



Original Paper

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Impact de la arginine sur le stress oxydatif dans le traitement de la fièvre typhoïde

N.M. DJIBRIL^{1*}, E. S. ATTAKPA², U.C.KASSEHIN³ et F.A.GBAGUIDI^{3,4}

¹ Unité de Pharmacologie, Département des Sciences fondamentales et biologiques, Faculté des Sciences de la Santé 01 BP 188 ; Université d'Abomey Calavi (UAC) Cotonou (Rép. Du Bénin)

² Laboratoire de Biomembranes et de Signalisation Cellulaire, Département de Physiologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques 01 BP 4521 Université d'Abomey Calavi Cotonou (Rép. du Bénin)

³ Laboratoire de Chimie pharmaceutique et Organique, UFR de Pharmacie, Faculté des Sciences de Santé Université d'Abomey Calavi

⁴ Département de Chimie Organique, Faculté des sciences Techniques (FAST), Université d'Abomey Calavi

*Corresponding Author: E-mail: nadjim9497@yahoo.fr; Tel.00229-96583346/ 94119221

RESUME

De nos jours, la fièvre typhoïde est un problème de santé Publique. Causée par la *Salmonella typhimurium*, bactérie gram-négative, flagellée, non sporulée et anaérobie qui fermente le glucose et réduit les nitrates en nitrites. L'oxyde nitrique ou le monoxyde d'azote (NO) réagit avec différents radicaux libres jouant ainsi une médiation dans les activités antimicrobiennes de large spectre des espèces réactives azotées (RNS) et des espèces réactives oxygénées (ROS). Les Céphalosporines et les fluoroquinolones de troisième génération tel que la ciprofloxacine (Cip) se sont révélés efficaces dans le traitement de cas de *salmonellose* (Manchanda et al. 2006). La combinaison de la L- arginine, précurseur du NO et la ciprofloxacine a été utilisée dans notre expérience pour traiter une salmonellose induite sur des souris. L'hydroperoxyde lipidique qui peut se décomposer en de radicaux : peroxydés et alcoxylés, conduisant à la production de nombreux produits carbonylés tels que le malondialdéhyde (MDA). Des Souris albinos de poids de 25-30 g, de 6-8 semaines d'âge et des bactéries *Salmonella typhimurium* ont été utilisées. La peroxydation lipidique (LPO) a été évaluée par l'estimation du taux de MDA formé par mg de protéines grâce à la méthode modifiée d'Utley et al (1967). Le traitement avec la L-arginine, la Ciprofloxacine et de leur combinaison protège partiellement le foie contre un endommagement induite par l'infection.

© 2014 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: oxyde nitrique(NO), le malondialdéhyde(MDA), la peroxydation lipidique(LPO).

INTRODUCTION

Les infections à *salmonelles* regroupent diverses maladies allant de la simple gastro-entérite aux formes plus graves telles que la fièvre typhoïde. Avec une incidence annuelle de 21 millions de cas dont

1-4% de cas fatales (Ochiai RL, Acosta CJ et al, 2008), la fièvre typhoïde est aujourd'hui un problème de santé publique.

Chez la souris, les *salmonelles* provoquent une maladie systémique accompagnée de symptômes semblables à

© 2014 International Formulae Group. All rights reserved.

ceux de la fièvre typhoïde chez l'homme et ce, indépendamment de la voie d'infection. (Danielle Malo 2004).

Le monoxyde d'azote (NO) a une fonction capitale dans le maintien de l'homéostasie vasculaire, mais joue un rôle très important dans la défense antimicrobienne, notamment en supprimant la synthèse d'ADN et la synthèse protéique du pathogène, et en inhibant la fonction mitochondriale et celle de l'apoptose chez l'hôte (Nussler AK and Billiar TR 1993)

Le NO est une molécule diffuse des radicaux libres des effecteurs dans divers systèmes biologiques et est un élément important de l'immunité innée (Bouton C. et al, 2011).

Il est connu par sa réaction avec les radicaux superoxydes pour former la peroxydation lipidique, un plus puissant agent oxydant (Haque, 2011). Comme telle, il joue un rôle important d'agent antimicrobien efficace contre les pathogènes intracellulaires (Geesin JG, Gordon JS et al. 1990).

Par contre, *Salmonella* a la capacité de développer un moyen d'inhiber la fusion vésiculaire (Uchiya K, Barbieri MA, Funato K et al 1999) mais également de délocaliser la NADPH oxydase (Vasquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J et al. 2000) et la NOS₂ (Chakravorty D, Hasen-Wester et al 2002), avec pour effet de détourner le pouvoir bactéricide du NO.

L'infection expérimentale des souris à la *Salmonella typhimurium* donne lieu à une maladie similaire à la fièvre typhoïde humaine (Danielle Malo, 2004).

Le stress Oxydatif résulte de la réaction métabolique, il est défini comme une perturbation dans l'état d'équilibre d'un système **pro-oxydant / antioxydant** dans les cellules seines. Il est impliqué dans les événements pathologiques tels que l'infection à la *S.typhimurium* par un nombre croissant de faits. Cependant, les cellules ont de multiples mécanismes de protection contre le stress oxydatif. (Kessler M., Ubeau G. et al. 2002).

Les lipides sont une cible privilégiée des radicaux libres qui provoquent l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des phospholipides membranaires. Le phénomène d'auto-oxydation ou peroxydation lipidique consiste en l'attaque par un radical libre, d'origine exogène ou endogène, de dérivés lipidiques.

La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète. La réaction en chaîne prolonge les effets intra membranaires des radicaux libres, même si l'agression radicalaire s'estompe. La peroxydation lipidique aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques : les hydro peroxydes et leurs dérivés. Les hydro peroxydes lipidiques sont relativement stables; en présence de fer, ils sont transformés en radicaux alkoxyles. Parmi les quelles, le malondialdéhyde (MDA) qui a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et diffuse facilement (Hadi, 2004).

La diminution du taux de MDA par certaines substances indique le rôle d'antioxydant de ces dernières. L'objectif principal de notre étude était d'élucider le rôle du NO en tant qu'antioxydant à travers le traitement d'une infection à la *salmonellose* induite expérimentalement sur des souris par la L-arginine, précurseur du NO et sa combinaison avec la ciprofloxacine.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Des Souris albinos de poids compris entre 25-30 g et âgés de 6-8 semaines, ont été utilisées. Ces animaux ont été gardés dans des cages de polypropylène à une température ambiante de 22°C-25 ° C. Avant les expériences, les animaux ont été soumis à une acclimatation pendant une semaine dans un cycle contrôlé de lumière - obscurité (14/10 h). Pendant l'acclimatation, ces derniers

recevaient une alimentation standard de laboratoire et de l'eau ad libitum. Les études ont été menées conformément aux lignes directrices du Comité d'Ethique Béninois de Contrôle et de Surveillance sur l'utilisation des animaux pour la recherche scientifique.

Les bactéries

Dans cette expérience, *Salmonella typhimurium* (source sauvage) a été utilisée et administrés au souris par voie intra péritonéale. Cette souche bactérienne a été offerte et confirmée par le département de microbiologie de l'Université d'Abomey Calavi.

Répartition et posologie du traitement

La L arginine et la ciprofloxacine ont été utilisés comme médicaments de traitement et administrés par voie orale. Ainsi les animaux ont été subdivisés en six (6) groupes de six (6) animaux chacun et traités comme indiqué dans le **tableau 1**.

Les effets de ces médicaments sur ces souris infectées ont été analysés.

- Le premier groupe a été considéré comme groupe témoin négatif ne recevant que du sérum physiologique.
- Le second groupe a été considéré comme témoin positif à qui on applique une sous dose létale de *S. typhimurium* (0.6xLD50) avec une solution physiologique.
- Le troisième groupe lui, reçoit une sous dose létale de *S. typhimurium* et traité avec une dose complète de la Ciprofloxacine (400mg /kg de poids).
- Le quatrième groupe a été infecté avec une dose sous létale de *S. typhimurium* et ensuite traité avec une dose complète de l'arginine seule (100mg/kg de poids).
- Les groupes :cinq (5) et six(6) sont composés par des animaux infectés avec *S. Typhimurium*, puis traités respectivement par une demi- dose et un

quart de dose de la L arginine, combiné à une demi-dose de Ciprofloxacine chacune.

Estimation de la peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation des lipides a été estimée par l'évolution de la teneur en malondialdéhyde (MDA). Cette estimation de la peroxydation lipidique a été faite selon la méthode modifiée d'Utley et al (1967) :

L'Homogénat de foie (1.0 ml) a été introduit dans un flacon en verre de 20 ml et incubé à 37 ± 1 ° C. Un autre prélèvement de 1,0 ml a été introduit à la pipette dans une centrifugeuse, placés à 0 ° C et marqué comme étant une incubation à l'heure T₀. Après une heure d'incubation : 1.0 ml de TCA (Acide thiocyanique) à 5% et 1.0 ml de TBA (acide thiobarbiturique) à 0,67% ont été ajoutés dans les deux échantillons (à savoir : l'échantillon incubé à 0 ° C et celui incubé à 37 ° C). Le mélange réactionnel du flacon a été transféré dans le tube et centrifugé à 1500 x RPM pendant 15 minutes. Le surnageant a été transvasé dans un autre tube et placé dans un bain d'eau bouillante pendant 10 minutes. Par la suite, les tubes à essai ont été refroidis et les absorbances ont été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 535 nm. La peroxydation lipidique (LPO) a été exprimée par le taux (en nmol) de malondialdéhyde (MDA) formée / heure / mg de protéine.

RESULTATS

Après être exposées à l'infection au *S. typhimurium* (0.6xLD50) sept jours, les souris ont

subi un traitement par administration des médicaments le 8^e et le 11^e jour comme indiqué **au tableau**, et le taux (nmol/mg de protéine) de production du malondialdéhyde

(MDA) a été mesurée comme un indicateur de la LPO.

Les résultats ont été résumés dans les figures : 1 et 2. L'infection à la *S. typhimurium* a induit de manière significative la peroxydation lipidique le 8^e et le 11^e jour comme l'indique les taux de MDA par rapport aux souris témoins (18,36% et 20,75%) Fig.3. Après le traitement avec la L-arginine, la ciprofloxacine ou leur combinaison, on a observé : -le 8^e jour que les

niveaux de LPO sont diminués de 2,4%, 4,08%, 14,28% et 2,4 % -Le 11^e jours que les niveaux du LPO sont diminués de 9,43%, 18,86%, 15,08% et 9,43%. Il en convient donc que, le traitement avec la L-arginine, la Ciprofloxacine ou de leur combinaison partiellement protège le foie contre un endommagement suite à l'infection, et qu'à la dose (B + ½ Arg. + ½ Cip), une certaine reprise de la peroxydation lipidique a été observée ce 11^e jour.

Tableau 1 : Calendrier du traitement

Groupes	Traitements	Abréviations
Groupe1 : Contrôle Négatif (Sérum physiologique)		Sp
Groupe2 : Contrôle Positif (<i>S. typhimurium</i> (0.6xLD50) + Sérum		S.typhi + Sp
Groupe3 : <i>S. typhimurium</i> (0.6xLD50) + Ciprofloxacine (400 mg/ kg de poids)		S.typhi + Cipro
Groupe4 : <i>S. typhimurium</i> (0.6xLD50) + Arginine (1000 mg/kg de poids)		S.typhi + Arg
Groupe5 : <i>S. typhimurium</i> (0.6xLD50) + Arginine (500 mg/ kg de poids) + Ciprofloxacine (200 mg/ kg de poids)		S.typhi + ½ Arg + ½ Cipro
Groupe6 : <i>S. typhimurium</i> (0.6xLD50) + Arginine (250 mg/ kg de poids) + Ciprofloxacine (200 mg/kg de poids)		S.typhi + ¼ Arg + ½ Cipro

La LD₅₀ est la demi-dose létale des germes pathogènes et 0,6xLD₅₀ donne la dose létale complète.

Groupe1 : Sérum physiologique ne contenant pas de germes pathologiques (contrôle négatif)

Groupe 2 : 0,6xLD₅₀ (unité de dose létale) de *S. Typhimurium* + le sérum (contrôle positif)

Groupe 3 : Combinaison de la dose létale de *S Typhimurium* et de la dose complète de la Ciprofloxacine (400mg/kg de poids)

Groupe 4 : Combinaison de la dose létale de *S. Typhimurium* et de la dose complète de la L arginine (1000mg/kg de poids)

Groupe 5 : Combinaison de la dose létale de *S.typhimurium* et des demi-doses de la L arginine (500 mg/kg de poids) et de la Ciprofloxacine (200mg/kg de poids)

Groupe 6 : Combinaison de la dose létale de *S.typhomurium* et d'un quart de doses de la L arginine (250 mg/kg de poids) et d'une demi-dose de la Ciprofloxacine (200mg/kg de poids)

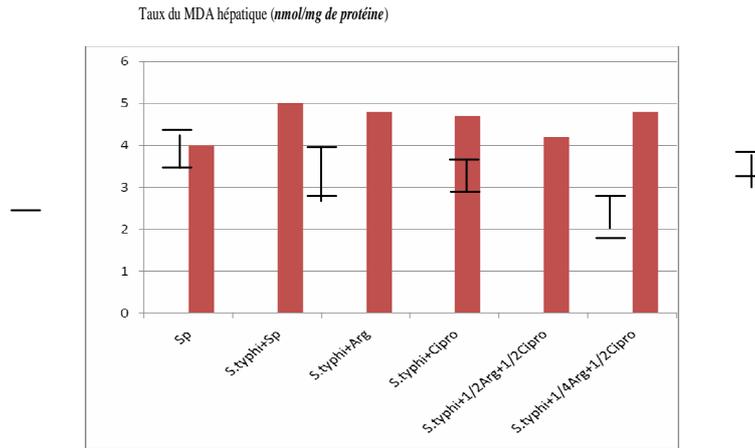


Figure 1 : Taux du MDA hépatique (nmol/mg de protéine) le 8^e jour

Mesure du taux du MDA hépatique, les médicaments ont été administrés le 8^{ème} jour

Sp : Sérum physiologique ne contenant pas de germes pathologiques (contrôle négatif)

S.typhi +Sp : 0,6xLD₅₀ (unité de dose létale) de *S.Typhimurium* + le sérum (contrôle positif)

S.typhi +Arg.: Combinaison de la dose létale de *S Typhimurium* et la dose complète de la Ciprofloxacine (400mg/kg de poids)

S.typhi +Cipro : Combinaison de la dose létale de *S. Typhimurium* et la dose complète de la L arginine (1000mg/kg de poids)

S.typhi +1/2arg+1/2cipro : Combinaison de la dose létale de *S. typhimurium* et de 500 mg/kg de poids de la L arginine et de 200mg/kg de poids de la Ciprofloxacine

S.typhi +1/4arg+1/2cipro : Combinaison de la dose létale de *S. typhimurium* ; de 250 mg/kg de poids de la L arginine et de 200mg/kg de poids de la Ciprofloxacine

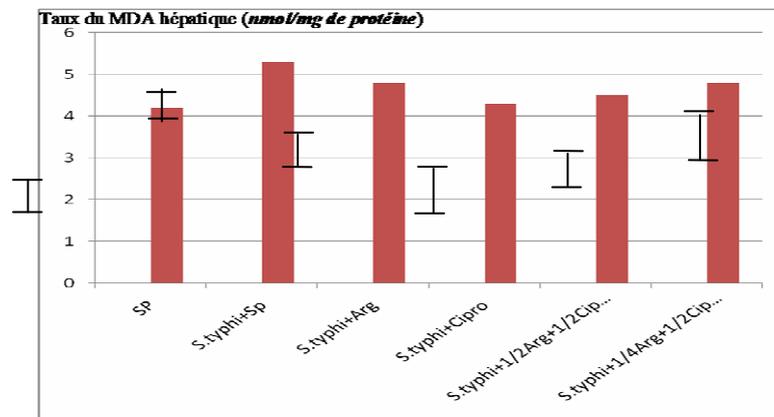


Figure 2 : Taux du MDA hépatique (nmol/mg de protéine) mesuré le 11^e jour

Mesure du taux du MDA hépatique, les médicaments ont été administrés le 11^{ème} jour

Sp : Sérum physiologique ne contenant pas de germes pathologiques (contrôle négatif)

S.typhi +Sp : 0,6xLD₅₀ (unité de dose létale) de *S.Typhimurium* + le sérum (contrôle positif)

S.typhi +arg : Combinaison de la dose létale de *S Typhimurium* et la dose complète de la Ciprofloxacine (400mg/kg de poids)

S.typhi + Cipro : Combinaison de la dose létale de *S. Typhimurium* et la dose complète de la L arginine (1000mg/kg de poids)

S.typhi +1/2arg+1/2cipro : Combinaison : de la dose létale de *S. typhimurium* ; de 500 mg/kg de poids de la L arginine et de 200mg/kg de poids de la Ciprofloxacine

S.typhi +1/4arg+1/2cipro : Combinaison de la dose létale de *S. typhimurium* ; de 250 mg/kg de poids de la L arginine et de 200mg/kg de poids de la Ciprofloxacine

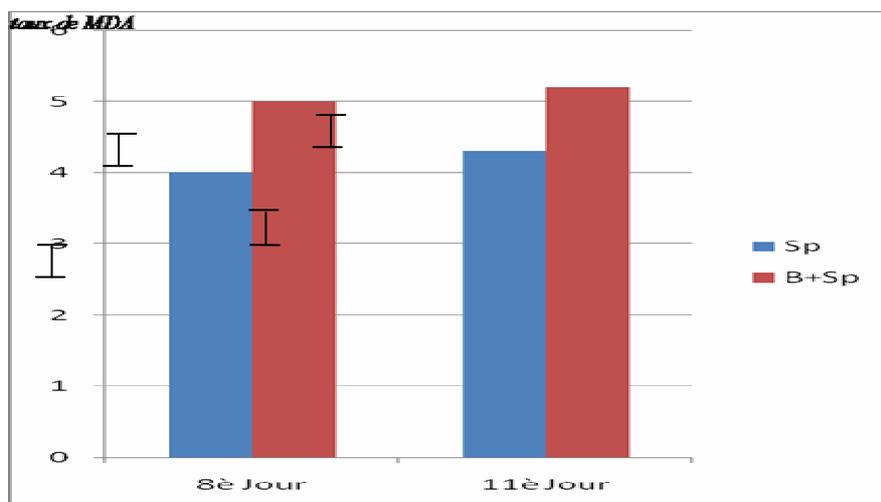


Figure 3 : Infection induit significativement la peroxydation indiquée par la mise en valeur du taux de MDA par rapport aux souris control négatif

Sp : Sérum physiologique ne contenant pas de germes pathologiques (Contrôle négatif) **B**
 +Sp : 0,6xLD50 (unité de dose létale) de *S.Typhimurium* + le sérum physiologique (contrôle positif)

DISCUSSION

L'infection à la *S. typhimurium* a : le 8^e et le 11^e jour a induit avant le traitement et d'une manière significative la peroxydation lipidique comme on peut le constater sur la **fig.3** comparativement aux souris témoins et cela par une élévation du taux de MDA de 18,36% le 8^e jour et de 20,75% le 11^e jour.

Etant donné que La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète ; les élévations du taux de MDA observée les deux jours ne seraient autre la formation des dérivées toxiques issues de la peroxydation lipidique due à l'infection à la *salmonellose*. Après application de la L arginine, de la ciprofloxacine ou leur combinaison en différentes proportions pour le traitement suite à l'infection, les niveaux de LPO exprimés par les taux de MDA prélevés sont les suivants :

- le 8^e jour : les niveaux de LPO chez les souris ont diminué de 2,4%, 4,08%, 14,28% et 2,4 %
- Le 11^e jour : les niveaux du LPO sont diminués de 9,43%, 18,86%, 15,08% et 9,43%.

Toutes ces diminutions constatées sont comparativement aux niveaux de LPO des souris du control positif.

Le Malondialdéhyde (MDA) est l'aldéhyde de réaction majeur résultant de la peroxydation de la membrane biologique (Vaca et al. 1988) ; L'élévation de peroxydation lipidique chez les souris infectées par le *S.typhimurium* observée dans cette étude indique l'endommagement des cellules hépatiques ce qui est en corrélation avec le changement des taux d'enzymes sérique.

Ils existent des études qui confirment l'hypothèse attestant que l'une des différentes causes de l'endommagement hépatiques induite par une infection à la *salmonellose* est la peroxydation lipidique membranaire par génération des dérivées de radicaux libres

(Recknagel et al. 1991). Ainsi l'élévation du taux de MDA observé chez les souris de contrôle positif le 8^e et le 11^e jour de l'ordre de : 18,37% et 20,75% confère à cet hypothèse. (fig.3).

Dans nos études, les résultats montrent une diminution du taux de MDA après application de la L arginine, la Ciprofloxacine ou leur combinaison de l'ordre de : 2,4%, 4,08%, 14,28% et 2,4 % le 8^e jour (Fig.1) et de 9,43%, 18,86%, 15,08% le 11^e jour (fig.2) ceci confirme que la L arginine, la ciprofloxacine et la combinaison : *S.typhi* +1/2 l- arg. +1/2cip inhibe la peroxydation lipidique par conséquent protège partiellement les cellules d'un endommagement causé par l'infection à la salmonellose (Haque SS 2011).

Le traitement par la L-arginine a été en mesure de réduire le taux de malondialdéhyde par conséquent la peroxydation lipidique. C'est la preuve que le traitement par la L-arginine peut neutraliser la peroxydation lipidique et réduire ainsi les complications (Lubec B, Hayn M et al, 1997)

A la dose de : *S.typhi* +1/4 arg. + 1/2 Cip on a assisté à une reprise de la peroxydation lipidique par une légère hausse du taux de MDA.

Le NO peut à la fois promouvoir et inhiber les radicaux dépendants de la peroxydation lipidique et obtenir de nouveaux dérivés azotés de lipides oxydés (Hogg and Kalyanaraman 1999). Cependant, plusieurs études ont montré que le NO est un puissant inhibiteur de la réaction de propagation (Riemersma RA, Carruthers KF et al, 2000).

Conclusion

L'observation de l'augmentation de la peroxydation lipidique chez des souris infectées par *S. typhimurium* dans la présente étude présentent un endommagement des hépatocytes dues à la peroxydation des lipides membranaires par la génération de dérivés de radicaux libres (Utlely HC, Bernheim F et al. 1997).

L'observation de la diminution du taux de MDA hépatique exprimant une diminution

de la peroxydation lipidique chez des souris des autres groupes de souris dans cette étude confirme l'hypothèse par laquelle : les substances utilisées (l- arginine et la ciprofloxacine) ont montré leur capacité de prévenir l'élévation du taux du MDA induite par *S. typhimurium*, ce qui suggère et confirme le rôle d'antioxydant du NO à travers l'effet induite par son précurseur : la L argine. Par contre La reprise de l'élévation du taux du MDA le 11^e jour pour la combinaison (B + 1/2 Arg. +1/2 Cip) nécessite d'être élucidé par d'autres études. Compte tenu de ces résultats, la compréhension du rôle de la L-arginine: précurseur du NO dans l'infection et sa modulation peut devenir une option thérapeutique valable dans l'avenir.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre profonde gratitude au Pr. Fernand A. Gbaguidi à la Faculté des Sciences Techniques de l'UAC du Bénin pour son implication dans ce travail et pour ses conseils, avec l'aide de son doctorant M. Urbain Kassehin à qui nous adressons nos sincères remerciements.

REFERENCES

- Chakravorty D, Hasen-Waster I, Hensel M. 2002
- Salmonella Pathogenecity Island 2 mediate protection of intracellular salmonella from reactive nitrogen intermediates. J exp Med 195:1115-66
- Danielle Malo 2004
- Medicine sciences 20 (12):1119-24
- Geesin JG, Gordon JS, Berg RA. 1990.
- Retinoids affect collagen synthesis through inhibition of ascorbate induced lipid peroxidation in cultured human dermal fibroblast.
- Arch Biochem Biphys. 278: 352-355.
- Milane H 2004
- La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. PhD thesis, Université Louis Pasteur, STRASBOURG p :18

- Haque SS. 2011. Formulation of nitric oxide donors and antibiotic against typhoid. *J Med Genet Genom.* 3 (3): 50–55.
- Hogg N, Kalyanaraman B. 1999. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1411: 378–384.
- Kessler M., Ubeau G., L.Jung.2002 Anti-and pro-oxydant activity of rutine and quercetin derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* **55: 1-11**
- Lubec B, Hayn M, Kitzmuller E, Vierhapper H, Lubec G. 1997 *L*-Arginine reduces lipid peroxidation in patients with diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med.* 22: 355–360
- Nussler K, Billiar TR 1993 Inflammation, immunoregulation and inductible nitric oxid synthase *J Leuk Biol.* 24: 171-178.
- Ochiai RL, Acosta CJ, Danovaro-Holliday MC. 2008 A study of typhoid fever in five Asian countries: disease burden and implications for control. *Bulletin of WHO* 86(4):241–320.
- Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL. 1991. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther.* 43:139–154.
- Riemersma RA, Carruthers KF, Elton RA, Fox KA. 2000. Vitamin-C and the risk of acute myocardial infarction. *Am J Clin Nutr.*179: 1181–1186.
- Uchiya K, Barbieri M A, Funato K .1999 Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking *EMBO J* 18: 3924-3933
- Utley HC, Bernheim F, Hachstein P. 1967. Effect of sulfhydryl reagent on peroxidation in microsome. *Arch Biochem Biophys.*260:521–531.
- Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M (1988). Studies on lipid peroxidation in rat liver nuclei and isolated nuclear membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 19; 958(3): 375-387.
- Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J. 2000 *Science* 287: 1655-8