

## Place du test de la sueur dans le diagnostic phénotypique de la mucoviscidose en Tunisie

S. HADJ FREDJ,  
A. BIBI,  
T. MESSAOUD,  
S. FATTOUM

**Résumé :** La mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas est la maladie génétique autosomique récessive la plus fréquente chez les populations caucasiennes. Le diagnostic de cette pathologie est essentiellement suggéré par une symptomatologie clinique évocatrice (respiratoire et digestive) et une concentration élevée de chlorures dans la sueur déterminée par un test de la sueur. Dans le présent travail, nous rapportons d'étudier la place du test de la sueur dans le diagnostic phénotypique de la mucoviscidose.

Notre étude a porté sur 1255 enfants tunisiens suspects de la mucoviscidose qui ont bénéficié au moins d'un test de la sueur selon la méthode de l'Exsudose avec stimulation à la pilocarpine. 47 malades ont eu un test de la sueur positif dont les valeurs sont comprises entre 61 et 168 mmol/l avec une moyenne de 97,9 mmol/l  $\pm$  26,32. Le test de la sueur est une technique simple et rapide permettant de distinguer entre les sujets indemnes et mucoviscidosiques. En effet, il permet un dépistage de la mucoviscidose dès les premiers mois de vie.

**Mots clés :** Mucoviscidose, test de la sueur, diagnostic phénotypique et moléculaire.

**Abstract :** The cystic fibrosis is the most common autosomal recessive disease in the Caucasian population. In the last few years, many cases have been reported in Tunisia. The diagnosis of this pathology is based on clinical symptomatology (respiratory and digestive) and a high chloride concentration in sweat.

In this study, we report the contribution of the sweat test in the phenotypical diagnosis of the cystic fibrosis.

1255 Tunisian children suspected carrying cystic fibrosis were explored by at least from a sweat test according to the method of Exsudose with pilocarpine stimulation. Among the tested cases, 47 patients have presented a positive sweat test ranging from 61 and 168 mmol/l with an average of 97,9 mmol/l  $\pm$  26,32. These results were confirmed by molecular biology approach. The sweat test is so a simple and fast technique allowing to distinguish between healthy and cystic fibrosis subjects. It allows a screening of the cystic fibrosis since the first months of life.

**Keys words :** Cystic fibrosis, sweat test, phenotypic and molecular diagnosis

Laboratoire de biochimie.  
Hôpital d'enfants de Tunis.

### Introduction

La mucoviscidose est la maladie héréditaire autosomique récessive la plus fréquente chez les populations caucasiennes. Les manifestations cliniques associent le plus souvent une atteinte respiratoire, qui conditionne le pronostic de la maladie, et une atteinte digestive caractérisée par des diarrhées chroniques.

Le gène responsable de cette pathologie a été séquencé en 1989 [4], il est composé de 27 exons et code pour une protéine transmembranaire appelée CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), dont la principale fonction est un canal chlore [1].

Une mutation au niveau du gène CFTR entraîne un défaut du transport des chlorures à travers la membrane

apicale des cellules épithéliales.

Le diagnostic de la mucoviscidose est essentiellement suggéré par des symptômes cliniques évocateurs de la maladie et confirmé par la suite par la mise en évidence des mutations au niveau du gène CFTR. Néanmoins, le recours aux différents tests biologiques devient nécessaire pour orienter le diagnostic de cette pathologie tels que le dosage de la trypsine immuno-réactive, la différence de potentiel transépithélial nasal et le test de sueur. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés dans le présent travail à étudier la place du test de la sueur dans le diagnostic phénotypique de la mucoviscidose.

## Matériel et méthodes

### Matériel

Notre étude a porté sur 1255 enfants provenant de différents services cliniques des hôpitaux de la Tunisie sur une période allant de 2001 à 2006.

L'âge de ces enfants varie entre 1 mois et 15 ans. Le tableau clinique a été dominé surtout par des bronchites à répétition et une insuffisance pancréatique responsable d'une diarrhée chronique avec des selles volumineuses et graisseuses. Tous les enfants suspects ont bénéficié au moins d'un test de la sueur selon la méthode de l'Exsudose (stimulation à la pilocarpine).

### Méthodes

Le test de la sueur selon la technique de l'Exsudose comporte trois étapes :

- Stimulation de la sudation par iontophorèse à la pilocarpine obtenue à l'aide d'un stimulateur microstim® appliqué sur l'avant bras du patient. La durée de la stimulation est de 15 minutes.
- Recueil de la sueur réalisé par l'exsupatch®, dispositif à usage unique favorisant la sudation, placé sur la zone stimulée par la pilocarpine. L'ensemble est recouvert d'une bande de parafilm et laissé en place pendant 15 minutes.
- Dosage des ions chlorures dans la sueur directement sur la peau à l'aide d'une électrode spécifique étalonnée sur trois points (solution 20, 60 et 100 mmol/l fournies avec le système).

## Résultats

Chez les mucoviscidosiques, les glandes sudoripares responsables de la production de la sueur augmentent leur sécrétion en ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  ce qui donne à la sueur un fort goût salé.

La distinction des malades ayant une mucoviscidose et les sujets indemnes est déterminée par la valeur de la concentration en ions chlorures mesurés par le test de la sueur. En effet, les valeurs normales du test se situent au dessous de 40 mmol/l de chlorures, entre 40 et 60 mmol/l, le diagnostic est douteux et doit être répété étant donné les conséquences thérapeutiques et psychologiques mises en jeu. Le test est pathologique au delà de 60 mmol/l, deux tests positifs sont nécessaires pour affirmer le résultat.

Sur les 1285 tests de la sueur réalisés chez 1255 enfants étudiés, 47 ont eu un test de la sueur positif dont les valeurs sont comprises entre 61 et 168 mmol/l avec une moyenne de  $97,9 \text{ mmol/l} \pm 26,32$ .

L'âge de ces patients varie de 1 mois à 15 ans, la majorité a été diagnostiquée avant l'âge de 1 an (Tableau I).

**Tableau I : Répartition des malades selon l'âge**

Age	Nombre de cas
1 mois-1 an	34
1 an-3ans	7
3ans-5 ans	3
5 ans-7 ans	1
7 ans-15 ans	2

Le test de la sueur ne doit pas être pratiqué chez les nouveaux nés avant l'âge d'un mois puisqu'il est très difficile d'obtenir un poids de sueur acceptable pendant les quatre semaines de vie.

La majorité des patients ont présenté des concentrations en chlorures entre 80 et 100 mmol/l (20 cas) (Tableau II). Le test de la sueur a été répété au moins deux fois pour la majorité des cas pour confirmer le diagnostic positif de la mucoviscidose (Tableau III). Néanmoins, on n'a pas pu réaliser le test qu'une seule fois chez certains enfants pour des raisons cliniques, économiques et géographiques. Alors que quatre enfants ont bénéficié de trois tests de la sueur à cause des valeurs douteuses trouvées au cours des deux premiers tests.

L'état clinique du malade doit être pris en considération

**Tableau II : Répartition des malades selon la concentration des chlorures**

Concentration des chlorures (mmol/l)	Nombre des cas
60-80	9
80-100	20
100-120	9
120-140	7
140-160	0
160-180	2

**Tableau III : Nombre de tests de la sueur réalisés pour chaque malade**

Nombre de malades	Nombre de tests	Pourcentage %
8	1	17.02
35	2	74.47
4	3	8.51

puisque diverses situations cliniques et traitements médicamenteux sont capables d'entraîner de façon permanente ou transitoire une élévation des ions chlorures dans la sueur [2, 10]. En effet, au cours de notre étude deux cas de faux positifs ont été observés, le premier patient présentait une déshydratation (65 mmol/l) et le second une pseudo-hypoparathyroïdie (120 mmol/l) qui a entraîné une élévation de la concentration du chlore sudoral due au traitement par le chlorure de calcium.

Pour confirmer les résultats du test de la sueur, une étude moléculaire antérieure a été pratiquée sur 46 sujets afin d'identifier les mutations dans le gène CFTR. Cette étude a permis de caractériser 5 types de mutations localisées dans différents exons du gène CFTR [6] (Tableau IV).

Une analyse moléculaire a été également pratiquée chez deux patients avec un test de la sueur négatif (< 40 mmol/l) avec une symptomatologie très évocatrice de la mucoviscidose. Cette étude nous a permis d'identifier la mutation F508del à l'état homozygote chez ces deux malades (Tableau V).

Au cours de notre étude, la sensibilité et la spécificité du test de sueur selon la méthode de l'Exsudose ont été mesurées. Elles présentaient respectivement 95.9% et 99.8%.

## Discussion

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies héréditaires sévères diminuant l'espérance de vie dans

**Tableau IV : Résultats de la biologie moléculaire**

Mutations	Nombre de malades
F508 del/F508 del	18
W1282X/W1282X	2
N1303K/N1303K	1
G542X/G542X	1
W1282X/N1303K	1
F508 del/N1303K	2
F508 del/NI	4
G542X/NI	1
F1166C/NI	1
Mutations non identifiées	15

**Tableau V : Les cas faux négatifs**

Malades	Age	Concentration des chlorures (mmol/l)	Biologie moléculaire
1 <sup>er</sup> cas	1 mois	37,2	F508del/F508del
2 <sup>ème</sup> cas	3 mois	35	F508del/F508del

les populations Nord européennes. En Tunisie, les premiers travaux ont été effectués en 1994 où 77 malades suspects cliniquement de mucoviscidose ont présenté un test de la sueur positif effectué selon la technique de Gibson et Cooke [3, 5]. Mais depuis 2001, une nouvelle technique a été mise au point dans notre laboratoire utilisant une électrode sélective basée sur l'iontophorèse à la pilocarpine «Technique de l'Exsudose» [8, 9]. C'est une technique simple et rapide permettant de distinguer les sujets indemnes et mucoviscidosiques. En effet, seules les concentrations supérieures à 60 mmol/l d'ions chlorures sont pathologiques. Deux ou trois tests concordants permettent d'affirmer le résultat. Cependant, c'est une approche qui n'est pas mise en œuvre dans la plupart des laboratoires à cause de son coût élevé.

Le résultat du test de la sueur est identique quelque soit le génotype, que l'enfant soit homozygote ou hétérozygote composite. En effet, il n'y a aucun rapport direct entre la concentration sudorale en chlorures et le degré de gravité de la maladie.

Malgré la fiabilité du test de la sueur, il peut présenter parfois des difficultés d'interprétation lorsque un résultat qui devrait être positif est négatif. Les causes de ces faux

négatifs peuvent être dues à une erreur technique (quantité insuffisante de sueur, erreur de manipulation), la présence d'œdèmes ou à un traitement par des minéralocorticoïdes...[7].

Dans ce cas, il faudra rechercher d'autres arguments cliniques et génétiques en faveur du diagnostic. Le diagnostic moléculaire est le complément nécessaire du test de la sueur qui présente le seul critère diagnostique objectif à l'heure actuelle. Il repose sur la recherche des mutations dans le gène CFTR grâce aux diverses techniques de biologie moléculaire disponibles telles que l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE), l'analyse de conformation de l'ADN simple brin (SSCP), le clivage chimique, la chromatographie liquide à haute pression en conditions dénaturantes (DHPLC) et le séquençage. L'identification de ces mutations mucoviscidiques est d'intérêt très important pour le diagnostic prénatal de cette pathologie fortement invalidante qui présente le seul moyen d'ordre préventif vu l'absence d'un traitement curatif.

Le diagnostic de la mucoviscidose s'appuie davantage sur différents tests biologiques tels que le dosage de la trypsine immuno-réactive dans le sang. Néanmoins, cette technique présente un fort pourcentage de faux positifs.

La mesure de la différence de potentiel transépithélial nasal peut être une aide au diagnostic dans les formes atypiques de la mucoviscidose associées à un test de la sueur normal. Cependant, il faut retenir qu'il s'agit d'un examen de technique difficile, parfois long et nécessitant un personnel entraîné.

C'est pourquoi, le test de la sueur comme étant une technique simple, spécifique et très sensible constitue le principal test biologique permettant d'orienter le diagnostic phénotypique de la mucoviscidose.

### Conclusion

La mucoviscidose est une affection rare dans notre pays sans être exceptionnelle. Elle est la conséquence du dysfonctionnement de la protéine CFTR, dont la principale fonction est un canal chlore. Quel que soit l'âge de révélation et les circonstances de découverte, la démarche du diagnostic phénotypique de cette pathologie est identique ; évoqué cliniquement, le diagnostic est confirmé par le test de la sueur, c'est encore aujourd'hui l'examen

le plus fiable pour dépister la maladie. Depuis sa première description il y'a plus de 50 ans, plusieurs techniques ont été développées dont la méthode de référence est celle de Gibson et Cooke utilisant une iontophorèse à la pilocarpine pour stimuler la sueur et la titrimétrie pour le dosage des chlorures. La méthode Exsudose plus récemment développée repose sur le même principe de stimulation en utilisant une électrode spécifique. Malgré les développements de la biologie moléculaire et la mise en place de dépistages anténataux et néonataux, le test de la sueur reste un examen précieux pour l'aide au diagnostic de la mucoviscidose.

### Bibliographie

- 1- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Sousa DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 1991; 253: 202-205.
- 2- Besnard M, Munck A, Navarro J. Baby with eczema and abnormal sweat test. *Lancet* 1996; 348:1737.
- 3- Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23: 545-9.
- 4- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of cystic fibrosis gene : genetic analysis. *Science* 1989; 245:1073-1080.
- 5- Messaoud T, Ghanem A, Abdelnabi M, Mongalgi MA, mucoviscidose en Tunisie. Guemira F, Elion J, Fattoum S. Eléments du diagnostic de la mucoviscidose. *Cahier technique de la biologie* 1994; 34: 5-7.
- 6- Messaoud T, Hadj Fredj S, Bibi A, Elion J, Férec C, Fattoum S: Epidémiologie moléculaire de la mucoviscidose en Tunisie. *Ann Biol Clin* 2005; 63 (6): 627-630.
- 7- Serment-Gaudelus I, Lenoir G, Berche P, Ricour C, Lacaille F, Bonnefont JP, Robert JJ, Ferroni A, Edelman A. Mucoviscidose : Physiopathologie, génétique, aspects cliniques et thérapeutiques. *Pédiatrie* 2002 ; 4-060-P : 23-46.
- 8- Marchand M, Jarreau C, Chauffert I, Garcia I, Asselin D, Thouvenot JP, Genest AF. Le test de la sueur. *Ann Biol Clin* 1998; 56 (2): 215-221.
- 9- Storni V, Claustres M, Chinnet T, Ravilly S. Diagnostic de la mucoviscidose. *Arch Pédiatr* 2001 ; 8 suppl 5 : 818-832.
- 10- Wang HC, Whelan MA, McGeady SJ, Yousef E. A 5-month-old boy with recurrent respiratory infections, failure to thrive, and borderline elevated sweat chloride levels. *Allergy Asthma Proc.* 2006 ; 27(3):285-288.