de la PrP. Le changement de conformation dans les formes familiales est à l'origine de son effet délétère sur les neurones [45]. Au cours de la mutation A117V les données expérimentales [47] et neuropathologiques : disparition des dépôts de substance amyloïde sous l'effet d'agents protéolytiques, suggèrent que la persistance d'une structure βplissée n'est pas nécessaire à l'effet pathogène du prion. En revanche, pour la transmissibilité de l'affection de l'homme à l'animal, la conformation βplissée semble une condition nécessaire mais pas suffisante car sinon toutes les maladies neurologiques avec dépôts de substance amyloïde devraient être transmissibles. Ainsi les facteurs responsables de l'effet pathogène et de la transmissibilité peuvent être dissociés [48].

Une autre question est la sélectivité du siège des lésions. Pourquoi dans la mutation D178N suivant qu'elle est associée au codon 129 à une méthionine ou à une valine, les lésions se localisent-elles soit au seul noyau antérieur du thalamus, soit à l'ensemble du cortex cérébral et cérébelleux ? La conformation de la PrP dans ces deux affections est différente, comme le montre leur profil électrophorétique [49]. Cette différence de conformation pourrait être à l'origine d'interactions de la PrP avec des protéines neuronales différentes expliquant ainsi la topographie des lésions.

C'est au sein même de la protéine PrP que doit se trouver l'explication de cette énigme qui illustre bien l'évolution de la biologie : au tout génomique se substitue progressivement le tout protéomique.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Prusiner S.B., Hsiao K.K. — Human prion diseases. *Ann Neurol,* 1994, *35*, 385-395.

[2] Gerstmann J., Straüssler E., Scheinker I. — Uber eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems Zugleich ein Beitrag zur Frage des Vorzeitigen lokalen Alterns. *Z. Ges. Neurol. Psychiat.,* 1936, *154*, 748-762.

[3] Seitelberger F. — Eigenartige familiär-hereditäre Krankheit des Zentralnervensystems in einer niederösterreichischen Sippe. *Wiener klinische Wochenschrift,* 1962, 41/42, 687-691.

[4] Lugaresi E., Medori R., Montagna P., Baruzzi A., Cortelli P., Lugaresi A., Tinuper P. Zucconi M., Gambetti P. — Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *New Engl J of Med,* 1986, *315*, 997-1003.

[5] Medori R., Tritschler H.J., Le Blanc A., Villare F., Manetto V., Che H.Y., Leal S., Montagna P., Cortelli P., Tinuper P., Avonie P., Mochi M., Baruzzi A., Hauw J.J., Ott J., Lugaresi E., Autilio-Gambetti L., Gambetti P. — Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N. Engl. J. Med,* 1992, *326*, 444-449.

[6] Prusiner S.B. — Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science,* 1982, *216*, 136-144.

[7] Sparkes R.S., Simon M., Cohn V.H., Fournier R.E.K., Lem J., Klisak I., Heinzmann C., Blatt C., Lucero M., Mohandas T., De Armond S.J., Westaway D., Prusiner S.B., Weiner L.P — Assignment of the human and mouse prion protein gene to homologous chronosomes. *Proc. Natl. Sci. USA,* 1986, *83*, 7358-7362.

[8] Hsiao K.K., Baker H.F., Crow T.J., Poulter M., Owen F., Terwilliger J.D., Westaway D., Ott J., Prusiner S.B. — Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Nature,* 1989, *338*, 342-345.

[9] Hsiao K.K., Scott M., Foster D., Groth D.F., de Armond S.J., Prusiner S.B. — Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science,* 1990, *250*, 1587-1590.

[10] Doh-ura K., Tateishi J., Sasaki H., Kitamoto T., Sakaki Y. — Pro-leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Biochem Biophys. Research Commun*, 1989, *163*, 974-979.

[11] Tateishi J., Brown P., Kitamoto T., Hoque Z.M., Roos R., Wollman R., Cervenakova L., Gajdusek D.C. — First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature,* 1995, *376*, 434-435.

[12] Tateishi J., Kitamoto T. — Inherited prion diseases and transmission to rodents. *Brain Pathol,* 1995, *5*, 53-59.

[13] Meyer R.K, Mc Kinley M.P., Bowman K.A., Braunfeld M.B., Barry R.A., Prusiner S.B., de Armond S.J. — Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1986, *83,* 2310-2314.

[14] Stahl N., Borchelt D.R., Hsiao K., Prusiner S.B. — Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell,* 1987, *52*, 229-240.

[15] Bueler H., Fischer M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H.P., de Armond S.J., Prusiner S.B., Aguer M., Weissmann C. — Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell surface PrP. *Nature,* 1992, *356*, 577-582.

[16] Feingold J. — Les gènes modificateurs dans les maladies héréditaires. *Sté Française de Génétique M/S,* 2000, *4*, 1-5.

[17] Cervenakova L., Buetefisch C., Lee H.S., Taller I., Stonne G., Gibbs C.J., Brown P. Hallet M., Goldfarb L.G. — Novel PRNP sequence variant associated with familial encephalopathy. *Am. J. Med. Genet*, 1999, *88*, 653-656.

[18] Chapman J., Arlazoroff A., Goldfarb L.G., Cervenakova L., Neufeld M.Y., Werber E., Herbert M., Brown P., Gajdusek D.C., Korczyn A.D. — Fatal insomnia in a case of familial Creutzfeldt-Jakob disease with the codon 200^{Lys} mutation. *Neurology,* 1996, *46*, 758-761.

[19] Tranchant C., Warter J.M. — Le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker. *Rev. Neurol,* 1998, *154*, 152-157.

[20] Kretzchmar H.A., Honold G., Seitelberger F., Feucht M., Wessely P., Mehraein P., Budka H. — Prion protein mutation in family first reported by Gerstmann, Sträussler, and Scheinker. *Lancet,* 1991, *337*, 1160.

[21] Hainfellner J.A., Brantner-Inthaler S., Cervenakova L., Brown P., Kitamoto T., Tateishi J., Diringer H., Liberski P.P., Regele H., Feucht M., Mayr N., Wessely P., Summer K., Seitelberger F., Budka H. — The original Gerstmann-Sträussler-Scheinker family of Austria : divergent clinicopathological phenotypes but constant PrP genotype. *Brain Pathol,* 1995, *5*, 201-211.

[22] Yamada M., Itho Y., Inaba M.D., Wada Y. Takashima M. Satho S., Kamata T., Okeda R., Kayano T., Suematsu N., Kitamoto T., Otomo E., Matsushita M., Mizusawa H. — An inherited prion disease with a PrP P105L mutation. Clinicopathologic and PrP heterogeneity. *Neurology,* 1999, *53*, 181-188.

[23] Tranchant C., Doh-Ura K., Steinmetz G., Chevalier Y., Kitamoto T., Tateishi J., Warter J.M. — Mutation du codon 117 du gène du prion dans une maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker. *Rev. Neurol.,* 1991, *147*, 274-278.

[24] Tranchant C., Sergeant N., Wattez A., Mohr M., Warter J.M., Delacourte A. — Neurofibrillary tangles in Gerstmann — Sträussler-Scheinker syndrome with the A117V prion gene mutation. *J Neurol. Neurosurg. Psych.,* 1997, *63*, 240-246.

[25] Mohr M., Tranchant C., Steinmetz G., Floquet J., Grignon Y. Warter J.M. — Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease and the French-Alsatian A117V variant. *Clin Exp Path,* 1999, *47*, 161-175.

[26] Ghetti B., Picardo P., Spillantini M.G., Ichimiya Y., Porro M., Perini F., Kitamoto T., Tateishi J., Seiler C., Fragnione B., Bugiani J.O., Giaccone G., Prelli F., Goedert M., Dlouhy S.R., Tagliavini F. — Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with positive neurofibrillary tangles : the phenotype of the stop codon 145 mutation in P.R.N.P. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, *93*, 744-748.

[27] Ghetti B., Piccardo P., Frangione B., Bugiani O., Giaccone G., Young K., Prelli F., Farlow M.R., Dlouhy S.R., Tagliavini F. — Prion protein amyloidosis. *Brain Pathol.,* 1996, *6*, 127-145.

[28] Ghetti B., Dlouhy S.R., Giaccone G., Bugiani O., Frangione B., Farlow M.R., Tagliavini F. — Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease and the Indiana kindred. *Brain Pathol,* 1995, *5*, 61-75.

[29] Hsiao K., Dlouhy S.R., Farlow M.R., Cass C., da Costa M., Conneally P.M., Hodes M.E., Ghetti B., Prusiner S.B. — Mutant prion proteins in Gerstamnn-Sträussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nature Genetics,* 1992, *1*, 68-71.

[30] Lugaresi E., Tobler I., Gambetti P., Montagna P. — The pathophysiology of fatal familial insomnia. *Brain Pathol.,* 1998, *8*, 521-526.

[31] Montagna P., Cortelli P., Avoni P., Tinuper P., Plazzi G., Gallassi R., Portaluppi F., Julien J., Vital C., Delisle M.B., Gambetti P., Lugaresi E. — Clinical features of fatal familial insomnia : phenotypic variability in relation to a polymorphsim at codon 129 of the prion protein gene. *Brain Pathol,* 1998, *8*, 515-520.

[32] Goldfarb L.G., Petersen R. B., Tabaton M., Brown P., Leblanc A.C., Montagna P., Cortelli P., Julien J., Vital C., Pendelbury W.W., Haltia M., Wills P.R., Hauw J.J., McKeever P.E., Monari L., Schrank B., Swergold G.D., Autilio-Gambetti L., Gadjdusek D.C., Lugaresi E., Gambetti P. — Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease : disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science*, 1992, *258*, 806-808.

[33] Goldfarb L.G., Brown P., Haltia M., Cathala F., Mccombie W.R., Cervenakova L., Goldin L., Nieto A., Godec M.S., Asher D.M., Gajdusek D.C. — Creutzfeldt-Jakob disease cosegregates with the codon 178^{Asn} PRNP mutation in families of european origin. *Ann. Neurol.,* 1992, *31*, 274-281.

[34] Monari L., Chen S.G., Brown P., Parchi P., Petersen R.B., Mikol J., Gray F., Cortelli P., Montagna P., Ghetti B., Goldfarb L.G., Gajdusek D.C., Lugaresi E., Gambetti P., Autilio-Gambetti L. — Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease : different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA,* 1994, *91*, 2839-2842.

[35] Hsiao K., Meiner Z., Kahana E., Cass C., Kahana I., Avrahami D., Scarlato G., Abramsky O., Prusiner S.B., Gabizon R. — Mutation of the prion protein in Libyan jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med,* 1991, *324*, 1091-1097.

[36] Meiner Z., Gabizon R., Prusiner S.B. — Familial Creutzfeldt-Jakob disease codon 200 prion disease in Libyan jews. *Medicine* 1997, *76*, 227-237.

[37] Antoine J.C., Laplanche J.L., Mosnier J.F., Beaudry P., Chatelain J., Michel D. — Demyelinating peripheral neuropathy with Creutzfeldt-Jakob disease and mutation at codon 200 of the prion protein gene. *Neurology,* 1996, *43*, 1123-1127.

[38] Hoque M.Z., Kitamoto T., Furukawa H., Muramoto T., Tateishi J. — Mutation in the prion protein gene at codon 232 in Japanese patients with Creutzfeldt-Jakob disease : a clinicopathological, immunohistochemical and transmission study. *Acta Neuropathol,* 1996, *92*, 441-446.

[39] Nitrini R., Rosenmberg S., Passos-Bueno M.R., da Silva L.S., Iughetti P., Papadopoulos M., Carrilho PM., Caramelli P., Albrecht S., Zatz M., Le Blanc A. — Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. *Ann Neurol.,* 1997, *42*, 138-146.

[40] Ripoll L., Laplanche J.L, Salzmann M., Jouvet A., Planques B., Dussaucy M., Chatelain J., Beaudry P., Launay J.M. — A new point mutation in the prion protein gene at codon 210 in Creutzfledt-Jakob disease. *Neurology,* 1993, *43,* 1934-1938.

[41] Pocchiari M., Salvatore M., Cutruzzola F., Genuardi M, Travaglini Allocatelli C.T., Masullo C., Macchi G., Alema G., Galgani S., Xi Y.G., Petroli R., Sylvestrini M.C., Brunori M. — A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol,* 1993, *34*, 802-807.

[42] Mastrianni J.A., Iannicola C., Myers R.M., de Armond S., Prusiner S.B — Mutation of the prion protein gene at codon 208 in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology,* 1996, *47*, 1305-1312.

[43] Hitoshi S., Nagura H., Yamanouchi H., Kitamoto T. — Double mutations at codon 180 and codon 232 of the PRNP gene in an apparently sporadic case of Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Sci.,* 1993*, 120,* 208-212.

[44] Vital C., Gray F., Vital A., Ferrer X., Julien J. — Prion disease with octapeptide repeat insertion. *Clin Exp Path,* 1999, *47,* 153-159.

[45] Kretzschmar H.A., Giese A., Brown D.R., Herms J., Keller B., Schmidt B., Groschup M. — Cell death in prion disease. *J. Neural Transm.,* 1997, *50*, 191-210.

[46] Hegde R.S. Mastrianni J.A., Scott M.R., de Fea K.A., Tremblay P., Torchia M., de Armond S.J., Prusiner S.B., Lingappa V.R. — A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science*, 1998, *279*, 827-834.

[47] Hegde R.S, Tremblay P., Groth D., de Armond S.J., Prusiner S.B., Lingappa V.R. — Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature*, 1999*, 402,* 822-826.

[48] Cappai R., Stewart L., Jobling M.F., Thyer J.M., White A.R., Beyreuther K, Collins S.J. Masters C.L., Barrow C.J. — familial prion disease mutation alters the secondary structure of recombinant mouse prion protein : implications for the mechanism of prion formation. *Biochemistry,* 1999, *38*, 3280-3284.

[49] Piccardo P., Dlouhy S.R., Lievens P.M.J., Young K., Bird T.D., Nochlin D., Dickson D.W., Vinters H.V., Zimmerman T.R., Mackenzie I.R.A., Kish S.J., Ang L.C., de Carli C., Pocchiari M., Brown P., Gibbs C.J., Gajdusek D.C., Bugiani O., Ironside J., Tagliavini F., Ghetti B. — Phenotypic variability of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 1998, *57,* 979-988.

DISCUSSION

M. Roger NORDMANN

Vous avez montré l'intérêt de l'étude des maladies humaines familiales à prions pour comprendre les mécanismes de neurotrophicité. Cette étude peut-elle permettre également de progresser dans la compréhension des nouveaux variants de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ? A notre connaissance, en effet, il y a une différence fondamentale entre les maladies familiales (au cours desquelles existe une altération de la structure primaire de la protéine prion) et l'ESB (qui se caractérise par une altération de la structure dans l'espace de la PrP sans modification de sa structure primaire). Comment expliquer ce paradoxe apparent ?

En fait, dans les formes héréditaires comme dans les formes sporadiques, le prion change de conformation tridimensionnelle... Il est certes plus facile de comprendre qu'une mutation ponctuelle puisse modifier la conformation d'une protéine mais, dans les deux cas, le prion acquiert une structure fibrillaire, insoluble, résistante aux agents protéolytiques.

M. Claude DREUX

*Vous avez indiqué que le rôle de la protéine prion normale PrP^c était inconnu. Cependant, son rôle dans les mécanismes de signalisation (transduction) cellulaire a été caractérisé par les équipes de M.O. Kellermann et J.L. Laplanche (*Science*, 15 sept 2000). Il a été prouvé que le polymorphisme sur le codon 129 modifiait le temps d'incubation dans la MCJ iatrogène (hormone de croissance d'origine humaine). En est-il de même pour les maladies*

liées aux mutations du codon 117 ? Le caractère de transmissibilité de l'homme à l'animal est-il lié à l'espèce animale considérée (cas des mutations 117 et 102 que vous avez signalées).

Le rôle de la protéine prion PrP^c, comme participant à la transduction du signal où son rôle dans le contrôle du métabolisme des radicaux libres, reste discuté. Le polymorphisme du codon 129 ne semble pas pouvoir expliquer les durées d'évolution de la maladie, en témoigne la famille présentée : l'âge de début varie de 20 à 64 ans, la durée d'évolution d'un an à 18 ans et cela pour la même mutation au niveau du codon 117 associé à une valine sur l'allèle muté au niveau du codon 129. Les essais de transmission de la famille alsacienne ont été réalisés chez différentes espèces animales, singes, rongeurs.

M. Jean-Claude GAUTIER

A t-on une idée des mécanismes de la modification de la configuration spatiale de la PrP normale ? Quel que soit le poids de l'évidence en faveur de l'hypothèse « prion », y a t-il une place pour d'autres hypothèses étiologiques ?

Les mécanismes responsables du changement de conformation de la PrP normale restent discutés. La plupart des auteurs, en particulier Prusiner, font appel à la notion d'une troisième protéine, la protéine X, qui agirait comme protéine chaperonne. Tant que le rôle et les mécanismes de transformation conformationnelle de la PrP^c en PrP^{sc} n'auront pas été identifiés, il y a place pour d'autres hypothèses, en particulier l'hypothèse virale, même si malgré plus de 18 ans de recherche, il n'a jamais été mis en évidence d'acide nucléïque associé à la protéine du prion.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 417-426, séance du 27 février 2001

Les chondrocalcinoses articulaires familiales : étude d'une famille alsacienne

Hereditary diffuse articular chondrocalcinosis : study of an alsatian family

Patrick NETTER*, Damien LOEUILLE* **, Jean-Yves JOUZEAU*, Pierre GILLET* **, Joël PETERSCHMITT***, Jacques POUREL* **, Alain GAUCHER*

RÉSUMÉ

Les formes familiales de chondrocalcinoses articulaires sont une maladie chronique caractérisée par des accès articulaires aigus, la présence de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté dans le liquide synovial, le cartilage et les tissus péri-articulaires et, sur les radiographies, une incrustation calcique des cartilages et fibrocartilages de l'organisme. Nous avons étudié une famille alsacienne dans laquelle la transmission est autosomique dominante. L'analyse génétique entreprise a permis de montrer, comme dans les familles anglaises et argentines, une liaison avec le bras court du chromosome 5p, suggérant qu'une anomalie d'un gène situé dans cette région pourrait être impliquée dans ces formes familiales.

Mots-clés : Chondrocalcinose, génétique. Généalogie. Cartilage articulaire.

SUMMARY

Familial articular chondrocalcinosis is a chronic articular disease characterized by acute intermittent attacks of arthritis, presence of calcium pyrophosphate dihydrate crystal in synovial fluid, cartilage and periarticular soft tissue and by × rays calcium deposition in articular cartilage. A family originating from Alsace, with an autosomal dominant transmission has been studied. As in English and Argentinean families, a linkage to the short arm

* Travail de l'UMR 7561 CNRS — UHP « Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires » — Faculté de Médecine — BP 184 — 54505 Vandœuvre-les-Nancy cedex.

** Service de Rhumatologie du CHU de Nancy-Brabois.

*** Groupe de Rhumatologues de Colmar (Bernard Anheim, René Cromer, Patrick Kremer, Marc Prudat, Catherine Roussel, Jean-Louis Willem).

Tirés-à-part : Professeur Patrick Netter, à l'adresse ci-dessus.

Article reçu le 29 février 2000, accepté le 3 mai 2000.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 417-426, séance du 27 février 2001

of chromosome 5p has been found. These results suggest that a defective gene at this location may be related to the chondrocalcinosis in these families.

KEY-WORDS (Index Medicus) : CHONDROCALCINOSIS, genetics. CARTILAGE, ARTICULAR.

INTRODUCTION

La chondrocalcinose articulaire (CCA) est une maladie fréquente, qui se caractérise cliniquement par des accès articulaires aigus épisodiques et, plus tardivement, par des arthropathies dégénératives. Elle se définit radiologiquement par une incrustation calcique des cartilages hyalins et des fibrocartilages de l'organisme.

C'est en 1957, lors du 9e Congrès International des Maladies Rhumatismales, que la CCA est définie par Sitaj et Zitnan en insistant sur le caractère familial de cette maladie [1].

En 1961, Mac Carty et coll. [2, 3] identifient dans le liquide synovial de 6 patients atteints d'arthrite aiguë pseudo-goutteuse du genou, des cristaux morphologiquement différents de ceux d'urate monosodique monohydraté, qu'ils caractérisent comme étant des microcristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté (PPCD).

Les circonstances étiologiques de la CCA sont très variées, laissant supposer qu'elle peut répondre à plusieurs mécanismes physiopathologiques.

On distingue :

— des formes sporadiques, parmi lesquelles se trouvent les CCA observées au cours de la sénescence articulaire. Ce sont les formes les plus nombreuses avec une fréquence radiologique qui augmente avec l'âge pour dépasser 30 % au-delà de 80 ans ;

— des formes associées à une maladie métabolique : hyperparathyroïdie primitive, hypophosphatasie, hypercalcémie familiale hypocalciurique, hypothyroïdie, hémochromatose, amylose...

— des formes familiales parfois accompagnées d'une chondrodysplasie. Les CCA familiales isolées sont les formes les plus pures et les plus complètes dans leur expression clinique, biologique et radiologique.

Une trentaine de familles [4] atteintes de CCA sont actuellement décrites dans plusieurs pays : Chili (Iles Chiloé), Canada, Espagne, États-Unis (famille mexico-américaine), France, Hollande, Suède, Tchécoslovaquie, Angleterre, Argentine, Italie, Israël, Suisse, Allemagne, Japon, Tunisie... Parmi ces familles, une des plus étendues est la famille alsacienne. En partant des premiers malades recensés en 1963 par Louyot, Gaucher et Peterschmitt [5], nous avons pu identifier, une dizaine d'années plus tard, 5 familles regroupant 34 cas de CCA. En 1977, ces familles ont pu être rattachées à un ancêtre commun vivant au XVIIIe siècle [6, 7]. Un travail récent, réalisé dans le cadre du Programme Hospitalier de Recherche Clinique et

avec l'aide des rhumatologues de Colmar, a permis de compléter cette étude en examinant 48 membres de la famille répartis sur 3 générations, dont 26 sont porteurs de cette affection.

Aspects cliniques

Dans cette famille, le début de la maladie est précoce (avant 35 ans), et la symptomatologie clinique la plus évocatrice est l'arthrite aiguë pseudogoutteuse souvent déclenchée par un exercice inhabituel, un traumatisme ou une intervention chirurgicale. L'arthrite aiguë évolue spontanément vers la guérison en une ou deux semaines et se répète plusieurs fois par an. Les accès pseudogoutteux sont le plus souvent monoarticulaires. Ils sont localisés essentiellement au genou (68 %), à l'épaule (55 %), au poignet (55 %), et plus rarement à la hanche et à la cheville ; on note également des accès rachidiens (48 %) entraînant des épisodes de lumbago et de cervicalgie aiguë (41 %). Au fil des années, les accès se répètent et l'atteinte devient polyarticulaire. Des manifestations articulaires chroniques apparaissent, avec des déformations et des ankyloses plus ou moins importantes chez certains patients. Les épisodes inflammatoires peuvent affecter plusieurs articulations et évoluer de façon subaiguë, simulant un rhumatisme inflammatoire chronique.

La forme précoce est la plus fréquente ; on l'observe également dans les familles canadiennes, hollandaises, mexico-américaines, suédoises et argentines. Une forme invalidante a été décrite dans les familles tchèques, chiliennes, argentines et espagnoles. Enfin, une forme tardive avec atteinte oligo-articulaire a été rapportée en Espagne.

Aspects radiologiques

La CCA se traduit radiologiquement par une opacification granuleuse ou stratifiée, de tonalité calcique, des cartilages de revêtement épiphysaire, des fibrocartilages, des disques intervertébraux et de certains ligaments, tendons, aponévroses et synoviales [8]. Les calcifications sont généralement symétriques, touchant de nombreuses articulations rarement atteintes dans les formes sporadiques (tibio-astragalienne, acromio-claviculaire, sacro-iliaque). Un examen radiographique standard, comprenant une radiographie de bassin de face, des radiographies de genoux de face et de profil et des radiographies de poignets de face, permet le plus souvent de confirmer le diagnostic. Les localisations les plus fréquentes sont, par ordre décroissant : les genoux (55 %), les hanches (41 %), les épaules (31 %), les poignets (21 %), le rachis (15 %), mais toutes les articulations peuvent être touchées. On soulignera certains aspects très caractéristiques : bande verticale opaque dans la symphyse pubienne, calcification du ligament triangulaire du carpe, images en coin données par l'incrustation des ménisques du genou, opacification des bourrelets glénoïdiens et du bourrelet cotyloïdien, calcifications allongées du tendon d'Achille et de l'aponévrose plantaire. Tous ces signes radiologiques forment un ensemble plus ou moins complet, mais très évocateur.

Aspects biologiques

Le diagnostic formel de CCA est porté sur la présence de microcristaux de PPCD dans le liquide synovial. Ceux-ci sont décelés par l'observation microscopique en lumière polarisée. Les cristaux se présentent sous la forme de baguettes, le plus souvent rhomboïdes, avec une longueur de 3 à 15 microns. Ils ne sont pas détruits par l'uricase et leur biréfringence est faiblement positive. Ils sont parfois extracellulaires, plus souvent intracellulaires. Ces cristaux ont été observés dans les liquides articulaires de plusieurs malades de la famille et ont pu être identifiés de façon formelle, grâce à des techniques de microscopie à balayage couplée à une diffraction aux rayons X. Il a été ainsi possible de démontrer que ces cristaux sont constitués uniquement de PPCD dans sa forme triclinique [9]. En pratique médicale quotidienne, si la clinique et la radiologie sont caractéristiques, il n'est pas indispensable d'entreprendre la recherche de microcristaux pour porter le diagnostic. Si tel n'est pas le cas, la ponction articulaire s'impose avec la recherche de cristaux et une analyse bactériologique pour ne pas méconnaître une arthrite septique.

Mode de transmission

Comme dans la plupart des familles rapportées, une transmission autosomique dominante a été démontrée : les hommes sont atteints aussi bien que les femmes ; il existe des transmissions de père à fils et aucune génération n'est épargnée. Environ la moitié des membres de chaque génération est atteinte, ce qui caractérise bien une hérédité autosomique dominante avec un fort degré de pénétrance. Aucune relation avec l'haplotype HLA n'a été observée [7, 10], à la différence des formes tchèques et tunisiennes.

Aspects physiopathologiques et génétiques

Les CCA familiales représentent un modèle particulièrement intéressant pour comprendre la genèse de cette maladie, ce qui explique les nombreux travaux de physiopathologie et de génétique qui sont actuellement entrepris.

La CCA est due aux dépôts de cristaux de PPCD dans les cartilages hyalins et les fibrocartilages. Les mécanismes de formation des cristaux de PPCD sont complexes et dépendent de la régulation des taux de pyrophosphate inorganique (PPi) et de calcium, ainsi que de facteurs tissulaires [11]. Lust et coll. [12, 13] ont trouvé dans les fibroblastes et les lymphoblastes en culture, provenant de patients de la famille alsacienne, un doublement de la concentration intracellulaire de PPi par rapport aux membres sains de cette famille et à des sujets témoins. Ils en concluent que, chez ces malades, il existe une anomalie métabolique généralisée dont l'expression phénotypique est seulement chondrocytaire. Les PPi ne peuvent pas traverser passivement les membranes mais certaines enzymes chondrocytaires, comme les nucléosides triphosphates pyrophosphohydrolases (NTPPPH) [14], et des protéines

membranaires récemment identifiées, comme la protéine ANK [15], régulent leurs échanges transmembranaires. Celles-ci assurent donc un équilibre entre PPi intracellulaires et extracellulaires et leur dysfonctionnement semble jouer un rôle important dans la formation des cristaux.

Un travail de génétique moléculaire a été entrepris récemment dans la famille alsacienne et une famille argentine originaire d'Italie du nord [16]. Ces deux familles ont de nombreuses similitudes cliniques et radiologiques. Elles représentent des formes pures de CCA familiales. Cette étude a mis en évidence une liaison avec le bras court du chromosome 5p. Les études de recombinants, réalisées dans ces familles, ont permis de définir et de préciser une région de moins d'1cM entre les marqueurs D5 S 416 et D5 S2114 [17]. Ces résultats confirment les travaux, effectués dans une famille britannique porteuse d'une forme familiale de CCA débutant entre 30 et 40 ans et associée à une épilepsie infantile [18]. Ces formes, liées au bras court du chromosome 5, ne sont pas associées à une atteinte dégénérative précoce et ont été identifiées par le symbole $CCAL_2$ par le Comité de Nomenclature. Elles se différencient des formes associées à une arthrose sévère précoce ($CCAL_1$), qui sont liées au bras long du chromosome 8 (8q) et dont le mécanisme physiopathologique paraît différent [19]. En particulier, dans les formes liées à 8q, il n'est pas démontré si c'est le dépôt de cristaux calciques dans les tissus articulaires, secondaire à une anomalie génétique, qui entraîne une atteinte dégénérative ou si c'est l'atteinte dégénérative du cartilage pouvant résulter de la mutation d'un gène de l'arthrose qui favorise les dépôts de cristaux calciques. Ces formes familiales pures sont également très différentes des familles chiliennes de CCA. Les membres de cette famille, caractérisée par son isolement dans les Iles Chiloe et sa consanguinité, sont atteints d'une arthrose précoce et sévère, d'une dysplasie spondylo-épiphysaire et d'une chondrocalcinose diffuse. Williams et Reginato ont identifié, dans cette famille, une mutation hétérozygote du gène du procollagène de type II (COL2A1) qui n'a pas été retrouvée dans les formes liées à 5p ou 8q [20, 21].

Des modifications de la matrice extracellulaire dans certaines zones de la couche moyenne du cartilage ont été mises en évidence par Bjelle [22], ce qui explique que des gènes codant pour des protéines matricielles du cartilage ont été envisagés comme gènes candidats. De plus, le rôle de la protéine des couches intermédiaires du cartilage (CILP), qui présente de grandes similarités avec la NTPPPH et dont l'expression est augmentée dans les étapes précoces de l'arthrose, a été évoqué. Cependant, le gène codant pour cette protéine est situé sur le chromosome 15q21 [23].

Des résultats expérimentaux récents permettent de compléter ces données, en associant les connaissances physiopathologiques et génétiques. Ho et coll. [15] ont caractérisé un gène dont la mutation induit une ankylose avec destruction articulaire et dépôts d'hydroxyapatite chez la souris. Ce gène code pour la protéine membranaire ANK, exprimée dans les tissus articulaires et qui assurerait le transport membranaire des PPi par un mécanisme sensible au probénécide. Chez les souris $ank^{-/-}$, on observe une augmentation des taux intracellulaires de PPi dans des fibro-

blastes cutanés, similaire à celle observée chez les patients de la famille alsacienne. De plus l'homologue humain du gène *ank* est situé sur le chromosome 5p dans une région proche de D5 S1954. Toutes ces données permettent d'envisager un rôle important du gène *ank* dans les formes familiales de CCA.

Aspects pharmacologiques et thérapeutiques

On connaît mal la physiopathologie des maladies dégénératives du cartilage et plus particulièrement les anomalies enzymatiques qui concourent aux arthropathies microcristallines, sources de destructions articulaires. En l'état actuel de nos connaissances physiopathologiques et étiopathogéniques, il est difficile de proposer un traitement curatif ou préventif des CCA, mais les recherches génétiques sur les formes familiales devraient faciliter l'identification du ou des gènes responsables et la caractérisation des anomalies enzymatiques associées. L'identification de cibles pharmacologiques ou moléculaires devrait permettre, à terme, le développement de thérapeutiques spécifiques pour la CCA, comme il en existe pour la maladie goutteuse. Ces recherches pourraient également contribuer plus largement à développer des thérapeutiques nouvelles pour les atteintes dégénératives du cartilage articulaire. A ce jour, le traitement reste symptomatique : colchicine et anti-inflammatoires non stéroïdiens au cours des épisodes inflammatoires aigus ou pseudo-aigus, infiltration intra-articulaire de dérivés cortisonés, mesures orthopédiques, physiothérapiques et kinésithérapiques pour les arthropathies chroniques.

REMERCIEMENTS

Travail réalisé dans le cadre du PHRC 1997 « Étude physiopathologique et génétique des chondrocalcinoses articulaires ».

BIBLIOGRAPHIE

[1] Sitaj S., Zitnan D. — Calcification multiple du cartilage articulaire (étude clinique et radiologique). *In* : Ninth International Congress on Rheumatic Diseases, 1957, Toronto.

[2] Mc Carty D.J., Kohn N.N., Faires J.S. — The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients : the « pseudogout syndrom ». I Clinical aspects. *Ann Intern Med,* 1962, *56*, 711-733.

[3] Kohn N.N., Hughes R.E., Mc Carty D.J., Faires J.S. — The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients : the « pseudogout syndrom ». II identification of cristals. *Ann Intern Med*, 1962, *56*, 738-745.

[4] Reginato A.J., Reginato A.M., Fernandez-Dapica M.P., Ramachandrula A. — Les formes familiales de chondrocalcinose (maladie des dépôts de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté ou goutte à pyrophosphate de calcium). Revue générale. *Rev Rhum (Ed Fr,)* 1995, *62*, 397-412.

[5] Louyot P., Barthelme P., Peterschmitt J., Gaucher A. — La chondrocalcinose articulaire diffuse à caractère familial. *J Radiol Electrol*, 1965, *46*, 64-68.

[6] Gaucher A., Pourel J., Faure G., Netter P., Peterschmitt J., Cromer R. — Les chondrocalcinoses articulaires diffuses héréditaires. *Rev Rhum (Ed Fr,)* 1977, *44*, 589-597.

[7] Gaucher A., Faure G., Netter P., Pourel J., Raffoux C., Streiff F. et *al.* — Hereditary diffuse articular chondrocalcinosis. Dominant manifestation without close linkage with the HLA system in a large pedigree. *Scand J Rheumatol*, 1977, *16*, 217-221.

[8] Gaucher A., Faure G., Netter P., Pourel J. — Les chondrocalcinoses articulaires familiales. *Presse Médicale*, 1986, *15*, 250-254.

[9] Faure G., Netter P., Malaman B., Steinmetz J., Gaucher A. — Hereditary pyrophosphate arthropathy. *Scand J Rheumatol*, 1981, *10*, 159-160.

[10] Netter P., Faure G., Pourel J., Raffoux C., Janot J., Schooneman F. — Chondrocalcinose articulaire diffuse à caractère familial. *Presse Médicale*, 1975, *39*, 2814.

[11] Wright G.D., Doherty M. — Calcium pyrophosphate crystal deposition is not always « wear and tear » or aging. *Ann Rheum Dis*, 1997, *56*, 586-588.

[12] Lust G., Faure G., Netter P., Gaucher A., Seegmiller J.E. — Evidence of a generalized metabolic defect in patients with hereditary chondrocalcinosis : Increased inorganic phosphate in cultured fibroblaste and lymphoblase. *Arthritis Rheum*, 1981, *24*, 1517-1522.

[13] Lust G., Faure G., Netter P., Seegmiller J.E. — Increased pyrophosphate in fibroblasts and lymphoblasts from patients with hereditary diffuse articular chondrocalcinosis. *Science*, 1981, *214,* 809-810.

[14] Ryan L.M., Wortmann R.L., Karas B., Mc Carty D.J. — Cartilage nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase. 1. Identification as an ectoenzyme. *Arthritis Rheum*, 1984, *77*, 1689-1696

[15] Ho A.M., Johnson M.D., Kingsley D.M. — Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science*, 2000, *289*, 265-270.

[16] Andrew L.J., Brancolini V., Serrano de la Pena L., Devoto M., Caeiro F., Marchegiani R., Reginato A., Gaucher A., Netter P., Gillet P., Loeuille D., Prockop D.J., Carr A., Wordsworth B.F., Lathrop M., Butcher S., Condisine E., Everts K., Nicod A., Walsh S., Williams C.J. — Refinement of the chromosome 5p locus for familial calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease. *Am J Hum Genet*, 1999, *64*, 136-145.

[17] Rojas K., Serrano de la Pena L., Gallardo T., Simmons A., Nyce K., Mc Grath R., Considine E., Vasko A.J., Peterson E., Grady D., Cox R., Andrew L.J., Lovette M., Overhauser J., Williams C.J. — Physical map and characterization of transcipts in the candidate interval for familial chondrocalcinosis at chromosome 5p15.1. *Genomics*, 1999, *62*, 177-183.

[18] Hughes A.E., McGibbon D., Woodward E., Dixey J., Doherty M. — Localisation of a gene for chondrocalcinosis to chromosome 5p. *Hum Mol Genet*, 1995, *4*, 1225-1228.

[19] Baldwin C.T., Farrer L., Adair R., Dharmavaram R., Jimenez S.A., Anderson L. — Linkage of early onset osteoarthritis and chondrocalcinosis to human chromosome 8q. *Am J Hum Genet*, 1995, *56*, 692-697.

[20] Williams C.J., Considine E.L., Knowlton R.G., Reginato A., Neumann G., Harrison D. et *al.* — Spondyloepiphyseal dysplasia and precocious osteoarthritis in a family with an Arg75′Cys mutation in the procollagen type II gene (COL2A1). *Hum Genet*, 1993, *92*, 499-505.

[21] Reginato A.J., Passano G.M., Neumann G., Falasca G.F., Diaz-Valdez M., Jimenez S.A. et *al.* — Familial spondyloepiphyseal dysplasia tarda, brachydactyly and precocious osteoarthritis associated with an Arginine 75′Cysteine mutation in the procollagen type II gene in a kindred of Chiloe Islanders. 1. Clinical, Radiography, and Pathologie findings. *Arthritis Rheum*, 1994, *37*, 1078-1086.

[22] Bjelle A. — Familial pyrophosphate arthropathy. Occurrence and crystal identification. *Scand J Rheumatol*, 1981, *10*, 209-214.

[23] Marinescu R.C., Nyce K., de la Pena L.S., Overhauser J., Wiliams J.C. — Exclusion of the gene for human cartilage intermediate layer protein in currently mapped calcium pyrophosphate dihydrate deposition syndromes. *Arthritis Rheum*, 1999, *42*, 2139-2144.

DISCUSSION

M. Michel BOUREL

Comment est le ligament triangulaire du carpe dans cette fratrie ? Les lésions arthrosiques sont-elles secondaires ou parfois contemporaines de la chondrocalcinose ? Avez-vous constaté une association avec la mutation C 282 Y (du gène de l'hémochromatose) ?

L'incrustation calcique du ligament triangulaire du carpe est habituelle chez les patients atteints de cette fratrie et s'observe radiologiquement dans près de 55 % des cas. Les lésions arthrosiques ne sont ni plus précoces ni plus fréquentes chez les patients atteints de la famille. Nous n'avons pas recherché d'éventuelles associations avec la mutation C 282 Y.

M. Pierre GODEAU

J'ai eu l'occasion d'observer une chondrocalcinose familiale avec 3 cas dans une fratrie de 5 dans une famille marocaine qui peut être accessible à une enquête réalisée sur place mais qu'il est difficile de faire venir en France en l'absence de sanction thérapeutique. Pouvez-vous me faire parvenir un protocole précis d'exploitation ?

La forme familiale alsacienne de chondrocalcinose articulaire (comme les formes anglaise et argentine) est liée au bras court du chromosome 5. Il serait intéressant de rechercher la même localisation dans la famille marocaine. Nous restons à votre disposition pour vous préciser les différentes étapes nécessaires à cette identification.

M. Alain LARCAN

Peut-on considérer les chondrocalcinoses comme un cadre hétérogène ou, au contraire, est-il possible de trouver un mécanisme physiopathologique commun aux chondrocalcinoses familiales, métaboliques, post-traumatiques liées à l'âge, etc, sans oublier l'hypophosphatasie, l'hypomagnésémie ? Existe-t-il un marqueur non chondrocytaire comme par exemple la plaquette, mais je crois que les recherches de Ryan ont été sur ce point négatives. La perturbation est-elle uniquement juxtachondrocytaire et liée à une anomalie d'une ectoenzyme (NTP) ou peut-on invoquer une perturbation métabolique générale ou encore un trouble des protéoglycanes, toute calcification nécessitant une modification de la trame protéique calcaffine ?

Nous pensons que les chondrocalcinoses articulaires peuvent répondre à plusieurs mécanismes physiopathologiques étant donné les circonstances étiologiques dans les-

quelles elles se manifestent. Les chondrocalcinoses familiales représentent un cadre homogène et peuvent être considérées comme des affections métaboliques généralisées, dont l'expression phénotypique est seulement chondrocytaire. Il faudra maintenant rechercher si, dans les formes secondaires de chondrocalcinoses articulaires (hypophosphatasie, hémochromatose...) il existe une éventuelle interaction avec la perturbation métabolique décrite dans la famille alsacienne.

M^me^ Marie-Odile RETHORÉ

Avez-vous eu l'occasion d'examiner des sujets trisomiques 8 car ils naissent avec des articulations normales et, à la fin de l'enfance, leurs articulations se bloquent, d'abord celles des doigts puis, progressivement, les autres ?

Votre question est intéressante car il existe des formes de chondrocalcinoses familiales liées à 8q décrites par Baldwin. Ces éléments soulignent l'intérêt d'une éventuelle étude clinique et radiologique chez ces enfants avant d'entreprendre une étude génétique.

M. Maurice GOULON

Chez deux malades atteints de chondrocalcinose que nous avons publiés en 1980 dans La Presse Médicale*, Il existait un syndrome de Bartter avec hypokaliémie et hypomagnésémie. La symptomatologie était faite d'excès de pseudo-goutte atteignant genoux et poignets et de crises de tétanie que nous avons rapportées à l'hypomagnésémie. Le traitement par indométacine et magnésium a eu des effets favorables sur une longue durée d'évolution. Avez-vous constaté des faits analogues dans votre famille ?*

Dans la famille alsacienne, nous n'avons pas observé d'hypokaliémie ni d'hypomagnésémie. C'est pourquoi nous n'avons pas conseillé la prise de magnésium.

M. Jean-Baptiste PAOLAGGI

La forme dont est responsable la mutation portée sur le chromosome 8 est-elle secondaire à une arthrose précoce — comme vous semblez le suggérer — ou s'agit-il d'une variété de chondrocalcinose ? Avez-vous observé ce qu'il est commun d'appeler « odontoïde couronnée » dans vos formes familiales ?

Les formes associées à une arthrose sévère précoce liées au bras long du chromosome 8 (8q) semblent répondre à un mécanisme physiopathologique différent. Il n'est pas démontré quel est l'élément initial : dépôts de cristaux calciques ou atteinte dégénérative articulaire. Nous n'avons pas observé, sur les radiographies du rachis cervical que nous avons réalisées, d'images « d'odontoïde couronnée » sur les 26 membres porteurs de chondrocalcinose articulaire que nous avons examinés.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 417-426, séance du 27 février 2001

M. Paul DOURY

Dans les chondrocalcinoses familiales de la littérature mondiale, avez-vous la notion de l'existence éventuelle d'une association chondrocalcinose familiale et hyperparathyroïdie ?

L'hyperparathyroïdie est une étiologie classique de chondrocalcinose articulaire secondaire et doit être recherchée systématiquement chez tout patient de moins de 50 ans présentant une chondrocalcinose articulaire. Il n'y a pas, à notre connaissance, d'association de chondrocalcinose articulaire familiale et d'hyperparathyroïdie.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 427-431, séance du 20 février 2001

COMMUNIQUÉ

au nom de la Commission II (Thérapeutique — Pharmacologie — Toxicologie)

Internet et information du public sur le médicament

Paul LECHAT

Exposé introductif

Sur l'initiative de l'un de ses membres, le professeur Jean-Louis Imbs, correspondant national, la Commission II s'est penchée sur l'information relative aux médicaments diffusée sur le réseau internet.

Ce rapport résume les débats qui ont eu lieu au cours de quatre réunions.

L'une des recommandations émises par l'Académie au terme de la réunion « Médecine et société » en novembre 1999 [1] fut de « *renforcer l'information du public, facteur essentiel du succès de certaines politiques de prévention* ». A l'évidence, Internet ouvre des possibilités jusqu'à présent inconnues à la diffusion des informations. Certains y voient la promesse d'une « *civilisation du savoir* ». Quel savoir ?

Dès à présent, le réseau Internet modifie profondément l'accès du public à l'information médicale, notamment aux données concernant le maniement des médicaments.

- Dans le journal *Le Monde* du 8 avril 2000 [2], le président d'un très grand groupe pharmaceutique déclarait :

  « Internet est à la fois une chance pour l'industrie pharmaceutique et pour les patients du monde entier. En tant que fabricants de médicaments, nous n'avions que la publicité, une communication unidirectionnelle et courte dans le temps pour établir une sorte de contact avec le patient. Nous ne nous connaissions qu'un seul type de clients : les prescripteurs de nos produits.... Internet donne de nouvelles opportunités dans la relation patient-médecin-fabricant de médicaments. Pour nous, il s'agit de l'intégration du patient dans le système de délivrance des soins ».

- De leur côté, des médecins de l'Institut Mario Negri, à Milan, ont établi une grille pour juger la qualité des conseils de santé diffusés sur le réseau Internet à l'intention des parents, pour la prise en charge par la famille d'une fièvre ou d'une toux chez un enfant [3, 4]. Leur conclusion est claire : « actuellement, les informations les plus fiables à destination des patients sont celles qui sont

délivrées par les médecins et par les documents dont les médecins contrôlent le contenu ».

Le nombre croissant de « sites médicaux » et d'informations sur le médicament a conduit la commission II de l'Académie à consulter plusieurs experts sur la façon de mettre à profit, dans l'intérêt des malades, les nouvelles possibilités qu'offre Internet.

— M. Yves Juillet, médecin, directeur des Affaires publiques des laboratoires Aventis Pharma S.A. ;
— M. Bernard Winicki, pharmacien, ancien président de Hoechst — France ;
— M^{me} Pascale Jolliet, médecin, présidente de la Commission de publicité à l'AFSSAPS ;
— M. François Lhoste, médecin, conseiller à la Direction générale de l'Industrie, technologie, information et des Postes.

Leurs exposés et les échanges qui les ont suivis ont précisé les points suivants :

— Il existe, tant au niveau national qu'européen, une réglementation adaptée, *a priori,* à l'utilisation d'Internet mais difficile à faire respecter. Une excellente revue parue dans le *Bulletin de l'Ordre des pharmaciens* en fait l'analyse [5].

— Divers organismes ont fait paraître des textes ou des chartes en vue d'un bon usage d'Internet pour l'information sur le médicament :

  – l'OMS a publié en 1999 une résolution [6] recommandant :
    • l'accès rapide à l'information de santé par Internet ;
    • de ne pas remplacer la consultation d'un médecin par cette information ;
    • la possibilité de vérifier ces informations ;
    • la prudence devant l'achat de médicaments sur Internet ;
    • la consultation d'un professionnel de santé avant de se traiter soi-même.

  – L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) et sa commission de publicité, ainsi que la Direction des Etudes Médico-Economiques et de l'Information Scientifique (DEMEIS) ont élaboré des recommandations à l'Industrie pharmaceutique : identification de l'entreprise, information actualisée distinguant clairement les textes promotionnels des informations et services, mise en place de réelles restrictions d'accès pour les publicités réservées aux professionnels de santé, garantie d'objectivité des données bibliographiques transmises, dépôt à l'Agence du support de publicité et, éventuellement, demande de « visa » GP (grand public).

- Le Syndicat National de l'Industrie Pharmaceutique (SNIP) diffuse depuis quelques semaines une plaquette soulignant les *« précautions d'utilisation d'Internet dans le domaine de la santé »* destinée à l'information du public. Elle souligne la nécessité d'une lecture critique en donnant des points de repère simples : se méfier des sites anonymes, chercher une information sur la qualité de l'éditeur, vérifier l'actualité de l'information et consulter le site du Ministère de la santé « *Ne pas croire tout ce que l'on trouve sur Internet* » [7].
- Enfin, en juin 2000, le Conseil national de l'Ordre des médecins a adopté deux rapports attirant l'attention sur les dangers du commerce électronique des médicaments [8, 9].

— La transmission raisonnée de l'information médicale aux patients, à leur famille, et de façon générale au public est susceptible d'apporter une amélioration de l'observance des traitements et des précautions hygiénodiététiques utiles à la prévention d'affections chroniques. Les patients deviendraient des partenaires éclairés et motivés pour gérer la maladie avec leur médecin et leur pharmacien. Des expériences pilotes devraient prendre place dans une nouvelle politique d'éducation thérapeutique (citons par exemple l'initiative du Conseil général de l'Orne).

— Le monopole que le développement de certains sites d'information médicale pourrait assurer à des intérêts économiques étrangers doit inquiéter. Il est banal de dire qu'Internet ne connaît pas de frontières, mais une mondialisation de l'information sur le médicament pourrait être préjudiciable au maintien de la liberté de jugement et de décision en matière de choix thérapeutiques.

COMMUNIQUÉ

L'Académie nationale de médecine constate que la communication par Internet offre une possibilité d'échange d'informations dans le domaine de la santé sans doute inégalée jusqu'à présent, susceptible de s'adresser aux malades, au public et aux professionnels de santé. Cependant, les progrès qui peuvent en résulter pour les malades font courir des risques :

— le démarchage illégal sur Internet de personnes mal informées peut les conduire à se procurer par vente électronique des substances inactives ou dangereuses, présentées frauduleusement comme des médicaments ; il paraît essentiel de prendre les mesures d'application des lois existantes dans notre pays et dans l'Union européenne pour éviter ces escroqueries ;

— la diffusion d'informations biaisées sur les médicaments car orientées vers la promotion d'un intérêt commercial.

Pour ces motifs, l'Académie nationale de médecine, considérant les avantages et les risques potentiels de l'information diffusée au public par le réseau Internet :

— estime que la diffusion, par Internet, d'informations relatives à la santé n'est admissible qu'à la condition que soient vérifiées et assurées la véracité, l'objectivité et la qualité de ces informations ;

— réaffirme les risques d'une prescription thérapeutique sans examen clinique du malade par un médecin, ainsi que ceux d'une dispensation du médicament sans l'intervention personnelle du pharmacien ; la relation médecin-malade risque d'être désorganisée au point, par exemple, de ne plus permettre d'évaluation par la pharmacovigilance de la sécurité d'emploi des médicaments après leur mise sur le marché ;

— estime indispensable, pour la Santé publique, un contrôle permanent des informations médico-pharmaceutiques publiées sur Internet afin d'éviter tout monopole de fait dans ce domaine.

*
* *

L'Académie, saisie dans sa séance du mardi 20 février 2001, a approuvé ce communiqué à l'unanimité.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Actes du Colloque International Francophone « Médecine et Société », publiés par l'Académie nationale de médecine et la Conférence internationale des doyens de facultés de médecine d'expression française. — Paris, novembre 1999, 1 volume, p. 139.

[2] Internet et le décryptage de l'ADN humain bouleversent l'industrie pharmaceutique. *Le Monde*, page 18, samedi 8 avril 2000.

[3] Impicciatore P., Pandolfini C., Casella N., Bonati M. — Reliability of health information for the public on the World Wide Web : systematic survey of advice on managing fever in children at home. *Br. Med. J.*, 1997, *314*, 1875.

[4] Pandolfini C., Impicciatore P., Bonati M. — Parents on the web : risks for quality management of cough in children. *Pediatrics*, 2000, *1*, 150.

[5] Furet MD., Vion D., Campion M.D. — Médicaments et Internet. *Bulletin de l'Ordre des Pharmaciens*, Octobre 2000, *368*, 419-426.

[6] OMS (WHO/EDM/QSM/99.4) Medical products and the Internet. A guide to finding reliable information. Genève, 1999.

[7] http ://www.sante.gouv.fr/htm/pointsur/qualite/pascroire/htm

[8] DUSSERRE L. — La commercialisation des informations médicales est-elle « déontologiquement correcte » ? Conseil national de l'Ordre des médecins, rapport adopté lors de la session des 29 et 30 juin 2000.

[9] GRUNWALD D., MERCAT F.X. — Médicaments et pratiques médicales. Problèmes actuels. Conseil national de l'Ordre des médecins, rapport adopté lors de la session de juin 2000.

MOTS-CLÉS : INTERNET. UTILISATION MÉDICAMENT.

KEY-WORDS (Index Medicus) : INTERNET. DRUG UTILIZATION.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, n° 2, 433-444, séance du 6 février 2001

INFORMATION *

Réflexions éthiques autour de la réanimation néonatale

Denys PELLERIN

Ce rapport rendu public le 14 septembre 2000, vient d'été publié dans le n° 26 de janvier 2001 des *Cahiers du CCNE*. Il précise l'avis du comité sur les « arrêts de vie » du nouveau-né déjà évoqué dans le rapport n° 63 que j'avais eu l'honneur de vous rapporter ici-même. Je vous l'avais signalé au passage, lorsque j'avais abordé, pour le condamner, l'acharnement thérapeutique dans l'évocation des cas extrêmes pour lesquels on ne pouvait éviter que soit posée la question de l'euthanasie.

Ce document répond à la saisine du CCNE par un groupe de pédiatres néonatologistes en décembre 1997. Ils sollicitaient l'avis du CCNE sur l'arrêt de vie d'un enfant né très prématurément, nécessitant une réanimation néonatale pour détresse vitale par insuffisance respiratoire et survivant avec un handicap neurologique sévère. Il fallut attendre qu'ait été achevée la réflexion qui aboutit au rapport n° 63 pour que puisse enfin être élaborée une réponse.

Se refusant à faire de sa réponse un avis le CCNE a choisi d'en faire l'expression de « réflexions » élargies à l'ensemble des questions éthiques soulevées par les conditions actuelles de la réanimation des nouveau-nés.

Il est heureux que ce document ait été achevé et rendu public quelques semaines seulement avant l'arrêt du 17 novembre 2000 de la Cour de cassation. Les réflexions du Comité ont pu être exprimées dans la sérénité qui convient et hors des réactions émotionnelles que suscite l'arrêt de la haute juridiction.

Données médicales et épidémiologiques

Je ne m'attarderai pas sur la première partie du document. On y trouve rapportées avec précision les données médicales et épidémiologiques qui soulignent l'importance du sujet, son actualité et la gravité du problème posé.

* Sur le rapport n° 65 du Comité Consultatif National d'Éthique. *Les cahiers du CCNE*, 2001, *26*, 3-18. (http : //www.comite-ethique.fr)

Elles vous ont été, pour l'essentiel, présentées dans la communication faite à cette Tribune le 9 janvier dernier par Geneviève Barrier sous le titre *La médecine périnatale en l' an 2000 vue par un anesthésiste réanimateur* [1]. Bien qu'elle n'ait pas même évoqué le rapport du CCNE à la rédaction duquel elle a effectivement activement contribué, elle a su vous convaincre par la brutalité des chiffres de l'évidence des faits. En dépit de l'amélioration des soins apportés, notamment aux prématurés, le nombre d'enfants handicapés par une infirmité motrice d'origine cérébrale n'a pas diminué alors que le nombre d'enfants survivants a beaucoup augmenté. La communication de Geneviève Barrier me dispense également d'insister sur les principaux facteurs de risques, maternités tardives, usage mal contrôlé des inducteurs de l'ovulation, fécondation *in vitro* qui selon l'enquête FIVNAT de 1988 comportent encore 26 % de grossesses gémellaires. Mais nous ne saurions non plus occulter le fait que lors de l'accouchement d'enfants à terme peuvent survenir de multiples problèmes que rien ne laissait prévoir, à commencer par une anoxie néonatale prolongée qui sera à l'origine de séquelles neurologiques, notamment une infirmité motrice cérébrale. Tous ces faits, ainsi que les mesures de prévention qu'ils imposent, sont amplement développés dans le rapport. Chacun pourra s'y rapporter.

Pratiques médicales, les opinions des soignants : données européennes

Longtemps toute maladie grave chez un nouveau-né conduisait inéluctablement à son décès et, faute de pouvoir modifier la situation, les médecins se résignaient devant l'inévitable. Mais aujourd'hui, on dispose d'un ensemble de moyens permettant de surmonter la détresse vitale initiale du nouveau-né. Cela conduit les équipes médicales et les parents à s'interroger sur le bien-fondé et les éventuelles limites de ces soins. Certains envisagent de tout tenter pour traiter un nouveau-né en état de détresse, tandis que d'autres craignent d'aller parfois trop loin. Les succès de la réanimation néonatale ont parfois conduit à un excès d'optimisme sur les performances possibles. Plusieurs enquêtes ont révélé qu'en raison de la crainte d'un risque important de séquelles sévères après la mise en œuvre d'une réanimation, plus de 50 % des décès dans les services de soins intensifs pour nouveau-nés suivaient la décision d'interrompre les soins ou d'arrêter la vie.

Face à la diversité des situations de détresse, on constate différentes attitudes parmi les médecins confrontés à des choix d'autant plus difficiles et douloureux qu'ils doivent fréquemment agir dans l'urgence et que leurs choix ne peuvent jamais reposer sur des certitudes. Les difficultés de la décision médicale en matière de réanimation néonatale entraînent des attitudes diverses des équipes soignantes (médecins et infirmières) aussi bien sur le plan national qu'européen. L'enquête d'une action concertée européenne (Euronic) auprès de 122 équipes de services de soins intensifs néonatals dans huit pays

[1] *Bull. Acad. Natle Méd.*, 2001, *185*, nº 1.

européens a été réalisée afin de décrire de la façon la plus exhaustive possible les opinions et les pratiques d'un échantillon représentatif de soignants (médecins et infirmières) travaillant en réanimation néonatale. Un de ses objectifs était de décrire comment se prenaient les décisions de poursuite ou d'arrêt de la réanimation selon ces personnes. Dans tous les pays, la majorité des médecins (deux tiers ou plus) rapporte « qu'au moins une fois dans leur activité professionnelle, seul ou avec d'autres, ils ont décidé de limiter des interventions intensives et de laisser la nature poursuivre son cours, même si l'enfant pouvait en mourir » (cette étude figure en annexe 3 au rapport). Cependant, il existe des différences d'attitudes devant les diverses stratégies de limitation des soins : ne plus entreprendre, arrêter la réanimation mécanique, et surtout administrer des substances médicamenteuses dans le but d'arrêter la vie. Cette étude montre que la décision de ne pas entreprendre des soins intensifs est prise plus fréquemment en Suède, aux Pays-bas, au Royaume Uni et en Espagne qu'en France et en Allemagne. Le tableau présentant les résultats français souligne en revanche que 73 % des médecins et 77 % des infirmières considèrent qu'il est acceptable, dans certaines situations, d'arrêter les soins intensifs et d'administrer des substances médicamenteuses afin de mettre un terme à la vie de l'enfant. Cette démarche est à peine envisagée dans tous les autres pays, à la seule exception des Pays-Bas. Il semble bien s'agir d'une particularité de l'attitude des réanimateurs français dans le contexte européen qui pose question ; ils semblent privilégier l'ouverture large à une réanimation systématique d'attente, en acceptant éventuellement d'arrêter secondairement la vie.

Les données du droit

Les données du droit français sont rappelées. La personnalité juridique s'acquiert à la naissance pour l'enfant vivant et viable et disparaît après la mort. Les enfants mort-nés ne sont pas des personnes au sens juridique du terme. Un enfant né vivant mais non viable est censé n'avoir jamais eu la personnalité juridique. La naissance de tout enfant vivant et viable doit faire l'objet d'une déclaration « dans les trois jours à l'officier d'état-civil du lieu ». La loi 93-22 du 8 janvier 1993 comporte un ajout à l'article 79-1 qui précise la situation de l'enfant décédé avant que sa naissance ait été déclarée et introduit la possibilité pour l'officier d'état civil d'établir un « acte d'enfant sans vie ».

Toute atteinte à l'intégrité physique et psychique de la personne est sanctionnée pénalement et l'arrêt de vie de tout enfant né vivant et viable constitue en droit pénal une infraction, qualifiée de meurtre ou assassinat. L'argument parfois évoqué par le médecin du risque de se voir accuser de non-assistance à personne en danger conduit à faire observer qu'au cours des années passées les plaintes liées à une décision d'arrêt de la réanimation d'un nouveau-né restent exceptionnelles. En revanche, il y a eu plusieurs poursui-

tes, dont certaines ont donné lieu à des condamnations à la suite d'une erreur ou d'une faute de diagnostic ayant entraîné des séquelles irréversibles.

Réflexions éthiques

Les données évoquées ci-dessus soulèvent des questions éthiques évidentes et particulièrement délicates. Elles s'inscrivent de plus, comme l'ont montré de récentes études dans un contexte où les idées sur la famille et l'enfant sont différentes de celles d'hier : la maîtrise de la fécondité et la baisse de la mortalité infantile ont eu pour conséquence une modification de l'investissement des parents, l'enfant est de plus en plus voulu et sa naissance souvent planifiée. De plus, aujourd'hui dans nos sociétés, la mort d'un enfant est ressentie d'autant plus douloureusement que certaines pratiques médicales, notamment l'échographie, lui confèrent une identité bien avant sa naissance et suscitent son intégration précoce dans sa famille. La survenue d'une menace pour la vie du nouveau-né met en relation plusieurs acteurs : l'enfant lui-même, ses parents et l'équipe médicale responsable des traitements et des soins. Le corps social, dont les valeurs, les lois et les institutions sont présentes à l'arrière-plan, est aussi un acteur important.

Aussi une des tâches de la réflexion éthique consiste-t-elle à établir des modes de relations souhaitables entre les personnes et les institutions concernées par l'enfant en détresse en prenant en compte la complexité humaine de dilemmes souvent tragiques.

On insistera ici tout particulièrement sur les questions suivantes :

— faut-il tout mettre en œuvre pour réanimer un nouveau-né, quel que soit son état et les conséquences sur son développement à venir ?
— peut-on arrêter une réanimation, voire arrêter la vie d'un nouveau-né devenu autonome sur le plan respiratoire et porteur de graves lésions cérébrales ?
— qui évalue et décide en la matière ? En fonction de quelle autorité et selon quels critères ? Quelle est la place respective des parents et de l'équipe médicale et soignante ?

La perspective fondamentale à partir de laquelle ces questions récurrentes semblent pouvoir être abordées pourrait être la suivante : faire face au malheur qui survient et s'impose est une attitude à laquelle les morales de toutes les civilisations appellent et qui demande courage, dignité et solidarité. Mais qu'en est-il du malheur que le progrès technique lui-même induit, alors que sa visée objective réside en principe dans l'amélioration de situations menacées ? Et que les praticiens eux-mêmes en sont responsables ? Comment comprendre ici l'exercice de la responsabilité des praticiens ?

Les réflexions du CCNE tentent de clarifier les termes de ces interrogations et leurs enjeux éthiques en proposant des manières de penser les situations et d'agir, sinon au mieux — ce qui est souvent impossible — du moins le plus humainement possible.

La réflexion est centrée sur les implications éthiques d'un double impératif qui prescrit de prévenir autant que possible les détresses vitales à la naissance, et de faire face avec compassion et humanité si elles surviennent malgré tout. Ces réflexions n'ont pas pour objet d'édicter des règles ou recommandations à l'usage des équipes médicales qui ont à affronter ces problèmes, mais de les aider dans la recherche de la solution en éclairant les aspects qu'ils doivent prendre en compte.

Prévenir

Le rapport souligne ici que la mise en place d'une politique de prévention visant à réduire le nombre aujourd'hui considérable de détresses vitales à la naissance est le premier impératif. Je vous renvoie à ce sujet à la communication de Geneviève Barrier.

Faire face

Dans un premier chapitre de « Considérations générales » il est souligné que « l'enfant est bien entendu à considérer comme toute autre personne humaine. Peuvent et doivent s'y appliquer les réflexions de l'éthique de la personne ». Mais aussi le dilemme éthique est ici particulièrement aigu, entre ce que nous considérons comme souhaitable, apporter un effet bénéfique dans le strict respect du droit de la personne et de sa dignité, et le devoir du médecin de la soigner, et ce que nous voulons éviter, l'apparition d'un handicap majeur qui remettrait en cause le principe de bienfaisance.

En outre on trouve ici une difficulté majeure : les handicaps sévères ne sont pas toujours le fruit de ce qu'imposerait la « nature » ou le « destin » mais parfois le revers d'actes délibérés de l'homme, fruits d'une médecine de plus en plus performante.

Le précepte éthique fondamental de « ne pas nuire » doit trouver ici sa première application dans le rejet de toute forme d'acharnement thérapeutique. Le rapport n° 63, qui traitait de « fins de vie », dénonçait clairement cette obstination déraisonnable qui, par un raisonnement buté, refuse de reconnaître qu'un homme, ici un nouveau-né, est voué à la mort et qu'il n'est pas curable. Il soulignait aussi que « le refus de l'acharnement thérapeutique (...) peut aussi traduire le refus de situations inhumaines, par exemple, en cas de disproportion entre l'objectif visé par la thérapeutique et la situation réelle ».

Une difficulté supplémentaire, propre à la réanimation néonatale, est qu'à l'incertitude sur les séquelles neurologiques et cognitives, c'est-à-dire sur les

capacités futures de l'enfant à diriger son existence, s'ajoute la question d'une responsabilité des traitements entrepris devant l'apparition de lésions irréversibles. Par ailleurs, en médecine néonatale, le processus d'appréciation éthique revêt bien des singularités.

Le jugement des parents, protecteurs naturels de leur enfant, est le seul élément qui permette de prendre en compte l'exigence éthique de consentement ; aussi les parents doivent-ils participer aux discussions et décisions même s'ils ne disposent pas de l'initiative de la décision médicale. Ils doivent aussi, toutes les fois que cela est possible, avoir le temps d'un cheminement personnel qui permette la maturation d'une décision toujours à la source d'un déchirement.

La décision de l'équipe médicale concernant le traitement à entreprendre ou à interrompre doit se faire sans tenir les parents à l'écart, mais sans leur faire supporter le poids du remords. Elle ne saurait non plus constituer une décharge d'une responsabilité professionnelle non assumée.

Il faut encore prendre en compte l'urgence et l'incertitude. Telle la nécessité de devoir prendre une décision, éventuellement lourde de conséquences, malgré la difficulté, voire l'impossibilité dans l'immédiat, d'établir un pronostic quant à l'évolution future de l'enfant, ou encore, même si l'on considère les différents scores de gravité disponibles, la difficile appréciation de critères objectifs permettant de conclure que la poursuite d'un traitement est vain ou d'évaluer la gravité des séquelles prévisibles.

Le questionnement moral surgit toujours, quelles que soient les attitudes envisagées. Certains insistent plutôt sur la préservation de la vie de l'enfant, d'autres sur les handicaps engendrés, entravant l'épanouissement autonome de l'enfant et pesant lourdement sur les liens familiaux. La tension éthique entre ces deux perspectives est exacerbée par le fait qu'il s'agit le plus souvent de choisir non pas entre la vie et la mort, mais entre la certitude de la mort et l'incertitude sur l'état futur de l'enfant.

En tout état de cause, l'action décidée doit pouvoir être justifiée et ses conséquences futures envisagées dès la prise en charge initiale de l'enfant en détresse. Dans cette perspective, la tentation de la performance pour la performance qui ferait survivre des nouveau-nés de plus en plus prématurés en prenant le risque de séquelles sévères ultérieures pour l'enfant, est clairement non éthique.

Toutes les éventualités, y compris celle d'un acte extrême, doivent être prises en considération dès les discussions sur la mise en œuvre d'une réanimation initiale, malgré (et peut-être à cause de) l'incertitude sur les conséquences. La décision d'entreprendre une réanimation pour faire survivre un enfant entraîne l'acceptation du risque de laisser survenir le handicap. Si l'enfant acquiert une autonomie respiratoire tout en restant dépendant de soins intensifs lourds,

cette situation aura été souvent la conséquence directe de la décision initiale de tenter de le sauver à tout prix.

Peut-on envisager de ne pas réanimer tous les nouveau-nés en détresse vitale pour éviter d'avoir à décider ultérieurement un arrêt de vie ?

C'est donc bien à ce moment initial de la décision de réanimation que s'engagent toute la réflexion et la responsabilité éthique.

Associer les parents

L'implication des parents est essentielle. Respecter la dignité du nouveau-né implique de respecter son entourage. Ce qui, dans la médecine des adultes, relève du consentement libre et éclairé, revient ici à ceux qui ont conçu l'enfant. Impliquer les parents, c'est en effet non seulement les respecter eux-mêmes, mais encore respecter l'enfant, l'enfant dans sa famille et sa famille, et préparer ou préserver au mieux l'avenir.

La manière de donner l'information doit permettre de favoriser le cheminement des parents lors de cette épreuve tragique en établissant un véritable partage qui ne les laisse pas seuls avec leurs questions et leurs hésitations. L'accompagnement débute dès le premier entretien de la prise en charge thérapeutique. Le discours médical initial doit anticiper une éventuelle issue défavorable. L'information fournie doit être la plus complète possible, sans craindre de signaler les points encore non formellement établis. Elle sera intelligible, renouvelée, complétée et réévaluée en permanence en fonction de l'évolution de la situation médicale du nouveau-né au cours de son séjour en réanimation et indépendamment de toute considération de type économique.

Respecter les parents implique une recherche commune de la solution la plus humaine, engageant parents et soignants. Le dialogue tiendra compte des forces et des faiblesses des parents qui auront à assumer la charge de l'enfant après sa sortie des soins intensifs. Les données médicales prospectives, de même que leurs conséquences sur le plan des capacités de l'enfant à devenir autonome et à établir des relations avec son entourage et le monde qui l'entoure, devront être explorées, sans cacher toutes les incertitudes qui caractérisent le pronostic médical dans ces cas.

Cependant, si l'implication des parents est essentielle, ainsi que le dialogue avec l'équipe médicale, le médecin et les soignants, il faut toutefois souligner les limites de la communication dans une telle situation. Même si antérieurement des informations objectives liées aux risques ont été plusieurs fois communiquées, il faut rappeler qu'il est des moments dans la vie où l'on n'entend pas. Cela est vrai surtout dans une situation où peut exister un grand décalage de logiques et d'attentes entre les personnes concernées. Le dialogue et l'échange peuvent en partie y remédier ; mais il est des situations où la bonne volonté, l'information, le dialogue ne suffisent pas à combler des

perspectives inévitablement éloignées les unes des autres. Est ici fondamentale la notion d'un temps de maturation nécessaire, variable selon les situations toujours singulières et les familles au sein desquelles peut parfois surgir une discordance ; les comportements ambivalents et l'expression d'un sentiment de culpabilité si fréquent sont également à accueillir et à prendre en compte. Dans cette recherche de la solution la plus humaine, il est non seulement utile mais nécessaire d'associer plusieurs médecins et les collaborateurs paramédicaux, notamment le personnel soignant (infirmières, aides-soignants) et les psychologues. Ce sont elles et eux qui suivent l'évolution des parents, de leurs idées, de leurs craintes, de leurs espoirs, de leur cheminement particulier pendant le séjour de leur enfant en réanimation. Ce travail d'équipe, toujours essentiel, permet de rassembler les perceptions des différents acteurs sur les considérations médicales, et d'écouter l'expression des sentiments des parents et de l'entourage et leur capacité d'envisager un futur. L'extrême difficulté des décisions en réanimation néonatale explique l'intérêt souligné par certaines équipes d'ouvrir la discussion à d'autres personnes, médecin extérieur à l'équipe soignante, spécialiste ou non de la prise en charge d'enfants handicapés, associations de parents d'enfants inadaptés.

Les attitudes face à l'évolution de la situation de détresse

Le document s'achève par une réflexion éthique appropriée aux diverses situations observées en pratique.

Urgence

Agir et informer ne sont pas toujours conciliables. Le temps nécessaire pour satisfaire, à l'exigence éthique d'informer les parents risque de retarder la mise en œuvre de la réanimation et des soins. Comme dans les autres cas d'urgence médicale, la décision du médecin sur le caractère raisonnable de la mise en route d'une réanimation repose sur son expérience. Il se doit, en tout cas, de s'efforcer le plus possible de ne pas décider seul, ce qui implique un fonctionnement en équipe, et d'informer le plus rapidement possible les parents des situations et des décisions en cours, leur permettant ainsi de les comprendre et de s'y associer. Le CCNE insiste sur l'importance d'une discussion collégiale *a posteriori* qui a l'avantage non seulement d'aider l'équipe soignante dégagée de l'impératif d'agir, à analyser la situation passée — en confrontant la solution décidée aux orientations éthiques déclarées — et ainsi affermir les repères éthiques pouvant guider les démarches lors de la survenue de nouvelles urgences. Le suivi des parents et leur accompagnement, notamment dans leur deuil, font partie de la démarche médicale et aident à surmonter un sentiment de culpabilité toujours présent.

Réanimer ou non, poursuivre ou arrêter la réanimation

Lorsque, à la naissance, les chances de survie sans séquelles sont nulles ou faibles, la mise en route d'une réanimation systématique, dite réanimation d'attente, amène à poser la question de l'acharnement thérapeutique. En ce sens, la réanimation d'attente n'est justifiée que si les chances de survie ne sont pas nulles ; malheureusement celles-ci ne peuvent encore être exactement appréciées au moment où est mise en œuvre cette réanimation. Il serait souhaitable que sur le modèle des conférences de *consensus*, les professionnels de plusieurs pays conviennent des critères explicites.

La réanimation d'attente est légitime si elle sait mettre un terme à l'obstination thérapeutique avant qu'elle ne devienne un acharnement. Dans cette situation, l'arrêt de la réanimation est ici assimilé à l'arrêt de l'acharnement thérapeutique.

Cependant, le conflit peut persister malgré tout entre la valeur sacrée accordée à la vie et un principe de bienfaisance qui invoquerait une évaluation au cas par cas du bénéfice attendu au regard des conséquences évitées. Le rapport nº 63 du CCNE, évoquant des situations de fin de vie — donc assez éloignées des questions de néonatalogie — a reconnu la légitimité de tels questionnements et s'est efforcé de tracer quelques voies pour y répondre. Ainsi, après la mise en route d'une réanimation d'attente, la question peut se poser de l'opportunité de l'arrêter, lorsque les chances de survie à court et moyen termes sont estimées nulles ou devant l'extrême gravité des lésions et leurs très sévères conséquences lointaines. Le rapport nº 63, déjà évoqué, faisait allusion à cette étape lorsqu'il affirmait notamment que « l'arrêt de toute assistance respiratoire ou cardiaque signifie seulement que l'on reconnaît la vanité de cette assistance, et par là-même l'imminence de la mort. Ces situations de limitation de soins s'inscrivent dans le cadre du refus de l'acharnement thérapeutique et ne sauraient être condamnées au plan de l'éthique ». Dans ces cas, toute poursuite de la réanimation du nouveau-né relèverait de l'acharnement thérapeutique qui, outre une apparence trompeuse de soins, pourrait laisser aux parents l'espoir illusoire que leur enfant pourrait guérir. Le cheminement le plus humain possible avec les parents passe plutôt par l'aveu explicite des limites des possibilités médicales. Si la situation incertaine et lourde de menaces est annoncée d'emblée et suivie pas à pas, elle sera mieux comprise et mieux suivie dans son évolution, jusqu'au terme de ses possibilités, ce qui atténuera la douleur du passage de l'espoir à l'acceptation de la réalité et facilitera le nécessaire deuil. Bien entendu, tant que le nouveau-né vit, le recours aux soins palliatifs s'impose vis-à-vis de lui comme à tout âge, ces soins doivent succéder aux gestes précédents, dont l'ambition était d'ordre curatif.

Au-delà de l'espoir...

Lorsque le nouveau-né a acquis une autonomie respiratoire, la constatation des lésions cérébrales qui entraîneront des handicaps sévères place les

équipes de réanimation devant des choix dramatiques. Ces situations sont un échec de la médecine et de ses interventions en amont et l'échec de prouesses techniques de la réanimation qui tente avec obstination de rétablir les situations de détresse.

L'échec est d'autant plus grave que les efforts importants faits par la société pour soutenir la procréation et la gestation n'ont pas été accompagnés de moyens humains et financiers suffisants pour la prise en charge des enfants handicapés. Mais, même si une prise de conscience de ces problèmes devait conduire à des préventions qui, dans l'avenir, réduiraient le nombre des situations dramatiques, de telles situations se présenteront toujours et il faudra y faire face.

L'enquête citée dans la première partie du rapport révèle que les néonatologistes français, à une majorité significative, considèrent que des gestes dont le but avéré est de mettre un terme à la vie du nouveau-né dans des situations qu'ils jugent particulièrement « insupportables », particulièrement désespérées, sont « acceptables » du point de vue de leur éthique professionnelle. Cette banalisation de fait pose une question éthique majeure. N'incite-t-elle pas à négliger les facteurs à l'origine d'une telle situation et donc leur prévention ? Or il y a une réelle exigence éthique à limiter au maximum la survenue de telles situations. Cette exigence s'impose à tous les niveaux d'intervention médicale autour de la procréation et pas seulement aux réanimateurs néonatologistes. Le spécialiste de l'AMP et l'obstétricien ne sauraient se dégager sur le néonatologiste de la responsabilité de décision face à des situations qu'ils ont contribué à générer.

Le développement de la recherche (imagerie, neurosciences) est une exigence urgente pour réduire le nombre des situations où on ne sait pas si la réanimation est une obstination thérapeutique nécessaire ou un acharnement thérapeutique déraisonnable.

Il n'en demeure pas moins que des situations imprévues, extrêmes, pourront toujours être observées. Il s'agit en particulier des enfants qui deviennent autonomes sur le plan respiratoire tout en étant porteurs de séquelles neurologiques extrêmes incurables. Si la question d'un arrêt de vie se pose alors, c'est parce que les décisions médicales prises plus tôt pour tenter de faire survivre l'enfant dans des conditions de vie acceptables ont échoué. La responsabilité médicale est ici directement engagée ; elle ajoute un poids déontologique supplémentaire au choix, en soi complexe, de la démarche la plus humaine, faire survivre un enfant porteur de graves handicaps ou provoquer sa mort. Dans sa réflexion sur les fins de vie (avis n° 63), la démarche proposée par le CCNE fondée sur les notions de solidarité humaine et de compassion face à une fin de vie considérée par le patient comme insupportable, au-delà même de l'aide que peuvent apporter les soins palliatifs, ne peut être présentée ici avec les mêmes arguments. En effet, pour qui cette vie apparaît-elle

insupportable ? N'est-ce pas moins la souffrance de l'enfant qui est en cause, que le fait que cette vie végétative se prolonge et devient « insupportable » pour la famille qui en assumera seule la charge réelle, pour l'équipe soignante dont elle marque l'échec, ou pour la société qui doit engager des frais importants pour une vie qui ne se développera et ne s'épanouira jamais ?

Dans cette situation où l'enfant est évidemment incapable de consentir à quoi que ce soit — et le restera toujours — personne n'est alors plus directement impliqué dans son destin que ses parents. C'est la persistance d'une vie végétative, dépourvue de toute possibilité relationnelle, que les parents peuvent considérer comme insupportable, et non la fin de vie. Les parents ont de leur enfant une image singulière : sa naissance, les épreuves rencontrées et sa fragile survie ont laissé en eux une empreinte qui a une valeur dont il n'est pas possible de préjuger. L'approche humaine de ces situations toujours dramatiques exige que puisse se manifester le sentiment profond des parents en évitant qu'il ne soit totalement dénaturé par un sentiment de culpabilité insoutenable.

C'est en effet dans ces situations tragiques que l'éventualité d'un arrêt médicalisé de vie est parfois envisagée. Il s'agirait alors d'une transgression évidente de la loi qui interdit toute atteinte à la vie humaine. Peut-être faut-il comprendre une telle transgression face à ces drames pour lesquels il n'y a aucune solution satisfaisante ? Quelle que soit la solution retenue il convient de garantir que la décision prise est l'aboutissement d'une démarche transparente et progressive menée en conscience, avec humanité, dans le souci de respecter au mieux les parents de l'enfant, seuls à pouvoir prendre la mesure du poids de l'avenir qui s'ouvre devant eux.

La responsabilité est celle de l'équipe soignante qui a la lourde charge d'affronter chaque difficulté avec courage, de donner toutes ses chances à l'enfant tout en sachant qu'elle restera responsable de sa décision de réanimer, d'arrêter une réanimation ou de la prolonger. Vient enfin le cas où le résultat fonctionnel est mauvais mais où l'enfant continue de vivre ; il est ici difficile de comprendre qu'une décision d'arrêt de vie soit prise par la seule équipe soignante qui aurait ainsi, en quelque sorte, la possibilité de rattraper son échec. C'est donc bien à l'équipe soignante — élargie si possible à d'autres participants, notamment des représentants d'autres familles concernées — de faire que par l'évolution de son dialogue avec les parents, ils soient amenés en situation de se déterminer. Mais en quelque sens qu'elle se manifeste, il convient de faire en sorte que l'autonomie de la décision parentale soit déconnectée du sentiment de culpabilité. En dernier lieu, c'est le responsable de l'équipe médicale qui devra être l'exécutant de la décision, qui malgré tout restera une transgression de la loi imprescriptible du respect de la vie. Ses acteurs devront accepter les conséquences qui pourraient en résulter et avoir à justifier de la démarche collégiale de « responsabilité, discernement, humanité » qui aura pu, à leurs yeux, justifier leur action.

En conclusion

Les réflexions éthiques proposées par le CCNE dans cet important rapport en appellent à une prise de conscience qui devrait conduire à tout mette en œuvre pour que soient suffisamment dénoncées les insuffisances de la prévention des détresses vitales à la naissance, les attitudes d'acharnement thérapeutique initial, la quête de performances médicales. A brève échéance, ces nouvelles attitudes devraient rendre plus rares ces situations conduisant à des actes qui resteront toujours une transgression.

Ces efforts nécessaires ne doivent pas occulter la faiblesse de l'investissement social dans la prise en charge des enfants handicapés. Le CCNE en appelle à la responsabilité de la société dans la correction de cette carence.

MOTS-CLÉS : SOINS INTENSIFS NOUVEAU-NÉ. EUTHANASIE. RELATION SOIGNANT-FAMILLE. RÉANIMATION.

KEY-WORDS (Index Medicus) : INTENSIVE CARE, NEONATAL. EUTHANASIA. PROFESSIONAL-FAMILY RELATIONS. RESUSCITATION.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 445-450, séance du 20 février 2001

INFORMATION

Sur les journées d'appel de préparation à la défense. Premiers résultats d'une enquête sur la santé et les comportements des jeunes

Roger HENRION, Jean-Michel COSTES, François BECK,
Stéphane LEGLEYE, Patrick PERETTI-WATEL

A la suite de la loi du 28 octobre 1997 portant sur la réforme du service national, celui-ci a été remplacé par la Journée d'Appel de Préparation à la Défense (JAPD). De ce fait, les enquêtes et visites médicales qui étaient effectuées dans les centres de sélection au cours de la période des trois jours et lors des visites d'incorporation ont disparu, supprimant ainsi la détection de maladies méconnues ou de handicaps variés, les vaccinations, l'éducation à la santé et les enquêtes épidémiologiques faites par le Service de Santé des Armées. Pour pallier ces manques, une Enquête sur la Santé et les Comportements lors de l'Appel de Préparation à la Défense (ESCAPAD) a été mise au point sous l'égide de l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT). Elle est fondée sur un autoquestionnaire, strictement anonyme, comportant un ensemble de questions sur la santé physique et psychique des jeunes, leur comportement social et leur consommation de substances psychoactives, questionnaire qui doit être rempli au printemps de chaque année, un samedi ou un mercredi, par tous les participants, hommes et femmes.

Cette enquête, qui a été approuvée à l'unanimité par l'Académie nationale de médecine dans sa séance du 15 février 2000 [1], a été appliquée, pour la première fois, les mercredi 10 mai et samedi 13 mai 2000, en France métropolitaine. Les résultats obtenus sont riches d'enseignement en ce qui concerne notamment la consommation de substances psychoactives. Dans l'enquête, le terme d'expérimentation désigne le fait d'avoir déjà consommé un produit au moins une fois au cours de sa vie, celui d'usage répété le fait d'avoir fumé au moins une cigarette par jour et/ou consommé de l'alcool au moins dix fois au cours des 30 derniers jours, d'avoir fumé du cannabis au moins dix fois au cours des 12 derniers mois.

L'autoquestionnaire a été distribué dans 94 salles le mercredi 10 mai et dans 267 salles le samedi 13 mai 2000. Le nombre d'appelés convoqués était de

16 391. Parmi eux, 1 444 (8,8 %) ne se sont pas rendus à la JAPD. En fait, la plupart des individus absents viendront faire leur journée ultérieurement puisqu'ils sont autorisés à le faire jusqu'à 25 ans et, parmi les présents, certains régularisaient leur situation. Quatre-vingt-onze participants ont rendu un questionnaire vierge (0,6 %). D'autres ont été éliminés en raison d'un trop grand nombre de non réponses aux questions posées. L'étude porte finalement sur 13 957 individus : 5 053 garçons de 17 ans, 3 736 de 18 ans et 1 807 de 19 ans et 3 361 filles de 17 ans, celles-ci n'étant convoquées que depuis le 1er avril 2000, les évolutions selon l'âge n'intéressent, pour le moment, que les garçons. La qualité de remplissage du questionnaire est apparue très satisfaisante : les incohérences sur les questions de consommation de produits psychoactifs ne concernent que 2 % des individus. Les jeunes ont, dans l'ensemble, apprécié que l'on s'occupe de leur santé. Certains ont même fait des remarques très pertinentes sur le libellé des questions. L'enquête a fait l'objet d'un rapport très complet de l'OFDT, paru le 5 février 2001 [2].

Les substances psychoactives couramment consommées

L'enquête confirme les résultats plutôt alarmants d'autres enquêtes récentes sur le tabac, l'alcool, le cannabis, les médicaments psychotropes.

Le tabac (Tableau 1)

A 17 ans, les filles fument désormais plus que les garçons (79,4 % contre 76 %). Mais l'écart s'estompe lorsqu'il s'agit d'usage répété (40,2 % contre 41,9 %). Il est inquiétant d'apprendre qu'à cet âge 6,4 % des filles et 6,8 % des garçons fument un paquet ou plus par jour. Chez les garçons, expérimentation et usage répété augmentent sensiblement avec l'âge puisqu'à 19 ans, 84 % ont déjà fumé et 50,9 % fument quotidiennement.

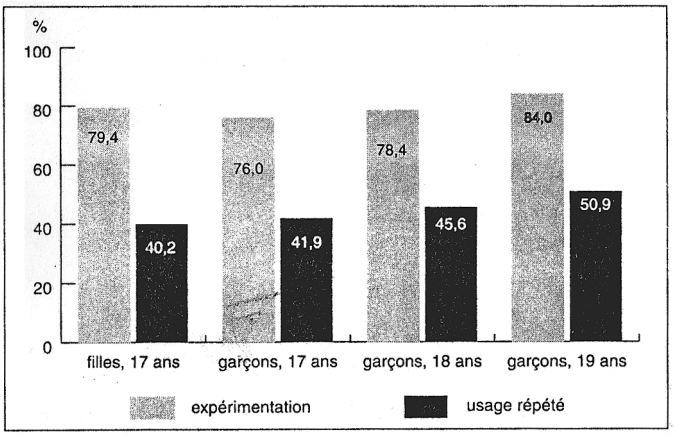
L'alcool (Tableaux 2 et 3)

La différence entre les sexes est plus marquée pour la consommation d'alcool. A 17 ans, les filles sont un peu moins nombreuses à avoir bu de l'alcool au cours du dernier mois (77,3 % contre 80,8 %). Surtout, elles sont trois fois moins nombreuses à déclarer un usage répété (5,5 % contre 16 %). Les résultats sont similaires pour les épisodes d'ivresse. A 17 ans, 49,8 % des filles et 63,5 % des garçons ont déjà été ivres au cours de leur vie ; 15,1 % des garçons et seulement 4,6 % des filles l'ont été au moins dix fois. A 19 ans, 74,9 % des garçons ont été ivres et 25,4 % l'ont été au moins dix fois.

Le cannabis (Tableau 4)

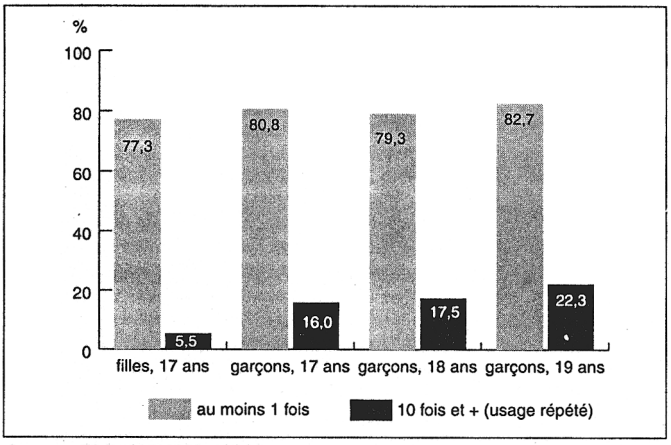
L'expérimentation du cannabis est devenue banale tant chez les filles que chez les garçons (à 17 ans, 40,9 % des filles et 50,1 % des garçons), mais la consommation régulière est plus importante chez les garçons (12,6 % des filles

Tableau 1. — Expérimentation et usage répété du tabac.



Source : ESCAPAD 2000 - OFDT

Tableau 2. — Consommation d'alcool au cours des 30 derniers jours



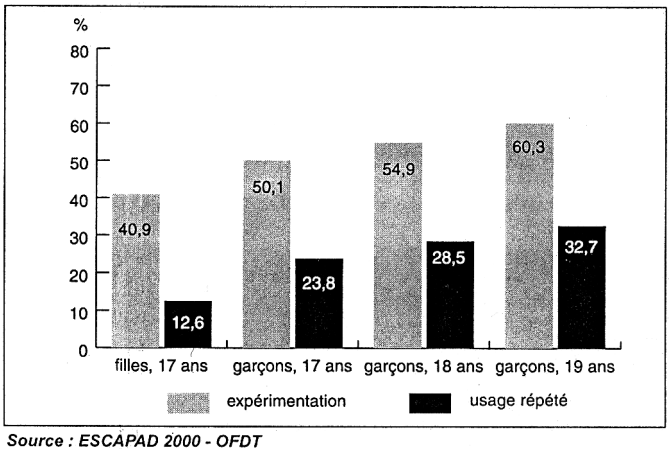
Source : ESCAPAD 2000 - OFDT

Tableau 3. — Fréquence des ivresses au cours de la vie

	aucune fois	1 ou 2 fois	3 à 9 fois	10 à 39 fois	40 fois ou plus
filles, 17 ans***	50,2 %	31,2 %	13,6 %	4,1 %	0,5 %
garçons, 17 ans***	36,5 %	27,8 %	20,1 %	12,0 %	3,1 %
garçons, 18 ans	34,4 %	25,5 %	20,6 %	14,7 %	4,4 %
garçons, 19 ans	25,1 %	25,7 %	23,2 %	17,3 %	8,1 %

Source : ESCAPAD 2000 - OFDT

Tableau 4. — Expérimentation et usage répété de cannabis



Source : ESCAPAD 2000 - OFDT

et 23,8 % des garçons). Chez les garçons la proportion d'expérimentateurs et d'usagers augmente avec l'âge. A 19 ans, ils sont 60,3 % à avoir une expérience du cannabis, 32,7 % à en faire un usage répété et 16 % à avoir fumé vingt fois ou plus au cours des trente derniers jours.

Les médicaments psychotropes (Tableau 5)

La consommation de ces médicaments est l'apanage des filles. A 17 ans, 29 % des filles et 10,6 % des garçons ont pris de tels médicaments. Chez ces derniers, le pourcentage n'augmente que peu avec l'âge : 13,6 % à 19 ans. L'enquête ne permet pas de déterminer si ces médicaments ont été ou non prescrits.

Les autres substances psychoactives (Tableau 5)

Leur consommation est beaucoup plus rare. Les substances les plus souvent citées sont les champignons hallucinogènes, le poppers, l'ecstasy, les produits

Tableau 5. — Expérimentation des autres produits psychoactifs

	filles 17 ans	garçons 17 ans	garçons 18 ans	garçons 19 ans
médicaments psychotropes*	29,0 %	10,6 %	12,7 %	13,6 %
champignons hallucinogènes	1,6 %	4,5 %	6,9 %	8,7 %
poppers	1,3 %	3,4 %	4,8 %	8,3 %
ecstasy	1,4 %	2,8 %	4,7 %	6,7 %
produits à inhaler	3,3 %	4,9 %	6,6 %	6,3 %
LSD	0,8 %	1,6 %	2,8 %	4,8 %
amphétamines	0,6 %	1,4 %	2,4 %	3,7 %
cocaïne	0,6 %	1,3 %	2,7 %	3,3 %
héroïne	0,4 %	0,9 %	1,4 %	1,3 %

Source : ESCAPAD 2000 - OFDT
* intitulé utilisé dans le questionnaire : « médicaments pour les nerfs, pour dormir »

à inhaler et, dans une moindre mesure, le LSD, les amphétamines et la cocaïne. Chez les garçons de 19 ans, l'expérimentation ne dépasse 5 % que pour quatre d'entre eux : les champignons hallucinogènes (8,7 %), le poppers (8,3 %), l'ecstasy qui continue la percée signalée par le Service de Santé des Armées en 1996 (6,7 %) et les produits à inhaler (6,3 %). La cocaïne fait une apparition discrète mais nette (3,3 %) et le LSD fait une réapparition (4,8 %). En revanche, l'héroïne est peu consommée (1,3 %).

La polyconsommation des substances psychoactives

Elle est préoccupante. A 17 ans, 75,9 % des filles et 74,7 % des garçons ont expérimenté au moins deux produits parmi le tabac, l'alcool et le cannabis. A cet âge, l'expérimentation des trois produits, simultanément ou successivement, est plus fréquente chez les garçons (46,9 %) que chez les filles (35,8 %). Elle augmente avec l'âge pour atteindre 82,6 % chez les garçons de 19 ans et 57,2 % pour la combinaison tabac, alcool, cannabis. Les variations selon le sexe sont beaucoup plus prononcées pour la polyconsommation régulière. A 17 ans, elle est deux fois plus fréquente chez les garçons (23,4 %) que chez les filles (12,4 %). Pour les deux sexes il s'agit surtout du tabac et du cannabis, le tabac étant le principal dénominateur commun des polyconsommations.

La fréquentation des fêtes « techno »

A 17 ans, près d'une fille sur 4 (23,3 %) et un garçon sur 3 (29,4 %) sont déjà allés à une fête techno (rave partie, technival), proportion qui s'élève chez les garçons à 36,8 % à 19 ans. Chez les garçons comme chez les filles, la fréquentation de ces fêtes est associée à de larges consommations de tabac, d'alcool et de cannabis et à une forte propension à consommer des substances

psychoactives stimulantes (ecstasy, amphétamines, cocaïne, LSD). Cependant, il existe de grandes différences de comportement entre les participants et la consommation de substances stimulantes est loin d'être la règle, comme le montre l'analyse détaillée des réponses.

Conclusion

Le rapport établi par l'OFDT fourmille de données intéressantes pour qui veut connaître le comportement de nos adolescents. Le rapport complet aborde une dizaine de thèmes. Il étudie notamment les relations entre les usages de substances psychoactives et la santé, les situations scolaires et familiales et la pratique sportive. Des esprits chagrins feront observer que cette enquête comporte des biais : certains jeunes, parmi les plus marginaux, ne se font pas recenser. C'est oublier que la proportion des objecteurs de conscience et surtout des exemptés, souvent recrutés dans la meilleure société, était autrefois beaucoup plus élevée. Cette étude complète d'autres enquêtes [3-6]. Elle a, en outre, l'avantage d'atteindre une proportion non négligeable de jeunes non scolarisés et de mieux garantir la confidentialité des réponses que les enquêtes en milieu scolaire où tous les élèves d'une même classe remplissent le questionnaire en même temps. Elle paraît aussi plus performante que les enquêtes par téléphone, en particulier chez les usagers de drogues illicites. Enfin, l'enquête qui sera reconduite chaque année permettra une étude transversale répétée des consommations des substances psychotropes, en temps réel, puisque les résultats sont exploités en quelques mois, ce qui est exceptionnel.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Henrion R. — Information sur les Journées d'Appel de Préparation à la Défense. *Bull. Acad. Natle. Med*, 2000, *184*, 491-493.

[2] Beck F., Legleye S., Peretti-Watel P. — Regards sur la fin de l'adolescence : consommations de produits psychoactifs dans l'enquête ESCAPAD 2000, rapport OFDT 2000, 220 p.

[3] Ballion R. — Les conduites déviantes des lycéens. Paris : Rapport OFDT, 1999, 243 p.

[4] Baudier F., Janvrin M.P., Arenes J. — Baromètre Santé jeunes 97/98. Vanves, CFES, 328 p.

[5] de Peretti C., Lesellbaum N. — Les lycéens parisiens et les substances psychoactives : évolutions. Paris : Rapport OFDT, 1999, 170 p.

[6] Beck F., Choquet M., Hassler C., Ledoux S., Peretti-Watel P. — Consommations de substances psychoactives chez les 14-18 ans scolarisés : premiers résultats de l'enquête ESPAD1999, évolutions 1993-1999. OFDT, Tendances, 2000, nº 6.

Mots-clés : Service national. Santé publique. Enquête santé.

Key-words (Index Medicus) : Service national. Public health. Health surveys. France.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 451-453, séance du 6 février 2001

RAPPORT

au nom de la Commission XI (Climatisme — Thermalisme — Eaux minérales)

sur la demande d'autorisation d'exploiter, en tant qu'eau minérale naturelle, après transport à distance, l'eau du captage Désirée Clary situé sur la commune de Gréoux-les-Bains (Alpes de Haute-Provence)

Claude LAROCHE

Par lettre en date du 4 janvier 2001, le sous-directeur de la gestion des risques des milieux, bureau de l'eau, sollicite l'avis de l'Académie nationale de médecine sur la demande d'autorisation d'exploiter, en tant qu'eau minérale naturelle, après transport à distance, l'eau du captage Désirée Clary situé sur la commune de Gréoux-les-Bains (Alpes de Haute-Provence).

L'Académie a émis, le 23 février 1999 [(1)], un avis favorable pour l'exploitation à l'émergence de l'eau de cette source. La mise en œuvre de ce forage profond, de bonne qualité microbiologique, constituait une amélioration notable par rapport à la situation antérieure et, le 24 février 1999, a été délivrée une **autorisation provisoire** (pour deux ans) d'exploitation à l'émergence et après transport à distance ; ce délai devant permettre la réalisation d'essais cliniques ainsi qu'une surveillance prolongée de la situation sanitaire de l'établissement thermal.

Un rapport, établi par la Commission Régionale d'Agrément et présenté par la DDASS des Alpes de Haute-Provence le 8 décembre 2000, conclut à la bonne qualité de l'eau du forage Désirée Clary, prouvée par l'étude des analyses de contrôle réglementaires du captage jusqu'aux thermes. Celles-ci ont remis en évidence des problèmes de qualité bactériologique au sein de l'établissement, en particulier dans le service de rhumatologie.

La Commission Régionale d'Agrément a proposé un avis favorable à l'autorisation de la délivrance des soins aux assurés sociaux pour la saison 2001, à condition que le plan d'hygiène soit scrupuleusement suivi, en particulier en ce qui concerne l'ensemble des désinfections à mettre en œuvre sur l'intégralité

1. *Bull. Acad. Natle Méd.*, 1999, *183*, nº 2, 407-421.

de l'établissement. La Commission demandait, en outre, que soit maintenue la fréquence des analyses sur les points révisés en 2000 et que la direction de l'établissement fasse procéder à un audit technique complet sur certains réseaux de soins afin de déterminer l'origine des mauvaises qualités d'eau thermale enregistrées.

Par ailleurs, le 11 mai 1999 [(2)], l'Académie a préconisé, dans ses conclusions, des essais cliniques.

Une étude a été effectuée sous la direction du Pr Martin, chef du service ORL du CHU de Saint-Étienne, concernant le traitement des otites séro-muqueuses chroniques.

Le protocole comportait

— un volet épidémiologique, basé sur l'anamnèse des troubles pathologiques et les traitements effectués,
— un volet clinique, l'examen ORL étant complété par une étude de l'impédance tympanique,
— une étude de la fonction tubaire par tubomanométrie.

L'étude, portant sur 73 cas, a été poursuivie pendant plusieurs cures. Il n'a pas été possible de constituer un véritable groupe témoin, pour des raisons humaines et éthiques.

L'otoscopie a été nettement améliorée et l'impédancemétrie a subi une amélioration jugée hautement significative.

Le Pr Martin conclut à une amélioration clinique après la première cure de Gréoux, ce qu'il considère comme très positif si on se réfère aux caractéristiques de la population étudiée. Il ne s'agit, à l'évidence, que de résultats préliminaires, portant sur un nombre trop restreint d'individus et « ces résultats devront donc être confrontés à l'épreuve du temps, seul juge de l'intérêt d'une thérapeutique vis-à-vis d'une affection chronique ».

Ces réflexions critiques prouvent d'ailleurs l'urgence d'entamer une réflexion sur les essais thérapeutiques en milieu thermal, tenant compte de la spécificité de la crénothérapie et des multiples contraintes humaines, éthiques et réglementaires, qui en ont jusqu'ici retardé la mise en pratique.

En conclusion, la Commission XI, réunie le 30 janvier 2001 sous la présidence du Pr Claude Laroche,

— constatant que le rapport de la Commission Régionale d'Agrément apporte toutes garanties sur la surveillance sanitaire exercée depuis deux ans et qu'une étude clinique a été effectuée sous le patronage du Pr Martin, chef du service ORL du CHU de Saint-Étienne,

2. *Bull. Acad. Natle Méd.*, 1999, *183*, nº 5, 1039-1040.

— considérant, en conséquence, que les demandes formulées par l'Académie le 11 mai 1999 ont été mises en pratique,

propose à l'Académie d'émettre un avis favorable à la demande d'autorisation d'exploiter, à l'émergence et après transport à distance, l'eau du captage Désirée Clary situé sur la commune de Gréoux-les-Bains.

*
* *

L'Académie, saisie dans sa séance du mardi 6 février 2001, a adopté ce rapport (24 abstentions).

MOTS-CLÉS : EAU MINÉRALISÉE. Gréoux-les-Bains (Alpes de Haute-Provence). Source Désirée Clary.

KEY-WORDS (Index Medicus) : MINERAL WATERS. France.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 455-476, séance du 6 février 2001

ACTES DE L'ACADÉMIE NATIONALE DE MÉDECINE

Séance du 6 février 2001

Présidence de M. Gabriel BLANCHER, *président*

ORDRE du JOUR

Actualité

Yves BROSSARD, Alfred SENDER, Jean-Pierre CARTRON, Jacques HUCHET, François PINON, Philippe BLOT, Georges DAVID (Paris)
Lecture par Georges DAVID
Intérêt du génotypage fœtal *RHD* dans la prévention de l'immunisation anti-D.

Communication

Bernard PESSAC (CNRS, Université Paris VI, Isabelle GODIN, Françoise ALLIOT
Microglie : origine et développement.

Information

Denys PELLERIN
A propos du rapport nº 65 du Comité Consultatif National d'Ethique : Réflexions éthiques autour de la réanimation néonatale.

Élections

— **d'un membre titulaire, dans la 8e section (Membres non résidants, option chirurgie et spécialités chirurgicales)**, en remplacement de M. Pierre AMALRIC, décédé.
— **de deux correspondants Ile-de-France dans la 4e division,** en remplacement de MM. Pierre TIOLLAIS et Jean-Marie BOURRE, élus membres titulaires.

Eméritat

— **de M. André Sicard**, membre titulaire dans la 2e section,
— **de M. Pierre Desgrez**, membre titulaire dans la 4e section,
— **de M. Yves Raoul**, membre titulaire dans la 6e section,
— **de M. Paul Maillet**, membre titulaire dans la 8e section.

Rapport

Claude Laroche (au nom de la Commission XI)
Demande d'autorisation d'exploiter, en tant qu'eau minérale naturelle, après transport à distance, l'eau du captage Désirée Clary situé sur la commune de Gréoux-les-Bains (Alpes-de-Haute-Provence).

Présentation d'ouvrage

René Küss
Chirurgiens et chirurgie à Strasbourg par Louis Hollender et Emmanuelle During-Hollender. — Strasbourg : COPRUR, 2000, 239 p.

ACTES

CORRESPONDANCE OFFICIELLE

Le ministre de l'Éducation nationale, sous-direction des personnels enseignants du supérieur, adresse copie de l'arrêté, en date du 18 janvier 2001, approuvant l'élection de M. Maurice Tubiana, en qualité de vice-président pour l'année 2001.

Le ministre de l'Education nationale adresse ampliation du décret, en date du 10 janvier 2001, approuvant l'élection de M. Bernard Glorion à une place de membre titulaire dans la 7e section.

CORRESPONDANCE NON OFFICIELLE

M. Yves Logeais (Rennes) pose sa candidature à une place de correspondant national dans la 2e division.

M. Michel Dumas (Limoges) pose sa candidature à une place de correspondant national dans la 3e division.

M. Jean-Pierre Mallié (Vandœuvre) pose sa candidature à une place de correspondant national dans la 4e division.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 455-476, séance du 6 février 2001

ÉLECTIONS

L'ordre du jour appelle l'élection :

— **d'un membre titulaire, dans la 8e section (Membres non résidants, option chirurgie et spécialités chirurgicales)**, en remplacement de M. Pierre AMALRIC, décédé.

La section présente aux suffrages de l'Académie les candidats dans l'ordre suivant :

— en première ligne : M. Paul MALVY (Nantes)
— en deuxième ligne et par ordre alphabétique : MM. Michel COGNAT (Lyon), Bernard LAUNOIS (Rennes), Philippe VICHARD (Besançon).

Il est procédé à un *premier tour* de scrutin qui donne les résultats suivants :

	nombre de votants :	106
	suffrages exprimés :	106
	majorité :	54
ont obtenu : MM.	MALVY	45
	LAUNOIS	29
	VICHARD	26
	COGNAT	6
		106

Deuxième tour

	nombre de votants :	105
	suffrages exprimés :	105
	majorité :	53
ont obtenu : MM.	MALVY	60
	LAUNOIS	34
	VICHARD	11
		105

M. Paul MALVY, ayant obtenu la majorité absolue des suffrages exprimés, est proclamé élu membre titulaire dans la 8e section (Membres non résidants, option chirurgie et spécialités chirurgicales).

Son élection sera soumise à l'approbation de Monsieur le Président de la République.

— **de deux correspondants Ile-de-France dans la 4e division,** en remplacement de MM. Pierre TIOLLAIS et Jean-Marie BOURRE, élus membres titulaires.

MM. André AURENGO (Paris) et Emmanuel CABANIS (Paris), sont élus.

ÉMÉRITAT

MM. André SICARD, 2e section, Pierre DESGREZ, 4ème section, Yves RAOUL, 6ème section, Paul MAILLET, 8e section, sont nommés membres émérites.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

René Küss présente : HOLLENDER, Louis, DURING-HOLLENDER, Emmanuelle. *Chirurgiens et chirurgie à Strasbourg* — Strasbourg : COPRUR, 2000, 239 p.

C'est très naturellement que je vous présente cet ouvrage sur la chirurgie et les chirurgiens de Strasbourg pour lequel mon ami, le professeur Hollender, m'avait demandé un avant-propos, connaissant bien les attaches ancestrales et médicales qui me lient à Strasbourg. Dans sa préface, Hollender nous dit les raisons qui l'ont incité à écrire ce livre : c'est mieux faire connaître les chirurgiens de Strasbourg qui ont joué un rôle souvent primordial dans l'évolution de la chirurgie et plus particulièrement dans la chirurgie moderne. Mais l'auteur ne se contente pas de rappeler les travaux de ces chirurgiens et c'est toute l'histoire de leur environnement qui est longuement exposée, c'est-à-dire l'histoire si particulière de l'Alsace que lui a valu sa situation géographique avec le brassage de civilisations, la diversité de ses langues, la rencontre des cultures française et germanique, mais aussi les tourmentes de tout ordre que les chirurgiens de Strasbourg ont dû affronter, politique, civil, religieux, guerrier, au cours des invasions et de longues périodes d'annexion. On conçoit que devant l'ampleur de ce travail, véritable encyclopédie, l'auteur ait fait appel à de nombreux collaborateurs, au nombre de 18, d'un très haut niveau, médecins, chirurgiens, historiens, en majorité issus de l'université de Strasbourg ainsi qu'à sa propre fille Emmanuelle During-Hollender, déjà très experte dans ce domaine. Dans la présentation de cet ouvrage qui débute à l'époque néolithique par la découverte de crânes trépanés aux environs de Strasbourg, parcourt le Moyen-Age et la Renaissance avec ses chirurgiens barbiers et baigneurs, et les wunderartz, et qui se termine à notre époque avec les deux centres de chirurgie parmi les plus grands en Europe, je me limiterai à vous présenter, parmi les 63 biographies, celles de ceux qui ont le plus contribué à l'évolution de la chirurgie.

Dans le bas Moyen-Age deux chirurgiens qui ont exercé dans la ville libre, impériale de Strasbourg, Hyeronismus Brunswig et Hans von Gersdof ont acquis une grande expérience de la chirurgie de guerre aux campagnes de Bourgogne contre Charles le

Téméraire, le premier en inaugurant la ligature des artères 50 ans avant Ambroise Paré, le second en ajoutant à l'amputation en saucisson une manchette par lambeau cutané pour recouvrir la tranche de section. L'un et l'autre ont écrit et illustré un livre de chirurgie et du chirurgien, le premier en dialecte alsacien pour être compris des chirurgiens barbiers, le deuxième magnifique incunable richement illustré, traduit en latin, en français et en néerlandais sera pendant plus de 50 ans le livre de référence des chirurgiens germaniques.

A la Renaissance, après le passage de Paracelse à Strasbourg et avec l'apparition de la Réforme, c'est Johann Winter qui sera le fondateur de l'anatomie à l'Université de Paris et le premier maître de Vésale. On lui doit la découverte du pancréas jusque-là assimilé à un amas de ganglions lymphatiques. Un peu plus tard, après le Traité de Wesphalie, dans cette ville libre de l'Université luthérienne de Strasbourg, Jean Frédéric Lobstein sera célèbre pour ses interventions de la cataracte avec son couteau et pour son enseignement de l'anatomie toujours couplé à la chirurgie, enseignement qui attirait les étudiants de l'Europe entière, dont Goethe lui-même qui dira sa préférence pour la chirurgie sur la médecine, je cite : *« que le chirurgien est le plus digne de respect, le médecin lui soigne les malades mais tu ne peux savoir s'il a été utile ou nuisible ».*

Plus tard, ce sera la dynastie des Maréchals (et pas des maréchaux) régnante à Strasbourg, avec Laurent qui fut le premier à traiter un cancer du col de l'utérus par amputation de ce col, Anselme Laurent, chirurgien de l'armée de Rhin, qui se fera un nom dans la chirurgie des fistules lacrymales et Laurent Joseph, qui occupera le premier poste de médecine opératoire et mourra de son dévouement lors d'une épidémie de choléra à Strasbourg.

Dans la turbulence révolutionnaire de 89, l'école de santé militaire de Strasbourg prit une croissance dans l'activité universitaire, avec à sa tête Louis Jacques Bégin, auréolé d'une importante carrière militaire, de la Berezina à Waterloo. Professeur au Val-de-Grâce, il contribua à l'organisation du service de santé. Puis Sédillot dont la carrière civile et militaire marqua l'évolution de la chirurgie. Incompris à Paris, il accéda à la chaire de clinique chirurgicale à Strasbourg. Déjà connu comme pionnier de la désarticulation de la hanche et par sa contribution aux indications de la trépanation dans les fractures du crâne, à la lithotritie et à l'uréthrotomie interne, en 1848 il réalisa avec succès la première gastrostomie directe suivie de gastrostomies rétrogrades. Il introduisit à Strasbourg l'anesthésie générale à peine trois mois après sa découverte aux États-Unis, donnant sa préférence au chloroforme sur l'éther. Mais, c'est en raison de sa contribution à la lutte contre l'infection et les purulences postopératoires qu'il avait acquis sa renommée. En 1844, avant Sommelweiss, il avait dénoncé, sans être entendu, les risques engendrés par la proximité des salles d'opération et des salles d'autopsie ; il défendit avec énergie les idées de Pasteur sur l'asepsie déjà mises en doute, sinon combattues à l'Académie de Médecine, et la contamination par « ces infiniments petits » qu'il baptisa microbes, dénomination universellement adoptée avec le parrainage de Littré et de Pasteur.

A. Sédillot, succéda Koeberle, un strasbourgeois à part entière. Il poursuivit son œuvre dans la lutte contre l'infection postopératoire toujours responsable d'une très forte mortalité. Avant les travaux de Lister et les découvertes de Pasteur, il préconisait une antisepsie à l'eau savonneuse et bouillie et à l'alcool liquide pour les mains et flambant pour l'instrumentation. En 1865 il présenta la première pince hémostatique à forci-pressure qui allait transformer la chirurgie et dont le grand Péan, immortalisé par Toulouse-Lautrec, voulut, au cours d'une séance de l'Académie de médecine particulièrement houleuse, lui ravir la paternité. Dès lors, à peu près assuré de l'asepsie et de l'hémostase et doué d'une très grande dextérité opératoire, il passa maître dans l'ablation des kystes de l'ovaire, dite alors ovariotomie, dont la mortalité à plus de 75 % la faisait déconseiller par des membres de notre Académie. Il la fera chuter à moins de 20 % et bientôt de 10 %. En 1863, Koeberle fit la première hystérectomie pour une tumeur fibromateuse pesant 33 kg et contenant 2 litres de sang, mais la malade ne put en faire les frais victime de ce qu'on appellerait aujourd'hui un choc opératoire. Quelques semaines plus tard, avec un fibrome de 7 kg seulement, ce fut le premier succès qui marqua le début d'une longue série et fit de l'hystérectomie pour le traitement des fibromes le plus grand progrès de la chirurgie contemporaine. De tous les pays affluaient les chirurgiens pour voir opérer le maître et s'inspirer de sa technique.

En 1883, sous domination allemande, il présida le premier congrès français de chirurgie avant de délaisser cette chirurgie pour s'adonner à l'archéologie et à la poésie.

Eugène Boekel, lui aussi élève de Sédillot, succéda à Koeberle après s'être illustré sur les champs de bataille de l'Alsace du Nord et par l'installation des hôpitaux de campagne. Il introduisit la transfusion de sang défibriné à Strasbourg et prit part à la lutte pour la méthode antiseptique qu'il avait vu utiliser par Lister à Edimbourg. Orienté vers l'orthopédie, il rapporta en 1885 à cette Académie 136 succès obtenus après résection de genoux tuberculeux. Particulièrement développée dans cet ouvrage, l'histoire de la chirurgie et des chirurgiens en Alsace dans la première moitié du 20ème siècle, sera celle d'une des périodes les plus riches de la chirurgie avec l'avènement à Strasbourg de deux grandes cliniques chirurgicales enviées par les plus grands chirurgiens. Stoelz, spécialement orienté vers la chirurgie biliaire, fut le premier à faire à Strasbourg les premières gastrectomies pour ulcère de l'estomac et du duodénum spécialement redoutées pour leurs hémorragies. Venu de Lyon, René Leriche, ce grand voyageur, qui devait dénoncer l'immobilisme parisien, fut le promoteur de la chirurgie du sympathique qui règnera dans le monde pendant plus de 15 ans, mais dont les indications se réduiront progressivement. Au nom de Leriche restera attachée la chirurgie vasculaire à laquelle l'avait initié son ami Carrel : son élève Kunlin réussit le premier pontage artério-veineux avec la saphène fémoro-poplité chez un homme porteur d'une artérite obstruante et ulcérée du membre inférieur ayant résisté à la sympathectomie et l'artériectomie et que Leriche s'apprêtait à amputer. En 1919, le lorrain Sancerre, intéressé à la pathologie de l'œsophage avec les premières oesophagoscopies, sera lui aussi un des pionniers de la

chirurgie conservatrice vasculaire en appliquant avec succès chez l'homme, l'expérimentation de Carrel.

Après l'exploit de Larrey, Sancerre fut le deuxième chirurgien à avoir réalisé avec succès une embolectomie.

Puis ce fut Alfred Weiss, un de mes parents, qui m'a conduit dans cette Maison. Venu de Paris, il rejoignit sa terre natale et succéda à Sancerre à la chaire de chirurgie à laquelle il associa la première unité de soins intensifs en France. Il sera un des pionniers de la chirurgie thoracique et pulmonaire, en particulier dans le domaine de la tuberculose.

Enfin, comment ne pas rappeler la personnalité de René Fontaine, qui acquit une autorité internationale dans tous les domaines, avec une prédilection dans la chirurgie vasculaire.

Enfin, dans cet ouvrage, apparaît le docteur Schweitzer, chirurgien qui a rapporté à l'Alsace le Prix Nobel de la Paix.

Ces grands chirurgiens ont laissé des élèves dignes de leurs maîtres et parmi eux l'Auteur de ce livre, un maître de la chirurgie digestive, et le professeur Cinquable qui a fondé, à Strasbourg, le premier centre de transplantations multiorganes aujourd'hui en pleine expansion, que j'ai eu l'honneur d'inaugurer en 1987 avec le Professeur de Backey.

J'en ai fini avec cette présentation des sommités chirurgicales de l'Alsace si bien mises en relief dans ce livre, très richement illustré. Mais il ressort aussi de ces 63 biographies en dehors de l'activité chirurgicale de ces chirurgiens, combien ils ont été, malgré les tourmentes, attachés à l'Alsace en ayant toujours refusé les postes universitaires qui leur étaient offerts avec intérêt pécuniaire non négligeable, dans les plus grandes facultés de l'Europe, que ce soit en Allemagne, en Suisse, en Italie ou en Norvège. Il est aussi décrit dans cette histoire leur attachement à la France. C'est en 1871, Emile Küss, professeur de Physiologie et dernier maire français de Strasbourg, qui, ayant obtenu davantage de voix que Gambetta, avait été désigné pour conduire la délégation des députés alsaciens protestataires de l'annexion de l'Alsace Lorraine par l'Allemagne devant une Assemblée nationale réunie à Bordeaux mais bien peu compréhensive. Et puis, ce fut le dévouement et l'énergie des professeurs Schlumberger et Boekel qui feront tout après la défaite pour conserver et animer une école de médecine française autonome à Strasbourg.

Soulignons encore en 1939, le dévouement de Fontaine et de Weiss pour le fonctionnement d'un hôpital du maquis ouvert à la résistance.

Aux dernières pages du livre figure la liste des membres de l'Académie de médecine depuis sa formation. J'y relève de nombreux Alsaciens dont Bégin, qui en fut Président en 1847. Mais quelle fut ma stupéfaction de ne pas y trouver le nom de Koeberle, qui avait été désigné par les douze plus grands chirurgiens de l'époque comme le premier de la chirurgie moderne.

Monsieur le Président, ne pensez-vous pas que dans cette période de repentance que nous traversons, il serait justifié de créer une « section des oubliés » dans laquelle Koeberle aurait sa place, peut-être aux côtés de Jaboulay, pour faire plaisir aux lyonnais. Enfin, si nous devons grandement féliciter le professeur Hollender et ses collaborateurs pour les qualités de cet ouvrage, permettez-moi de faire quelques reproches à l'éditeur pour la petitesse de ses caractères rendant sa lecture difficile et qui n'aurait certainement pas été avalisée par Gutenberg à Strasbourg, lorsqu'il imprimait et illustrait les premiers ouvrages concernant l'anatomie.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 455-476, séance du 13 février 2001

Séance commune du 13 février 2001

Académie nationale de médecine
Académie Vétérinaire de France
Académie d'Agriculture de France

« La chaîne du froid et l'aliment »

Présidence de M. Gabriel BLANCHER, *président*

Modérateurs : MM. Gabriel BLANCHER et Maurice-Paul DURAND

ORDRE du JOUR

Présentation

Maurice-Paul DURAND (Académie nationale de médecine)
Historique de l'application du froid aux denrées alimentaires.

Communications

André GAC (Académie d'Agriculture)
Problèmes techniques liés à la chaîne du froid.

Roland ROSSET (Académie nationale de médecine et Académie Vétérinaire)
Croissance microbienne et froid. Etude du cas particulier de *Listeria monocytogenes*.

André GAC (Académie d'Agriculture), Maurice-Paul DURAND (Académie nationale de médecine)
Chaîne du froid, concept de traçabilité, applications pratiques.

Evelyne DERENS, Onrawee LAGUERRE, Bernard PALAGOS (CEMAGREF, Unité de recherche : génie des procédés frigorifiques)
Analyse des facteurs influençant la température dans les réfrigérateurs des ménages.

Jacques PUISAIS (Académie d'Agriculture), Maurice-Paul DURAND (Académie nationale de médecine)
Température et qualités sensorielles des aliments.

Conclusions

Roland ROSSET

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 455-476, séance du 20 février 2001

Séance du 20 février 2001

Présidence de M. Gabriel BLANCHER, *président*

ORDRE du JOUR

Communications

Étienne-Émile BAULIEU (U 488 INSERM et Collège de France)
Neurostéroïdes, une nouvelle fonction cérébrale : neurotrophicité, mémoire, vieillissement....

Jacques SALAT-BAROUX (Hôpital Tenon-Paris), Dominique CORNET, Jacqueline MANDELBAUM, Yan WATANABE, Philippe MERVIEL, Jean-Marie ANTOINE
Le don d'ovocytes depuis la loi de bioéthique. Implications médicales, éthiques et juridiques déduites d'une série de 300 cas à l'Hôpital Tenon.

Pierre FUENTES (Hôpital Sainte-Marguerite — Marseille), Christophe DODDOLI, Pascal THOMAS, Roger GIUDICELLI
Chirurgie des cancers bronchiques après radiochimiothérapie ou chimiothérapie : risques et bénéfices.

Communiqué

Paul LECHAT au nom de la Commission II
Internet et information du public sur le médicament.

Information

Roger HENRION, Jean-Michel COSTES, François BECK, Stéphane LEGLEYE, Patrick PERETTI-WATTEL
Sur les journées d'appel de préparation à la défense. Premiers résultats d'une enquête sur la santé et les comportements des jeunes.

Compte rendu de visite

Michel ARSAC
Visite du site thermal d'Avène-les-Bains, le 5 octobre 2000.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 455-476, séance du 20 février 2001

Présentation d'ouvrage

André VACHERON
LOISANCE, Daniel. *Le cœur réparé.* Paris : Réponses Santé Robert Laffont, 1999, 350 p.

Comité secret

Jean-Baptiste PAOLAGGI
Rapport sur les candidatures à une place de membre titulaire dans la 1ère section en remplacement de M. Gabriel RICHET, nommé émérite.

Michel ARSAC
Rapport sur les candidatures à une place de membre titulaire dans la 2e section en remplacement de M. Claude OLIVIER, nommé émérite.

ACTES

CORRESPONDANCE OFFICIELLE

Le ministre de la Solidarité, sous-direction de la gestion des risques des milieux, sollicite l'avis de l'Académie, par lettre du 6 février 2001, sur le projet de décret relatif aux allergènes préparés spécialement pour un seul individu et modifiant le code de la Santé Publique (deuxième partie : décrets en Conseil d'État).

CORRESPONDANCE NON OFFICIELLE

M. Paul MALVY (Nantes) remercie pour son élection au titre de membre titulaire dans la 8e section.

MM. André AURENGO et Emmanuel CABANIS remercient pour leur élection au titre de correspondant Ile-de-France dans la 4e division.

M. Georges-André DUBOS sollicite, par lettre du 13 février 2001, le partenariat de l'Académie pour la Commémoration du 100e anniversaire de la naissance du professeur René Dubos (microbiologiste franco-américain).

M. Pierre MOREL informe qu'il n'occupe plus les fonctions de directeur du Bureau Europe centrale et orientale de l'Agence universitaire de la Francophonie à Bucarest. En conséquence, le dossier relatif à la réunion annuelle de l'Union Médicale Balkanique 2003 à Paris est transmis à M. Jean-Dominique Assié (Services centraux, 4 place de la Sorbonne — 75005 Paris).

M. Pierre Banzet informe qu'il organise la visite d'un site de production automobile (Usine Peugeot) pour un groupe de 25 académiciens, jeudi 26 avril 2001.

M. Louis Auquier informe que la décennie 2000-2010 est devenue officiellement, le 13 janvier 2000 à Genève, « *La Décennie des Os et des Articulations* » sous l'égide des Nations Unies et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Les affections de l'appareil locomoteur représentent la cause la plus fréquente de douleurs prolongées et/ou sévères et d'incapacités physiques. L'idée a été de constituer une force multidisciplinaire mondiale efficace impliquant les personnes et les structures concernées par ces problèmes. En France, un réseau rassemble les sociétés savantes (notamment Société Française de Rhumatologie, Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, Société Française de Médecine Physique et de Réadaptation, Groupe de Recherche et d'information sur l'Ostéoporose...), et pour représenter les patients, l'Association Française de Lutte Anti-Rhumatismale (AFLAR). Le professeur Sedel en assure la coordination. L'objectif est d'améliorer la qualité de vie des personnes atteintes en encourageant la recherche, la prévention, le traitement et leur prise en charge.

AFLAR, Hôpital de La Pitié — 75681 Paris cedex 13.
Sites Web : *http : //aflar.unice.fr*
BJD : *http : //www.bonejointdecade.org*

COMPTE RENDU DE VISITE

Visite du site thermal d'Avène-les-Bains, le 5 octobre 2000, par Michel Arsac

Je dois rendre-compte à notre Compagnie de la visite effectuée à l'invitation du Laboratoire Pierre Fabre au site thermal d'Avène. La délégation de l'Académie était menée par notre Secrétaire Perpétuel, Louis Auquier.

La station thermale d'Avène-les-bains est située dans le Haut-Languedoc, au nord du département de l'Hérault, à 75 km au nord-ouest de Montpellier. Une heure de vol nous a déposés à l'aérodrome de cette ville. Le trajet en voiture parcourt la plaine, puis, par une route de montagne qui serpente dans la vallée de l'Orb, atteint le village d'Avène, qui compte 350 habitants l'hiver. Dans cet automne pluvieux, un exceptionnel temps ensoleillé nous a fait découvrir la station dans une étroite vallée boisée.

C'est l'activité thermale qui anime cette station. Elle est constituée de deux pôles :

— le thermalisme proprement-dit avec son Établissement de Bains, récemment reconstruit, et très moderne. La découverte fortuite au XVIII^e^ siècle, vers 1736, des propriétés dermatologiques de l'eau de la Source Sainte-Odile a développé lentement le thermalisme. D'abord simple bassin, devenu Établissement Thermal à la fin de ce siècle, il fut l'objet d'une première publication scientifique à la Faculté de Montpellier en 1772. Il a manqué la célébrité lorsque Napoléon I^er^, en

1811, projeta d'y venir pour apaiser un prurit tenace. Mais il fut alors entraîné au loin par les Campagnes d'Espagne, puis de Russie. Un nouvel et plus vaste Établissement Thermal, construit en 1860, vient d'être remplacé par une installation moderne ;

— l'activité dermatologique de cette eau nous a été excellemment présentée par notre collègue Neuzil, de la Faculté de Bordeaux 2, qui est aussi Correspondant National de notre Compagnie. Faiblement minéralisée (210 mg/l), bicarbonatée calcique et magnésienne, avec 15,2 mg de silice et silicates, de pH neutre, l'eau est tiède et émerge à 25,6° C. Elle vient du Larzac et de la Montagne noire par une lente filtration que le marquage par radioéléments évalue de l'ordre de 40 années et davantage.

L'indication principale est la dermatite atopique, mais aussi les affections prurigineuses et le psoriasis, les cicatrices chéloïdiennes, l'acné.

A l'empirisme initial succède l'étude scientifique qui nous a été montrée par M. Charveron et par M. Guerrero : test de dégranulation des basophiles, activation des mastocytes, réduction de la perméabilité intestinale au lactulose, etc.

L'Établissement Thermal utilise tous les procédés modernes et ressources de l'hydrothérapie, avec un équipement particulièrement développé pour les nourrissons ; il faut le mentionner.

L'autre pôle d'activité du site d'Avène est son unité de production dermocosmétique dont les produits sont à base de l'eau d'Avène, source du captage de Valorbe. En bref, nous avons été frappés par la rigueur du contrôle de qualité de tous les produits utilisés, par l'attention portée à la traçabilité de leur origine, par le nombre de tests de contrôle des produits élaborés, par la rigueur des degrés de conditionnement aseptique dans les chaînes de production. Il s'agit d'aérosols, de crèmes, de lotions, de laits cosmétiques ; ils sont produits avec une recherche de qualité de niveau pharmaceutique.

La réception du Laboratoire Pierre Fabre a été en tous points parfaite. Il faut en remercier tous les organisateurs, en citant notamment Monsieur Lepoetre, Monsieur Cousse, Monsieur Lafaurie, et Monsieur Bordat.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

André Vacheron présente : Loisance, Daniel. *Le cœur réparé***.** Paris : Réponses Santé Robert Laffont, 1999, 350 p.

« *Le cœur réparé* » que j'ai l'honneur de présenter, est l'œuvre de notre confrère Daniel Loisance. Pour ceux d'entre nous qui le connaissent mal, je rappelle que Daniel Loisance est le disciple et le successeur de Jean-Paul Cachera à la tête du service de chirurgie thoracique et cardiovasculaire de l'Hôpital Henri Mondor. Il dirige également l'équipe de recherches chirurgicales du CNRS, dont les travaux

sont consacrés aux thérapeutiques substitutives du cœur et des vaisseaux. A 55 ans, il est l'un de nos plus brillants chirurgiens cardiaques. Notre compagnie l'a élu correspondant dans la 2e division en 1997.

La chirurgie cardiaque est l'une des disciplines dont les progrès ont été les plus spectaculaires durant les 50 dernières années. Depuis Lillehei en 1954, il est devenu possible de réparer les lésions et les malformations cardiaques en ouvrant le cœur sous circulation extracorporelle. Développé sous l'impulsion de Favaloro et d'Effler depuis 1967, le pontage coronaire a connu un essor extraordinaire. Réalisée pour la première fois chez l'homme par le Sud-Africain Barnard en 1967, la transplantation cardiaque a pu se développer à partir de 1980 avec l'apparition d'un agent immunosuppresseur efficace : la ciclosporine. Depuis 10 ans, près de 2 000 opérations cardiaques sont effectuées chaque jour dans le monde. Régulièrement sont annoncés de nouveaux succès certainement trop médiatisés, de nouvelles machines pour suppléer le cœur défaillant, la chirurgie cardiaque à cœur battant sans circulation extracorporelle, le robot qui remplace la main du chirurgien.

Il n'est pas étonnant que dans ce contexte, l'attente des malades soit considérable, que le risque chirurgical soit de moins en moins accepté et que le moindre handicap postopératoire soit refusé.

En chirurgie, plus que dans toute discipline médicale, l'information est indispensable : le malade doit être informé des différentes étapes de son parcours chirurgical, des modalités et des risques de l'intervention, des résultats qu'il peut en espérer.

Dans son livre passionnant, Daniel Loisance décrit les mille façons de vivre sa chirurgie cardiaque en citant les premières phrases de l'ouvrage de l'un de ses opérés, intitulé *Du pont de mon cœur* : « demain comme beaucoup d'autres, vous passerez par un chemin semblable mais vous serez prévenus, vous en connaîtrez davantage sur les événements que j'ai vécus alors que candide, j'ignorais tout de ce qui allait m'arriver. L'inquiétude, l'angoisse tiennent plus à la reconnaissance du chemin à parcourir que de la crainte de l'opération elle-même ».

Comme le souligne Loisance, la rencontre et le dialogue du chirurgien et de son patient avant l'intervention sont les conditions indispensables pour créer la confiance dans l'acte opératoire et dans ses artisans.

Daniel Loisance montre ce qu'est devenue aujourd'hui la chirurgie cardiaque : une activité bien maîtrisée au plan technique, au niveau de sécurité élevé avec souvent une quasi-certitude du résultat. Cinquante mille malades sont opérés du cœur chaque année en France en secteur public et en cliniques privées. Le chirurgien cardiaque peut réparer les valves, les remplacer par des prothèses mécaniques ou par des bioprothèses, ponter les artères coronaires, réparer les parois cardiaques, la rupture de l'aorte, remplacer le cœur quand il est irrémédiablement défaillant. En 30 ans, la transplantation cardiaque est devenue une opération simple au plan technique, toujours complexe au plan biologique du rejet, mais qui pose un véritable problème de santé publique en raison de la pénurie du don d'organes. C'est dire l'importance des techniques modernes d'assistance circulatoire et en particulier des

ventricules artificiels externes comme le Novacor, qui permettent l'attente de la transplantation voire d'une possible récupération du cœur malade pendant des semaines, parfois pendant des mois et dont Daniel Loisance est l'un des pionniers. Un chapitre de l'ouvrage est réservé à la recherche. Le maître de Daniel Loisance, Jean-Paul Cachera, avait parfaitement compris cette obligation non seulement technique mais morale de n'envisager toute application nouvelle chez l'homme qu'après avoir validé la technique et étudié ses problèmes chez l'animal. Comme le souligne Loisance, le grand problème pour la recherche chirurgicale française est le manque de moyens et de financement. Cependant, le centre de recherche de l'hôpital Henri Mondor a pu préparer efficacement l'introduction de l'assistance mécanique circulatoire dans notre pays.

En terminant son ouvrage, Daniel Loisance s'interroge sur les perspectives évolutives de la chirurgie cardiaque : chirurgie mini-invasive sous vidéoscopie, chirurgie robotisée, cœur artificiel, et sur les coûts pour la société du développement de ces techniques qu'il est difficile d'encadrer, même par des règles de bonne pratique, des registres, des critères de qualité.

A côté de la maîtrise technique, existe une obligation d'ordre moral : la réflexion avant la décision qui sera suivie de l'action. Une telle rigueur dans le déroulement de la démarche chirurgicale se retrouve au bloc opératoire et favorise le bon résultat.

Tout au long de son livre passionnant, Daniel Loisance analyse avec une grande humanité et sans complaisance l'évolution de la chirurgie cardiaque qui doit éviter la dérive technologique, de la mentalité des malades qui deviennent de plus en plus exigeants, de l'administration et des responsables politiques trop souvent incapables de prendre des décisions adaptées en temps utile. Il conclut en soulignant que plus que la durée, la qualité de l'existence devrait être l'objectif fondamental pour tout médecin et pour tout chirurgien.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 455-476, séance du 27 février 2001

Séance du 27 février 2001

Présidence de M. Gabriel BLANCHER, *président*

ORDRE du JOUR

Christian de DUVE (Prix Nobel de médecine et de physiologie — Associé étranger de l'Académie nationale de médecine — Bruxelles).
Réflexions sur la nature, l'origine et l'évolution de la vie.

Communications

Jean-Marie WARTER (Hôpitaux universitaires — Strasbourg)
Les maladies humaines familiales à prions.

Patrick NETTER, Damien LOEUILLE, Jean-Yves JOUZEAU, Pierre GILLET, Joël PETERSCHMITT, Jacques POUREL, Alain GAUCHER (UMR 7561 CNRS — UHP — Vandœuvre-les-Nancy).
Les chondrocalcinoses articulaires familiales : étude d'une famille alsacienne.

Elections

— **d'un membre titulaire, dans la 1ère section**, en remplacement de M. Gabriel RICHET, nommé émérite.

— **d'un membre titulaire dans la 2ème section,** en remplacement de M. Claude OLIVIER, nommé émérite.

Présentation d'ouvrages

Maurice CARA

— **Glossaire médico-pharmaceutique Anglais-Français**. François Claustre et coll. — Pharmacothèmes Ed. Paris, 2000, 1 vol., 88 p.

— **Répertoire des sérums de qualité en parasitologie** par Jean-Claude PETITHORY. — Union nationale des Polios de France, Ed 2000, 1 vol., 108 p.

— **Annales du contrôle national de qualité** par Jean-Claude PETITHORY et coll. — Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (parasitologie, thyroïde, sérologie virale, hématologie-immunologie, blot VIH), juin 2000, *19*, 208 p.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 455-476, séance du 27 février 2001

ACTES

CORRESPONDANCE NON OFFICIELLE

M. Michel Delcroix sollicite, par lettre du 16 février 2001, le parrainage de l'Académie pour les rencontres nationales *« La femme et le tabac »*, organisées par l'APRI et la ville du Havre les 3, 4 et 5 mai 2001.

Le parrainage est accordé.

M. François-Bernard Michel informe qu'il ne peut pas représenter l'Académie aux réunions de la section « Milieux de vie » du Conseil Supérieur d'hygiène publique de France, qui se tiennent le mardi.

L'Académie désigne, pour le remplacer, M. Gérard Dubois qui accepte.

ÉLECTIONS

L'ordre du jour appelle l'élection :

— **d'un membre titulaire, dans la 1ère section (Médecine et spécialités médicales),** en remplacement de M. Gabriel Richet, nommé émérite.

La section présente aux suffrages de l'Académie les candidats dans l'ordre suivant :

— en première ligne : M. Pierre Rondot,
— en deuxième ligne et par ordre alphabétique : MM. Jean-Noël Fiessinger, Jean-Pierre Luton, Jean-Daniel Sraer.

Il est procédé à un *premier tour* de scrutin qui donne les résultats suivants :

	nombre de votants :	98
	suffrages exprimés :	98
	majorité :	50
ont obtenu : MM.	Sraer	44
	Rondot	35
	Fiessinger	12
	Luton	6
	Bulletin blanc marqué d'une croix	1
		98

Deuxième tour

	nombre de votants :	98
	suffrages exprimés :	98
	majorité :	50
ont obtenu : MM.	Rondot	53
	Sraer	42
	Fiessinger	1
	Luton	1
	Bulletin blanc marqué d'une croix	1
		98

M. Pierre Rondot, ayant obtenu la majorité absolue des suffrages exprimés, est proclamé élu membre titulaire dans la 1re section (Médecine et spécialités médicales).

Son élection sera soumise à l'approbation de Monsieur le Président de la République.

— **d'un membre titulaire, dans la 2ème section (Chirurgie et spécialités chirurgicales),** en remplacement de M. Claude Olivier, nommé émérite.

La section présente aux suffrages de l'Académie les candidats dans l'ordre suivant :

— en première ligne : M. François Dubois,
— en deuxième ligne et par ordre alphabétique : MM. Henry Hamard, Daniel Loisance, Jacques Salat-Baroux.

Il est procédé à *un tour* de scrutin qui donne les résultats suivants :

	nombre de votants :	94
	suffrages exprimés :	94
	majorité :	48
ont obtenu : MM.	Dubois	51
	Salat-Baroux	27
	Hamard	9
	Loisance	7
		94

M. François Dubois, ayant obtenu la majorité absolue des suffrages exprimés, est proclamé élu membre titulaire dans la 2ème section (Chirurgie et spécialités chirurgicales).

Son élection sera soumise à l'approbation de Monsieur le Président de la République.

Bull. Acad. Natle Méd., 2001, *185*, nº 2, 455-476, séance du 27 février 2001

PRÉSENTATION D'OUVRAGES

— **Christian de DUVE *,**
Réflexions sur la nature, l'origine et l'évolution de la vie

Je suis heureux d'avoir enfin l'occasion d'exprimer de vive voix à votre Académie mes remerciements chaleureux pour le grand honneur qu'elle m'a fait en me nommant associé étranger. J'ai été particulièrement sensible à cette distinction venant d'une institution à laquelle je suis très attaché.

Comme certains d'entre vous le savent peut-être, j'arrive au terme d'un trajet qui ma mené, par suite de circonstances qui doivent plus au hasard qu'à la nécessité, de la médecine à la physiologie, de la physiologie à la biochimie, de la biochimie à la biologie cellulaire, de la biologie cellulaire à la pathologie cellulaire, pour revenir enfin à la médecine par le biais de la recherche biomédicale qui se pratique aujourd'hui à l'ICP, l'Institut que j'ai contribué à fonder à Bruxelles en 1975. Ce ne sera malheureusement d'aucun de ces sujets que je pourrai vous entretenir aujourd'hui, car j'ai depuis quelques années perdu le contact avec la recherche de laboratoire, pour me consacrer plutôt, comme beaucoup de biologistes de mon âge, à des réflexions plus générales sur la nature, l'origine et l'évolution de la vie et pour tenter de dégager les conclusions « philosophiques » que suggère l'extraordinaire révolution dans les connaissances à laquelle ma génération a eu le privilège d'assister. J'ai résumé ces réflexions dans un ouvrage, *Poussière de vie*, paru en 1996 chez Fayard. Je me fais un plaisir d'en offrir un exemplaire à votre Académie.

La conclusion principale du livre est qu'il y a dans l'origine et l'évolution de la vie plus de nécessité et moins de hasard que ne l'a proposé le regretté Jacques Monod dans l'ouvrage célèbre *Le hasard et la nécessité,* qu'il consacrait au même sujet il y a trente ans. Pour ce qui est de l'origine de la vie, ma conception se fonde sur le fait que ce sont des phénomènes chimiques, et donc soumis à un déterminisme strict, qui ont dû donner naissance à la vie. C'est principalement pour cette raison que je défends la thèse que la vie devait obligatoirement apparaître dans les conditions physico-chimiques qui ont présidé à son développement. Je crois que si les mêmes conditions devaient se reproduire ailleurs, la vie devrait y naître également, non pas nécessairement sous les formes que nous lui connaissons, mais fondée sur les mêmes processus chimiques fondamentaux. Cela n'implique pas forcément qu'il y a de la vie ailleurs dans l'univers. Tout dépend de la probabilité de l'existence de corps célestes ayant une histoire suffisamment semblable à celle de la terre pour que les conditions nécessaires à l'apparition de la vie y soient réalisées.

Pour ce qui est de l'évolution, je lui vois deux directions, l'une horizontale, vers la diversité, et l'autre verticale, vers la complexité. Si la première est gouvernée en

* Prix Nobel de médecine et de physiologie en 1974. Associé étranger de l'Académie nationale de médecine.

majeure partie par la contingence, la seconde est soumise à des contraintes de diverses natures qui la canalisent et la forcent en quelque sorte à progresser dans la mesure où les conditions environnementales s'y prêtent. C'est pourquoi, contrairement à de nombreux évolutionnistes modernes, je crois que du moment où les premiers neurones sont apparus dans la lignée animale, il y a quelque six cent millions d'années, une complexification progressive du système nerveux allait nécessairement se produire pour autant que les circonstances le permissent. Je suis d'ailleurs tenté de croire que cette évolution n'est pas terminée. Je tiens à souligner que ma conception n'invoque d'aucune manière l'intervention d'un quelconque « principe directeur ». Elle est parfaitement conforme à la théorie néodarwinienne et aux données de la biologie moléculaire modernes, sur lesquelles elle se fonde entièrement. Elle met simplement l'accent sur certains facteurs. Bien entendu, les opinions que je défends me sont personnelles. Je comprendrais parfaitement que de nombreux spécialistes ne soient pas convaincus par mes arguments.

Avec mes sentiments renouvelés de gratitude pour m'avoir accueilli dans votre prestigieuse assemblée, je vous remercie de m'avoir donné cette occasion d'y prendre la parole.

— **Maurice Cara présente :**

- **Glossaire médico-pharmaceutique Anglais-Français**. François Claustre et coll. — Pharmacothèmes Ed. Paris, 2000, 1 vol., 88 p.

  Ce petit glossaire Anglais-Français traduit dans notre langue près de 12 000 termes, expressions et acronymes de biologie, biotechnique, biophysique, biochimie et pharmacologie. Ce travail a été accompli sous l'impulsion de notre confrère Pierre Delaveau, au sein de la Commission du Langage présidée par M.Clostre, à l'Académie nationale de Pharmacie.

  En effet, les pharmaciens ont à faire face à des textes inter-Etats rédigés dans un français approximatif et truffés de mots anglo-américains, qui est utilisé dans les rapports officiels, notamment ceux d'Autorisation de Mise sur le Marché des Médicaments (AMM).

  Etant donné le polysémisme de l'anglais et la rédaction trop souvent absconse des textes officiels, les difficultés de traduction sont grandes et les contresens faciles : ce glossaire vient compléter très utilement les dictionnaires classiques qui font peu de place aux termes techniques et, ne pouvant suivre les publications scientifiques, négligent forcément les expressions nouvelles qui utilisent des mots avec un sens différent de celui de l'anglais courant.

  Il faut donc féliciter les rédacteurs de ce glossaire qui est un indispensable outil, pratique et peu onéreux. Il facilitera la lecture des textes médico-pharmaceutiques et évitera bien des erreurs d'interprétation. A ceux qui les rédigent en Anglais, il permettra aussi de contrôler leurs textes.

- **Répertoire des sérums de qualité en parasitologie** par Jean-Claude PETITHORY. — Union nationale des Polios de France Ed., 2000, 1 vol., 108 p.

  Le diagnostic sérologique des atteintes parasitaires devient de plus en plus important en médecine du fait de la fréquence accrue des maladies opportunistes qui compliquent les affections ou les traitements entraînant une immunodépression. Encore faut-il que ces diagnostics soient faits correctement. Aussi l'Agence du Médicament en a confié le contrôle de qualité au docteur Jean Claude Petithory, directeur de Laboratoire Lucien Brumpt à Gonesse : son répertoire des étalons et des sérums de qualité en parasitologie est à la base du Contrôle national de qualité dans ce domaine.

  Expert de l'OMS pour l'évaluation de l'étalon international de sérologie de la toxoplasmose, nul n'était mieux préparé que l'Auteur pour rédiger ce livre. Continuant les travaux de ses maîtres, nos regrettés confrères Georges Lavier, Henri Galliard et Lucien Brumpt, il nous transmet leur expérience. Depuis plus de vingt ans, il a perfectionné dans son laboratoire la technique des examens sérologiques, assuré la conservation des étalons et précisé les normes de fidélité des déterminations. C'est le résultat de ce travail ininterrompu qu'il offre aux laboratoires utilisateurs et à l'organisation du Contrôle de Qualité mise en œuvre par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire et des Produits de Santé.

  Cette Agence publie régulièrement les *Annales du Contrôle Nationale de Qualité*, dans lesquelles Jean-Claude Petithory est chargé de la parasitologie. Ces Annales sont versées à la Bibliothèque de l'Académie, qui recevra régulièrement les suivants. Ce Répertoire sera très utile pour les diagnostics de laboratoire des affections parasitaires. Il faut remercier l'Auteur d'y avoir résumé l'acquis de son expérience.

- **Annales du contrôle national de qualité** par Jean-Claude PETITHORY et coll. — Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (parasitologie, thyroïde, sérologie virale, hématologie-immunologie, blot VIH), juin 2000, *19*, 208 p.

BULLETIN DE L'ACADÉMIE NATIONALE DE MÉDECINE

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le Secrétaire perpétuel et le Secrétaire-adjoint, assistés d'un Comité de Lecture, sont responsables de la publication du *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*. Pour chacun des textes qui ont été acceptés et présentés, l'Académie prend en charge huit pages du Bulletin soit 26 500 caractères. Tout dépassement sera facturé à l'auteur à raison de 400 francs la page.

Le texte fourni en trois exemplaires sera structuré en paragraphes homogènes, en évitant le style télégraphique, l'abus des alinéas, les successions de mots ou de phrases précédées d'un tiret, une numérotation superflue des propositions. Les titres et sous-titres seront détachés. Les signes et abréviations seront explicités lors de leur première apparition dans le texte. Les molécules (médicaments ou non) apparaîtront sous leur dénomination commune internationale.

Les communications seront rédigées suivant la norme scientifique en chapitres distincts : introduction, malades et méthodes, résultats, discussion. Pour les lectures, l'agencement des paragraphes doit faire apparaître la structure de l'exposé et les étapes du raisonnement.

Le titre en français de l'article figurera sur une première page, avec le prénom et le nom des auteurs ainsi que leur adresse et le lieu où pourront être demandés les tirés-à-part. Le résumé français sera accompagné des mots-clés répertoriés à l'*Index Medicus*. Le titre en anglais et un résumé anglais plus détaillé que le résumé français seront joints.

L'iconographie sera limitée à 4 tableaux ou documents photographiques. Chacun portera au dos un numéro et une indication de positionnement. Les légendes seront rédigées sur une feuille indépendante, numérotées suivant leur ordre dans le texte. Les diapositives seront tirées sur papier.

La bibliographie sera classée suivant l'ordre d'apparition dans le texte.

La version définitive devra être transmise par e-mail ou par voie postale, accompagnée d'une disquette. La correction des épreuves sera exclusivement d'ordre typographique. Toute modification du texte initial sera facturée à l'auteur.

Trente tirés-à-part seront fournis gratuitement. Des tirés-à-part supplémentaires peuvent être exécutés aux frais des auteurs.

Avant d'entreprendre la rédaction de leur texte, les auteurs sont invités
à se procurer les « Consignes détaillées », à l'adresse ci-dessous

Secrétariat de l'Académie nationale de médecine
16, rue Bonaparte
75272 Paris Cedex 06
Tél : 01.42.34.57.73 — Fax : 01.40.46.87.55
Email : yvette.lahouati@acadmed.univ-paris5.fr

Bulletin de l'Académie nationale de médecine

TARIFS D'ABONNEMENT 2001 (9 numéros par an)	
France :	**850 F (129,58 Euros)**
Autres pays :	**900 F (137,20 Euros)**
Membres ANM :	**700 F (106,71 Euros)**
Institutionnels France	**1250 F (190,56 Euros)**
Autres pays :	**1325 F (201,99 Euros)**

Les abonnements partent du premier numéro de l'année

The subscription begin with the first issue of calendar year

Mme, Mlle, M. (rayer les mentions inutiles)

Nom | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Prénom | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Adresse | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

code Postal | | | | | |

Ville | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Pays | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

A retourner ou à faxer à
ÉDITIONS SCIENTIFIQUES ET MÉDICALES ELSEVIER
23, rue Linois, 75724 Paris Cedex 15 - France
Service abonnements/Subscription department
Tél : (33) 1 71 72 46 46 - Fax : (33) 1 71 72 46 64
E-mail : abt2@elsevier.fr

Veuillez trouver ci-joint mon chèque d'un montant de.. à l'ordre des Editions Elsevier

Veuillez débiter ma carte de crédit (CB, MasterCard, EuroCard ou Visa) pour un montant de..

N° | | | | | | | | | | | | | | | |

Expire fin | | | | | | | | | | | |

Signature :

☐ Je souhaite recevoir une facture acquittée

Numéros séparés de l'année et volumes antérieurs : 120 F ou 18,29 Euros
Back issue and volume

Conformément à l'article 27 de la loi informatique et Libertés, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification des données vous concernant.
Sauf opposition de votre part, ces informations pourront être utilisées par des tiers.

Printed in France *Le Directeur de la publication* M. Louis AUQUIER.

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés réservés pour tous pays.

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective », et d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinée 1er de l'article 40).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal.

© 2001, Académie de Médecine, Paris

Imprimé par l'Imprimerie F. Paillart
86, chaussée Marcadé 80100 Abbeville
Académie de Médecine, éditeur, Paris — Dépôt légal 2ème trimestre 2001 — No 0190.
commission paritaire no 787 AD