

Revue Tunisienne de Biologie Clinique

المجلة التونسية للبيولوجيا السريرية

N° 21 - Décembre 2008

SOMMAIRE

Editorial

- ✓ *Investigation moléculaire des maladies génétiques en Tunisie*

Rym Kefi-Ben Atig, Houyem Ouragini, Sonia Abdelhak

Revue générale

- ✓ *Maladie d'Alzheimer : les marqueurs biologiques du diagnostic précoce et différentiel*

Armand Perret-Liaudet

Articles originaux

- ✓ *Etude épidémiologique, étiologique et biochimique des immunoglobulinopathies monoclonales malignes. A propos de 76 cas.*

Z. Ouzzif, K. Doghmi, N. Messaoudi, F. Mahassin, S. Tellal, M. Derouiche, M. Naji

- ✓ *Antiphospholipid antibodies in 100 homozygous sickle cell patients (SSFA₂) in Abidjan, Côte d'Ivoire.*

D. Sawadogo, M. Yayo Ayé, D. Kouassi, E. Adjambri

- ✓ *Etude clinique et biologique de la lithiase urinaire de l'enfant dans le centre tunisien*

A. Alaya, M. Makki, M. Belguith, A. Nouri, M.F. Najjar

- ✓ *Place du test de la sueur dans le diagnostic phénotypique de la mucoviscidose en Tunisie*

S. Hadj Fredj, A. Bibi, T. Messaoud, S. Fattoum.

- ✓ *Mise au point et validation d'une technique de dosage du méthotrexate par chromatographie liquide haute performance*

N. Jebabli, A. Klouz, S. Trabelsi, H. Ben Abda, R. Ben Ali, M. Lakhali, C. Belkahia

- ✓ *Les infections du site opératoire sur matériel orthopédique chez l'adulte*

S. Besbes, S. Bouhdiba, M. Hached, A. Ben Ghanem, M. Douik

Informations scientifiques et nouvelles professionnelles

Activités de la Société



REVUE TUNISIENNE DE BIOLOGIE CLINIQUE

المجلة التونسية للبيولوجيا السريرية

ORGANE DE LA SOCIÉTÉ TUNISIENNE
DE BIOLOGIE CLINIQUE

Comité de Direction :

A. Hedhili
N. Gharbi
M.H. Ben Aribia
A. Bouslama
F. Khemiri
W. Khrouf

Comité de Rédaction :

Rédacteur en chef :
A. Mebazaa
Attachés à la rédaction :
MC. Ben Rayana
S. Besbes
N. Ben Romdhane
N. Kaabachi
N. Nabli

Comité de lecture :

A. Amor, A. Ayadi, H. Babba,
R. Barbouch, F. Barguelli,
E. Belhassen, S. Ben Ammar,
M.A. Ben Amor, K. Ben Romdhane,
Y. Brahem, E. Chaker, W. Douki,
M. Elloumi, M. Feki, S. Feki,
C. Fendri, N. Fnina, I. Ghedira,
Y. Gorgi, N. Gritli, M. Hassine,
S. Hmida, M. Jeddi, M. Kortas,
C. Mazigh, T. Messaoud, R. Mrad,
M.F. Najjar, B. Nsiri, A. Slim,
L. Slim, Z. Tabka, A. Trabelsi

Consultants étrangers :

V. Blatton (Belgique),
L. Chabraoui (Maroc), J-L. Dhondt
(France), M. Ferrari (Italie),
J.C. Forrest (Canada), M. Germanos
(Liban), P. Gillery (France),
J. Hickes (USA), A. Legrand
(France), JF. Lesesve (France),
M. Muller (Autriche),
P. Mura (France)

Adresse :

Laboratoire de Biochimie
Hôpital La Rabta - Tunis

Tél. : 71 561 912 - Fax : 71 570 506

E-mail : abdf.mebazaa@gnet.tn

SOMMAIRE

	Pages
<i>Editorial</i>	3
✓ <i>Investigation moléculaire des maladies génétiques en Tunisie</i> <i>Rym Kefi-Ben Atig, Houyem Ouragini, Sonia Abdelhak</i>	
<i>Revue générale</i>	7
✓ <i>Maladie d'Alzheimer : les marqueurs biologiques du diagnostic précoce et différentiel</i> <i>Armand Perret-Liaudet</i>	
<i>Articles originaux</i>	11
✓ <i>Etude épidémiologique, étiologique et biochimique des immunoglobulinopathies monoclonales malignes. A propos de 76 cas</i> <i>Z. Ouzzif, K. Doghmi, N. Messaoudi, F. Mahassin, S. Tellal, M. Derouiche, M. Naji</i>	
✓ <i>Antiphospholipid antibodies in 100 homozygous sickle cell patients (SSFA₂) in Abidjan, Côte d'Ivoire.</i> <i>D. Sawadogo, M. Yayo Ayé, D. Kouassi, E. Adjambri</i>	
✓ <i>Etude clinique et biologique de la lithiase urinaire de l'enfant dans le centre tunisien</i> <i>A. Alaya, M. Makki, M. Belguith, A. Nouri, M.F. Najjar</i>	
✓ <i>Place du test de la sueur dans le diagnostic phénotypique de la mucoviscidose en Tunisie</i> <i>S. Hadj Fredj, A. Bibi, T. Messaoud, S. Fattoum.</i>	
✓ <i>Mise au point et validation d'une technique de dosage du méthotrexate par chromatographie liquide haute performance</i> <i>N. Jebabli, A. Klouz, S. Trabelsi, H. Ben Abda, R. Ben Ali, M. Lakhal, C. Belkahia</i>	
✓ <i>Les infections du site opératoire sur matériel orthopédique chez l'adulte</i> <i>S. Besbes, S. Bouhdiba, M. Hached, A. Ben Ghanem, M. Douik</i>	
<i>Informations scientifiques</i>	49
<i>Activités de la Société</i>	50

RYM KEFI-BEN ATIG, **INVESTIGATION MOLÉCULAIRE DES MALADIES**
HOUEM OURAGINI **GÉNÉTIQUES EN TUNISIE**
SONIA ABDELHAK

UR26/04 : Exploration
Moléculaire des Maladies
Orphelines d'origine
Génétique-
Institut Pasteur de Tunis

D'après le Rapport de Développement Humain, la Tunisie comme les autres pays de l'Afrique du Nord occupent une situation intermédiaire caractérisée par des revenus moyens, une amélioration nette des indicateurs de santé, une diminution des taux de la mortalité infantile et maternelle ainsi qu'un contrôle des maladies infectieuses (1).

Comme les autres pays émergents, les pays de l'Afrique du Nord doivent faire face à la transition épidémiologique avec une augmentation de la fréquence des maladies non transmissibles. Une des spécificités régionales est le taux élevé des mariages consanguins qui restent culturellement favorisés malgré les nombreux programmes éducatifs préventifs. Ces taux varient de 22 à 60% (2) et cette variabilité correspond principalement aux différences entre les zones urbaines et les zones rurales. La fréquence élevée des mariages consanguins a pour conséquence l'augmentation de la prévalence des maladies génétiques notamment les maladies ayant un mode de transmission autosomique récessif. L'influence de la consanguinité sur les maladies non transmissibles ou les maladies chroniques multifactorielles n'est pas clairement identifiées et reste controversée selon les études.

L'exploration des maladies génétiques en Afrique du Nord a suscité un grand intérêt depuis le succès de l'identification, par homozygotie par descendance, de loci de gènes impliqués dans des maladies neurologiques et des maladies neurosensorielles génétiquement hétérogènes. En effet, l'étude génétique, uniquement, de trois familles consanguines tunisiennes présentant des individus atteints d'Ataxie avec déficience en vitamine E (AVED), a permis de localiser le gène impliqué dans cette maladie sur le chromosome 8q (3). De même, l'analyse génétique de deux familles consanguines tunisiennes a permis d'identifier le premier locus d'une surdité héréditaire récessive non syndromique en 13q (4). En matière de localisation et d'identification des gènes les «success stories» se sont multipliées, c'étaient le résultat d'une collaboration Nord-Sud, où les familles étaient étudiées sur le plan clinique dans les pays du Sud et les investigations sur le plan génétique et moléculaire étaient effectuées dans les pays du Nord. En effet, dans les années 90, les collaborations dans le domaine de la génétique humaine étaient limitées pour la plupart, aux transferts de matériel biologique. Il y a eu quelques exceptions qui ont contribué aux développements des compétences et aux renforcements des capacités au niveau des pays du Sud et particulièrement en Tunisie.

Durant ces dix dernières années, l'investigation des maladies génétiques en Tunisie a

connu un grand intérêt des chercheurs de différentes disciplines. Cela pourrait être dû à plusieurs raisons particulièrement la disponibilité de la séquence du Génome Humain aussi bien que des ressources humaines hautement qualifiées et un renforcement financier de l'activité de la recherche.

En plus des investigations intéressantes les hémoglobinopathies (5,6) de nombreuses maladies génétiques ont été étudiées dans la population tunisienne, nous pouvons citer la déficience en 21 hydroxylase (7), la fièvre méditerranéenne familiale (8), les dystrophies musculaires congénitales (9, 10) et la surdité héréditaire non syndromique (11).

De même les maladies génétiques rares telles que l'anémie de Fanconi (12), les BCGites (13), l'anémie mégaloblastique (14), la kératodermie palmo-plantaire (15) et la granulomatose septique chronique (16), ont été explorées sur le plan moléculaire. Concernant ces maladies, une stratégie standardisée est adoptée. Dans un premier temps, le génotype des patients et de leurs familles est déterminé par des marqueurs moléculaires polymorphes de type microsatellites, flanquant les gènes candidats connus dans la littérature. L'implication ou non du ou des gènes candidats est mise en évidence par homozygotie par descendance. Dans le cas d'une liaison génétique, la recherche des mutations est réalisée par séquençage direct de la région codante et de la jonction exon/ intron du gène d'intérêt.

L'étude de ces affections a montré une hétérogénéité clinique et génétique reflétant une grande richesse du patrimoine génétique de la population tunisienne. Ce haut degré de polymorphisme est dû aux flux migratoires multidirectionnels qu'a connus l'Afrique du Nord tout au long de son histoire (17).

Dans l'ère de la post génomique, la Tunisie doit faire face à de nouveaux défis, particulièrement avec la restructuration des activités de recherche. Concernant les maladies génétiques, la recherche doit répondre aux besoins de la communauté et se traduire par des services pour une meilleure prise en charge des patients et de leurs familles afin de réduire la prévalence des maladies héréditaires, souvent très handicapantes physiquement et socialement.

Références :

1- <http://hdr.undp.org/en/statistics/>

2- http://www.consang.net/index.php/Main_Page

3- Ben Hamida C, Doerflinger N, Belal S, Linder C, Reutenauer L, Dib C, Gyapay G, Vignal A, Le Paslier D, Cohen D, et al. Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. *Nat Genet.* 1993; 5(2):195-200.

- 4-** Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A, Petit C. A non-syn-drome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet.* 1994;6(1):24-8.
- 5-** Fattoum S. Hemoglobinopathies in Tunisia. An updated review of the epidemiologic and mole-cular data. *Tunis Med.* 2006 ; 84(11) : 687-96
- 6-** Mourni I, Zorai A, Daoued BB, Mosbahi I, Omar S, Kaabachi N, Dellagi K, Abbas S. Hb A2- Pasteur-Tunis [δ 59(E3)Lys \rightarrow Asn, AAG \rightarrow AAC] : a new delta chain variant detected by DNA sequencing in a Tunisian carrier of the codon 39 (C \rightarrow T) beta0-Thalassemia mutation. *Hemoglobin;* 2007; 31 (1):23-9
- 7-** Kharrat M, Tardy V, M'Rad R, Maazoul F, Jemaa LB, Refai M, Morel Y, Chaabouni H. Molecular genetic analysis of Tunisian patients with a classic form of 21-hydroxy-lase deficiency : identification of four novel mutations and high prevalence of Q318X mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(1):368-74.
- 8-** Chaabouni HB, Ksantini M, M'rad R, Kharrat M, Chaabouni M, Maazoul F, Bahloul Z, Ben Jemaa L, Ben Moussa F, Ben Chaabane T, Mrad S, Touitou I, Smaoui N. MEFV mutations in Tunisian patients suffering from familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum.* 2007 ; 36 (6):397-401
- 9-** Louhichi N, Triki C, Quijano-Roy S, Richard P, Makri S, Méziou M, Estournet B, Mrad S, Romero NB, Ayadi H, Guicheney P, Fakhfakh F. New FKRP mutations causing congenital muscular dystrophy associated with mental retardation and central nervous system abnormalities. Identification of a founder mutation in Tunisian families. *Neurogenetics.* 2004;5(1):27-34.
- 10-** Amouri R, Driss A, Murayama K, Kefi M, Nishino I, Hentati F. Allelic het-erogeneity of GNE gene mutation in two Tunisian families with autosomal recessive inclusion body myo-pathy. *Neuromuscul Disord.* 2005 ; 15(5):361-3.
- 11-** Aifa-Hmani M, Ayadi H. Deafness genes and the mechanism of hearing. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 2000;77 (1-4):17-21. Review.
- 12-** Bouchlaka C, Abdelhak S, Amouri A, Ben Abid H, Hadiji S, Frikha M, Ben Othman T, Amri F, Ayadi H, Hachicha M, Rebai A, Saad A, Dellagi K. The Tunisian Fanconi Anaemia Study Group. Fanconi anaemia in Tunisia : high Prevalence of group A and identifica-tion of new FANCA mutations. *J Hum Genet.* 2003 ; 48 : 352-61.
- 13-** Elloumi-Zghal H, Barbouche MR, Chemli J, Béjaoui M, Harbi A, Snoussi N, Abdelhak S and K Dellagi. Clinical and Genetic heterogeneity of inherited autosomal recessive disseminated Bacille Calmette-Guerin infection. *J. Infect. Dis.* 2002; 185:1468-75.

- 14-** Bouchlaka C, Maktouf C, Mahjoub B, Ayadi A, Sfar MT, Sioud M, Gueddich N, Belhadjali Z, Rebai A, Abdelhak S, Dellagi K. Genetic heterogeneity of megaloblastic anaemia type 1 in Tunisian patients. *J Hum Genet.* 2007 ; 52 : 262-70
- 15-** Charfeddine C, Mokni M, Mousli R, Elkares R, Bouchlaka C, Boubaker S, Ghedamsi S, Baccouche D, Ben Osman A, Dellagi K, Abdelhak S. Novel missense mutation in the gene encoding SLURP-1 in patients with Mal de Meleda from Northern Tunisia. *Br J Dermatol.* 2003;149:1108-15.
- 16-** El Kares R, Barbouche MR, Elloumi-Zghal H, Bejaoui M, Chemli J, Mellouli F, Tebib N, Abdelmoula MS, Boukthir S, Fitouri Z, M'rad S, Bouslama K, Touri H, Abdelhak S, Dellagi MK. Genetic and mutational heterogeneity of autosomal recessive chronic granulomatous disease in Tunisia. *J Hum Genet.* 2006 ; 51 : 887-95.
- 17-** Kefi R, Stevanovitch A, Bouzaid E, et Béraud-Colomb E .Diversité mitochondriale de la population de Taforalt (12.000 ans, Maroc) : une approche génétique à l'étude du peuplement de l'Afrique du Nord. *Anthropologie* 2005. XLIII/1 :1-11.

Maladie d'Alzheimer : les marqueurs biologiques du diagnostic précoce et différentiel

ARMAND
PERRET-LIAUDET

En 1906, Aloïs Alzheimer décrit pour la première fois les lésions neuropathologiques caractéristiques de cette démence à partir du cerveau d'une jeune patiente de 51 ans, à savoir :
- des plaques séniles (PS) appelées encore plaques amyloïdes riches en protéines amyloïdes
- des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) formées d'amas de fibrilles riches en protéines Tau

Cette démence pré-sénile fut dénommée en 1912 «Maladie d'Alzheimer» en opposition à la démence sénile. Les dénominations démences séniles ou préséniles n'ont plus cours aujourd'hui.

La démence d'Alzheimer représente environ 80% des cas de démences (1). Actuellement, le diagnostic étiologique en France et dans les pays industrialisés n'est porté que dans 2/3 des cas et seulement 30% des patients bénéficient d'un traitement adéquat.

Le nombre de cas de démences en France serait environ de 1 million, soit 10% en Région Rhône Alpes. L'incidence de la MA est dépendante de l'âge avec environ 4 cas pour mille avant 75 ans et 60 cas au-delà de 90 ans. On estime qu'en 2050, le nombre de malades Alzheimer âgés de plus de 75 ans aura triplé (2). Dans le monde, le nombre de malades pourrait passer de 24 millions actuellement à 42 millions en 2020 et 81 millions en 2040, selon de récentes estimations (3). En Tunisie, d'après une étude initiée en 2002 par l'Institut National de Santé, 3,7% des plus de 65 ans seraient atteints de MA. Bien que ce soit un pays à l'âge médian encore jeune, le recul de la mortalité générale et infantile associé à une diminution très nette de l'indice de fécondité ces trente dernières années ont fait rentrer la Tunisie dans le dernier stade de la transition démographique caractérisé par un vieillissement rapide de la population (4). En effet, d'après les données de l'institut National de Statistique, la proportion des plus de 60 ans a doublé de 1966 à 1999 (9% de la population totale) et devrait passer à 18% en 2030.

Ainsi, la Tunisie ne sera pas épargnée par l'explosion du nombre de patients atteints ce qui constitue un problème de santé majeur.

Les critères de diagnostic cliniques d'une démence sont donnés dans la classification DSM version IV (1994-2000). On parle de démence quand se développe un déficit progressif cognitif multiple conduisant à une perte d'autonomie : la mémoire et un autre symptôme (aphasie, apraxie, agnosie ou dysfonctionnement exécutif). Ce déficit entraîne un retrait de la vie professionnelle et l'apparition d'un dysfonctionnement social.

La MA est une maladie dégénérative progressive affectant les fonctions cognitives et comportementales conduisant à une démence. Il existe des formes génétiques représentant 2 à 3% des formes totales, impliquant des mutations du gène codant la protéine amyloïde, la protéine préséniline. Les formes sporadiques touchent le sujet plus âgé et présentent des variabilités cliniques.

Service de Neurobiologie.
CBPE - Groupement
Hospitalier Est - Hôpitaux
de Lyon

Nous sommes confrontés à un problème de sous diagnostic du fait :

- d'un manque de spécificité vis-à-vis d'autres états démentiels (démences non neurodégénératives, Démence à corps de Lewy (DCL), Démences fronto-temporales (DFT),

Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ)... conduisant à une prise en charge souvent inadéquate,

- d'un manque de sensibilité entraînant un diagnostic tardif de la MA et conduisant donc à une prise en charge très lourde de ces patients, supportée par les familles et par la société.

Le diagnostic de certitude est encore porté par l'étude neuropathologique du cerveau après autopsie. Du vivant du patient, le diagnostic de probabilité est assuré par des marqueurs cliniques, et il est proposé depuis l'année dernière d'y associer des marqueurs neuropsychologiques, de l'imagerie et des marqueurs biologiques.

Diagnostic clinique de la MA

L'année dernière, il a été proposé par un groupe international de redéfinir les critères de diagnostic cliniques notamment pour détecter les formes précoces et assurer une prise en charge adéquate du patient (5).

Ainsi, les formes débutantes anciennement nommées «MCI» pour «Mild Cognitive Impairment» sont appelées prédémença de la MA.

Le critère majeur retenu par le Pr Dubois est la présence d'un trouble de la mémoire épisodique, observé par le patient ou ses proches depuis plus de 6 mois et confirmé par des tests de mémoire qui montrent un syndrome amnésique de type hippocampique. Ce déficit se traduit par "l'incapacité à transformer une information perçue en trace mnésique".

Evaluation clinique et neuropsychologique de la MA

L'évaluation débute par un entretien en présence du patient et d'un aidant généralement appartenant à la famille afin de confronter entre le vécu du patient et celui de la famille. Le patient est ensuite interrogé sur ses habitudes de vie. Plusieurs tests peuvent être réalisés.

Le Mini mental Score (MMS) est systématiquement réalisé pour des patients qui sont encore capables de le faire. Ce test n'est pas un test de diagnostic de la MA ; il permet d'évaluer sur une échelle de 30 la sévérité de la démence en évaluant sa désorientation spatio-temporelle, sa capacité de calcul et de l'attention, la présence

d'une aphasie, sa capacité de construction verbale...

Une batterie de tests neuropsychologiques va pouvoir amener le diagnostic dans une bonne proportion des patients. Parmi les différents tests, citons, le Trail Making Test, le Stroop test, l'Empan Digital Test et surtout le test de rappel des mots selon le paradigme de Grober et Buschke. Ce dernier test permet de différencier très précocement une MA d'une autre démence (démence fronto-temporale). La mise en œuvre de ces tests demande une demi-journée par patient.

Apport de l'imagerie pour le diagnostic de la MA

L'IRM permet de mettre en évidence l'atrophie hippocampique, critère secondaire proposé par le groupe international. De plus, il permet d'éliminer d'autres étiologies pouvant être responsables de la démence, comme, l'hydrocéphalie à pression normale, les lésions vasculaires...

De même, la mise en évidence d'un métabolisme et d'une perfusion réduits dans les régions temporale et pariétale du cerveau, par neuroimagerie fonctionnelle (PET/SPECT) a été également proposée comme nouveau critère de diagnostic (5).

Apport de la biologie pour le Diagnostic de la MA

Les mesures des concentrations céphalorachidiennes des protéines Tau (TAU), Tau anormalement phosphorylée (P-TAU en 181, 231...) et de la protéine beta amyloïde 1-42 (AB 42) sont depuis l'année dernière proposées comme critères de diagnostic (5).

Ces marqueurs ont été développés à partir des lésions principales neuropathologiques caractéristiques de la MA : les protéines TAU et P-TAU reflètent les dégénérescences neuro-fibrillaires (DNF) (6) et la protéine AB 42 la présence de plaques séniles (7). Classiquement, dans la MA, les concentrations dans le LCR de la protéine AB 42 sont diminuées, celles des protéines TAU et P-TAU sont anormalement augmentées (8). Pour la protéine TAU, pour une spécificité fixée à 90% vis-à-vis de contrôles normaux, on retrouve une sensibilité supérieure à

de 80% pour le diagnostic de MA. La valeur diagnostique de l'AB 42 est similaire alors que pour les P-TAU, la sensibilité semble un peu plus élevée (90%) (9).

Pour le diagnostic précoce, ces marqueurs permettent de détecter les patients présentant une prédémençe au moins 5 ans avant la survenue de la démence avec une sensibilité et spécificité environ de 90% (10). Chez des patients présentant une démence modérée (MMS > 23), la sensibilité de ces marqueurs est équivalente à celle trouvée à des stades plus graves. La sensibilité de ces marqueurs est aussi influencée par le phénotype de la maladie : ces marqueurs permettraient de discriminer les différents phénotypes cliniques (11).

Pour le diagnostic différentiel, ces marqueurs permettent de différencier facilement une MA de démences d'origine carencielle, éthylique, vasculaires ou de syndromes psychiatriques (12).

La DCL est le diagnostic clinique le plus difficile avec la MA. Il n'existe finalement que très peu de corrélation entre la clinique et la neuropathologie de cette alpha synucléopathie ayant des plaques séniles et parfois des DNF. L'AB 42 et la protéine TAU sont peu discriminantes alors que la protéine P-TAU permettrait de donner une spécificité supérieure à 80% (13,14).

Les DFT restent un problème de diagnostic différentiel avec la MA touchant des patients jeunes d'autant plus important que le traitement par des anti cholinestérases n'est pas indiqué dans les DFT. La normalité de TAU et P-TAU chez les patients DFT permet de les discriminer des patients MA avec une bonne spécificité [résultats propres].

Enfin, le problème de diagnostic entre MA et MCJ n'est pas si facile quand la MA se présente sous un tableau anormalement rapide et brutal ou que la durée d'évolution de la MCJ est anormalement longue. L'addition des protéines TAU et P-TAU à la protéine p 14.3.3 permet d'améliorer significativement le diagnostic différentiel important entre ces deux pathologies : la P-TAU est généralement normale dans la MCJ alors que la TAU est significativement beaucoup plus élevée dans la MCJ que dans la MA, un cutoff à 1500 pg/ml ayant été décrit comme sensible et spécifique à 95% (15).

La protéine AB 42 ne semble pas discriminante.

Les différentes études publiées ne semblent pas permettre d'isoler de marqueur isolé idéal que ce soit pour le diagnostic précoce ou pour le diagnostic différentiel. L'ensemble des équipes semblent s'entendre sur le fait d'associer ces marqueurs pour arriver à augmenter sensibilité et spécificité. Pour le diagnostic de MA, plusieurs rapports ont été proposés : la société Innogenetics propose le ratio IATI (Innogenetics Amyloid Tau Index) combinant les valeurs de TAU et de AB42 et une proposition diagnostique individuelle en répartissant le patient en 4 secteurs fonction des valeurs du IATI en ordonnée et de P-TAU en abscisse. Pour le diagnostic précoce, il a été récemment démontré l'intérêt d'utiliser un rapport utilisant AB 42 et TAU ou P-TAU (le meilleur restant à déterminer) pour prédire les patients avec plainte mnésique allant évoluer vers une MA [Hansson 2006]. Par ailleurs, pour différencier MCJ de MA, le rapport TAU / P-TAU permettrait d'augmenter la spécificité par rapport aux valeurs isolées et comprises dans des valeurs autour du cutoff de 1500 pg/ml.

Concernant le diagnostic différentiel, nous présentons nos résultats partiels obtenus au cours d'une étude financée par un Projet Hospitalier de Recherche Clinique et relayé par un projet de recherche européen FP6 «Neuroscreen».

Dans le LCR, il ne semble pas y avoir de modifications significatives des concentrations de ces marqueurs en fonction de l'évolution clinique au décours de la MA même si la concentration TAU a pu être corrélée à l'atrophie hippocampique.

Perspectives pour le diagnostic biologique

Du fait du geste invasif de la ponction lombaire, seules les formes cliniques atypiques ou les patients jeunes bénéficient de ces marqueurs en complément des tests neuropsychologiques. Cependant, le développement du dosage de l'alpha synucléine permettrait d'améliorer la spécificité du diagnostic différentiel entre MA et DCL et démences parkinsoniennes (17).

Pour développer un marqueur sanguin, il faut résoudre deux écueils majeurs : perte de sensibilité et pollution par des marqueurs plus ou moins neurospécifiques.

Le dosage isolé de l'AB 42 ne semble pas présenter d'intérêt dans le diagnostic (18) alors que le ratio AB 40

sur AB 42 est en cours d'évaluation. Récemment, des travaux laissent entrevoir le potentiel diagnostique de la MA d'un panel de marqueurs de type cytokines inflammatoires et proinflammatoires (19), et l'intérêt du dosage de dimères d'alpha synucléine pour le diagnostic d'alpha synucléopathies. Enfin, tout reste ouvert pour les autres marqueurs TAU et Alpha synucléine notamment, axe prioritaire pour notre laboratoire.

References

- 1- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006; 368: 387-403.
- 2- Helmer C, Pasquier F, Dartigues JF. Epidemiology of Alzheimer disease 506 and related disorders. *Med Sci (Paris)* 2006;22:288-96.
- 3- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M. Global prevalence of dementia : a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005 ; 366 : 2112-7.
- 4- Ben Brahim A. Transition des structures par âge et vieillissement en Tunisie. *Séminaires du CICRED*. Paris, February 23rd-26th, 2004
- 5- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease : revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol*. 2007 ; 6 : 734-46.
- 6- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci US A*. 1986; 83: 4913-7.
- 7- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease : initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;120 : 885-90.
- 8- Andreasen N, Minthon L, Davidsson P, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Winblad B, et al. Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol* 562 2001;58:373-9.
- 9- Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *Neurox*. 2004. 1. 214-225.
- 10- Herukka SK, Helisalmi S, Hallikainen M, Tervo S, Soininen H, Pirttila T. CSF A₄₂, Tau and phosphorylated Tau, APOE epsilon4 allele and MCI type in progressive MCI. *Neurobiol Aging*. 2007; 28:507-14.
- 11- Iqbal K, Flory M, Khatoon S, Soininen H, Pirttila T, Lehtovirta M, Alafuzoff I, Blennow K, Andreasen N, Vanmechelen E, Grundke-Iqbal I. Subgroups of Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid molecular markers. *Ann Neurol*. 2005 Nov;58(5):748-57.
- 12- Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2003 Oct;2(10) : 605-13
- 13- Mollenhauer B, Bibl M, Wiltfang J, Steinacker P, Ciesielczyk B, Neubert K, Trenkwalder C, Otto M. Total tau protein, phosphorylated tau (181p) protein, _-amyloid(1-42),and _-amyloid(1-40) in cerebrospinal fluid of patients with dementia with Lewy bodies. *Clin Chem Lab Med*. 2006; 44: 192-5.
- 14- Vanderstichele H, De Vreese K, Blennow K, Andreasen N, Sindic C, Ivanoiu A, et al. Analytical performance and clinical utility of the INNOTEST PHOSPHO-TAU181P assay for discrimination between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1472-80.
- 15- Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, et al. Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1997;225: 210-2.
- 16- Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment : a follow-up study. *Lancet Neurol*. 2006 ; 5 : 228-34.
- 17- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court JA, et al. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 2006;20:419-25.
- 18- Freeman SH, Raju S, Hyman BT, Frosch MP, Irizarry MC. Plasma A₄₂ levels do not reflect brain A₄₂ levels. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007; 66: 264-71.
- 19- Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, Friedman LF, Galasko DR, Jutel M, Karydas A, Kaye JA, Leszek J, Miller BL, Minthon L, Quinn JF, Rabinovici GD, Robinson WH, Sabbagh MN, So YT, Sparks DL, Tabaton M, Tinklenberg J, Yesavage JA, Tibshirani R, Wyss-Coray T. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med*. 2007; 13: 1359-62.

Etude épidémiologique, étiologique et biochimique des immunoglobulinopathies monoclonales malignes. A propos de 76 cas.

Z. OUZZIF¹,
K. DOGHMI²,
N. MESSAOUDI³,
F. MAHASSIN²,
S. TELLAL¹,
M. DEROUICHE¹,
M. NAJJ³

Résumé : Les immunoglobulines monoclonales sont définies par la sécrétion sélective, souvent en quantité élevée, d'une seule espèce d'immunoglobuline sérique et/ou urinaire, témoignant de l'expansion non contrôlée d'un clone unique de lymphocytes B (lymphoplasmocyte ou plasmocyte).

Dans le cadre de ce travail, nous avons voulu étudier les caractéristiques épidémiologiques, biochimiques et étiologiques d'une cohorte de 76 cas d'immunoglobulinopathies monoclonales malignes (IMM) colligés à l'hôpital militaire Mohamed V de Rabat. Les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS) seront de ce fait exclues de notre propos. Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur les cas d'IMM étudiés au laboratoire de biochimie de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V durant la période de 8 ans et demi, allant du 1^{er} Septembre 1997 au 31 Mars 2006. Les résultats de cette étude sont pour la plupart comparables à ceux de la littérature. Ils confirment que :

Les IMM sont des pathologies du sujet âgé avec une prédominance masculine (sex-ratio H/F est de 2,8),

L'absence de pic monoclonal à l'EPP ne doit pas forcément faire écarter le diagnostic d'IMM : une chaîne légère libre en petite quantité peut n'être détectée que dans les urines.

La prédominance de l'isotype IgG/kappa (54,5%) sur ses homologues dans les myélomes multiples, pathologie la plus fréquente dans les IMM.

La faible fréquence de la macroglobulinémie de Waldenström (7,9%).

Par rapport à la plupart des grandes séries internationales, elle se distingue par :

La fréquence relativement élevée des IMM à chaîne légère libre (27,3% des cas),

Mots clés : Immunoglobulines monoclonales malignes, myélome multiple, macroglobulinémie de Waldenström.

Epidemiologic, etiologic and biochemical study of the malignant monoclonal immuno-globulinopathies.

About 76 cases.

Summary : The monoclonal immunoglobulines are defined by selective secretion, often in high, of only one molecular species of immunoglobuline serum and/or urinary, testifying to the not controlled expansion of a single clone of B lymphocytes (lymphoplasmocyte or plasmocyte). Within the framework of this work, we wanted to study the epidemiologic, biochemical and etiologic characteristics of a troop of 76 cases of malignant monoclonal immunoglobulinopathy (MMI) in the Rabat military hospital in Morocco. The Monoclonal Gammopathies of Undetermined Signification will be of this fact excluded from our matter.

It is about a retrospective study relating to the cases of MMI studied at the laboratory of biochemistry of Mohammed V Military Hospital lasting the 8

¹ Laboratoire de biochimie et d'immunochimie, HMIMV, Rabat, Maroc.

² Service de Médecine interne, hématologie, HMIMV, Rabat, Maroc.

³ Laboratoire d'Hématologie, HMIMV, Rabat, Maroc.

years period and half, from September, first 1997 to March 31 2006. The results of this study are in majority comparable with those of the literature. They confirm that :

- The MMI are pathologies of the old subject with a male prevalence,
- The absence of monoclonal peak in the protein electrophoresis should not inevitably make draw aside the diagnosis of MMI : a free light chain in small quantity can be detected only in urines.
- Prevalence of isotypic IgG/k (54, 5%) on its counterparts in the multiple myeloma, the most frequent pathology in the MMI.
- The weak frequency of the Waldenström macroglobulinemia (7,9%).

Compared to the majority of the great international series, it is characterized by :

- The frequency relatively high of the MMI with free light chain (27,3%),

Key words : malignant monoclonal immunoglobulin, multiple myeloma, Waldenström macroglobulinemia.

Introduction

Les immunoglobulines monoclonales sont définies par la sécrétion sélective, souvent en quantité élevée, d'une seule espèce d'immunoglobuline sérique et/ou urinaire, témoignant de l'expansion non contrôlée d'un clone unique de lymphocytes B (lymphoplasmocyte ou plasmocyte). Elles sont constituées soit d'une seule classe de chaîne lourde et d'un seul type de chaîne légère, soit de chaînes légères isolées d'un seul type, soit beaucoup plus rarement de fragments de chaînes lourdes d'une seule classe. Leur mise en évidence est de plus en plus fréquente au laboratoire en raison, d'une part du vieillissement de la population et d'autre part d'une considérable amélioration des techniques de diagnostic. Leur présence n'est nullement synonyme de malignité [1]. En effet, c'est la conjugaison de plusieurs critères cliniques, radiologiques, hématologiques, biochimiques et immuno-chimiques qui permet d'affirmer leur caractère malin [2]. Leur recherche et leur caractérisation dans les liquides biologiques visent à affirmer leur homogénéité de charge par électrophorèse et d'isotypie (type de chaîne légère, classe, voire sous-classe de chaîne lourde) par immunofixation ou électrophorèse capillaire après immunosoustraction.

Les immunoglobulines monoclonales sont retrouvées dans de nombreux syndromes lymphoprolifératifs comme le myélome multiple (maladie de KAHLER), la

macroglobulinémie de WALDENSTRÖM (MGW), les maladies des chaînes lourdes et l'amylose, mais aussi dans les gammopathies monoclonales «bénignes» ou de signification indéterminée (MGUS) dont le statut de bénignité peut être provisoire.

Dans le cadre de ce travail, nous avons voulu étudier les caractéristiques épidémiologiques, biochimiques et étiologiques d'une cohorte de 76 cas d'immunoglobulinopathies monoclonales malignes (IMM) colligés à l'hôpital militaire Mohamed V de Rabat. Les MGUS seront de ce fait exclues de notre propos.

Matériel et méthodes

Il s'agit d'une étude rétrospective, réalisée en collaboration avec les services de médecine interne et d'hématologie de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V, portant sur les cas d'IMM diagnostiqués au laboratoire de biochimie du même hôpital durant la période de 8 ans et demi, allant du 1^{er} Septembre 1997 au 31 Mars 2006. Pour chaque patient, il a été réalisé au laboratoire une analyse conjointe sur des prélèvements sanguin (tube sec) et urinaire (urines des 24 heures) couplant :

- Un dosage des protides totaux par la méthode colorimétrique de Biuret utilisant le réactif de Gornall, adaptée sur l'auto analyseur Cobas Intégra de Roche®. Une

électrophorèse des protéines sériques (EPP) sur gel d'agarose (technique automatisée sur l'automate Hydrasys de Sébia ®) pour la recherche et l'affirmation de l'homogénéité de charge,

- Une immunofixation (IF) sérique et urinaire (hydragel IF, Sébia ®) pour l'identification de l'isotypie et la recherche des chaînes légères libres monoclonales,
- Un dosage pondéral des immunoglobulines (Ig) sériques G, A, M par immuno néphélométrie (BN100 Behring ®) pour estimer l'hypogammaglobulinémie résiduelle.

Une analyse du dossier médical est effectuée au cas par cas pour recueillir les caractéristiques épidémiologiques et les éléments du diagnostic étiologique.

Résultats

Durant cette période de 8 ans et demi, 76 cas d'IMM ont été colligés, soit en moyenne 9 cas par an.

Caractéristiques épidémiologiques des

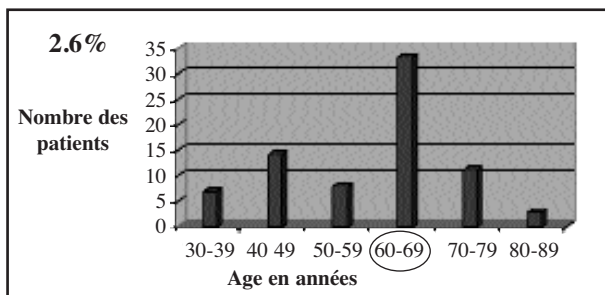


Figure 1 : Répartition des Immunoglobulines Monoclonales Malignes en fonction de l'âge

patients

La répartition selon les tranches d'âge des 76 patients est reportée dans la figure 1.

La série étudiée comprend 56 hommes et 20 femmes soit respectivement 74% et 26% des cas. Le sex-ratio global (H/F) est de 2,8.

Signes révélateurs

Les circonstances de découverte ont été cliniques et/ou biologiques représentées par :

- un syndrome douloureux osseux avec ou sans anomalie biologique (VS accélérée, pic à l'électrophorèse des

protéines sériques, hypercalcémie, anémie) dans les cas de myélome multiple,

- des poly adénopathies, un syndrome d'hyper viscosité ou des gingivorragies dans les cas de MGW,
- un syndrome tumoral avec des signes de compression et des signes généraux dans les cas de lymphome,
- une poly adénopathie superficielle non compressive ou découverte systématique d'une hyper lymphocytose dans les cas de LLC.

Diagnostic étiologique

Le diagnostic étiologique reposait sur des investigations différentes selon l'orientation diagnostique initiale, notamment :

- le myélogramme révélant une plasmocytose avec des éléments dystrophiques dans tous les cas de myélome multiple, ce qui a permis de pousser les investigations biologiques dans tous les cas où le protidogramme n'a pas été contributif (absence de pic dans les cas de myélome à chaînes légères et les deux cas de myélome sécrétant mais non excréant),

- l'étude immunohistochimique des plasmocytes médullaires qui permet d'objectiver l'immunoglobuline monoclonale dans leur cytoplasme et prouver ainsi le caractère monoclonal dans les deux cas de myélome à plasmocytes non excréant,

- la biopsie ostéoméduleuse ou ganglionnaire objectivant une prolifération lymphoplasmocytaire monoclonale dans tous les cas de MGW,

- une hyper lymphocytose sanguine $> 4000/mm^3$, avec à l'immunophénotypage un score de Matutes ≥ 4 (CD5+, CD23+, CD22 ou CD79b faiblement exprimé, immunoglobuline de surface faiblement exprimée) dans les cas de LLC,

- l'étude anatomopathologique d'un ganglion ou de la moelle dans les cas de lymphome.

La figure 2 représente la répartition étiologique des IMM. On note la forte prédominance du myélome qui représente à lui seul 66 cas soit 86.8%, suivi de la macroglobulinémie de Waldenström (6 cas), du lymphome (2 cas) et de la leucémie lymphoïde chronique (2 cas) qui représentent respectivement près de 7.9, 2.6 et 2.6% des cas. Aucun cas d'IMM à chaîne lourde sans association de chaîne légère n'a été retrouvé dans cette série.

Etude biochimique

Le taux moyen des protides totaux sériques est de 90 g.L⁻¹, avec des extrêmes de 54 à 140 g.L⁻¹. La protidémie est élevée dans 66% des cas, basse dans 26% des cas (les 18 cas de myélome à chaînes légères et les 2 cas de myélome à plasmocytes non excréant) et normale dans 08% des cas

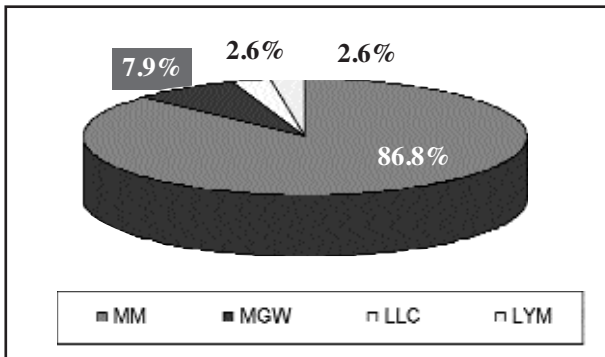


Figure 2 : Répartition étiologique des immunoglobulinopathies monoclonales malignes (IMM)

- MM** : Myélome Multiple
- MGW** : Macroglobulinémie de Waldenstrom
- LLC** : Leucémie Lymphoïde Chronique
- LYM** : Lymphome

(les 2 cas de LLC, les 2 cas de lymphome et deux cas de MGW). Un pic étroit d'importance variable a été objectivé chez 56 patients soit 74% des cas. Il a été retrouvé au niveau de la zone gamma chez 46 patients (82%) et de la zone bêta chez 10 patients (18%). L'absence de pic monoclonal a été observée chez 20 patients (26%) (tableau 1). Il s'agit des cas de myélome de BJ et des deux cas de myélome à plasmocytes non excréant. Elle a été associée à une hypogammaglobulinémie.

La répartition isotypique des IMM de notre série figure dans le tableau 2 qui montre que l'isotype G, avec 50% des cas, est prépondérant. La chaîne légère kappa (43 cas) est beaucoup plus représentée que la chaîne légère lambda (31 cas) avec un rapport κ/λ de 1.38.

Le tableau 3 illustre la répartition isotypique des cas de myélome multiple, étiologie la plus représentée, dans cette série.

Les résultats du dosage pondéral des immunoglobulines ont objectivé une augmentation de l'immunoglobuline A ou G dans tous les cas de myélome multiple de type A ou de type G, une augmentation du taux de l'immunoglobuline M dans les cas de MGW, de LLC et

Tableau 1 : Etude biochimique des Immunoglobulinopathies Monoclonales Malignes (IMM)

	Absence de pic		Pic à EPP		Zone β		Zone γ		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IMM	20	26%	56	74%	10	18%	46	82%	76	100

EPP : Electrophorèse des protéines sériques

n : nombre de cas

Tableau 2 : Distribution isotypique des IMM

	n	%	κ (n)	λ (n)	κ/λ
IgG	38	50	22	16	1.37
IgM	8	10.5	6	2	3
IgA	10	13.2	7	3	2.33
C.L.L ¹	18	23.7	8	10	0.8
NE ²	2	2.6	---	---	---
Total	76	100	43	31	1.38

1 : Immunoglobulinopathie monoclonale à chaînes légères libres

2 : Non excréant

Tableau 3 : Répartition isotypique des cas de myélome multiple (MM)

		IgG		IgA		CLL		NE		
M.M	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
	66	100	36	54.5	10	15.2	18	27.3	2	3

Ig G : Immunoglobuline de type G, Ig A : Immunoglobuline de type A, CLL : Chaînes légères libres, NE : Non Excrétant

de lymphome. Une répression de synthèse des immunoglobulines normales polyclonales a été observée dans 35 cas sur les 66 cas de myélome multiple, soit 53% des cas, répartis comme suit : 25 cas de myélome multiple à IgG, deux cas à IgA (2/10) et huit cas de myélome de Bence Jones (BJ) (8/18).

Une protéinurie de Bence Jones (PBJ) était présente dans 55% des cas (les dix huit cas de myélome à chaîne légère, dix huit cas de myélome de type G, quatre cas de myélome de type A et deux cas de MGW).

Discussion

Dans notre série, l'âge moyen des patients était de 63 ans, témoignant que les IMM sont des maladies du sujet âgé, avec un pic de fréquence observé dans le groupe de patients de 60 à 69 ans conformément à ce qui est retrouvé dans la littérature [3, 4]. La prédominance masculine notée dans différentes séries de la littérature est vérifiée dans notre série avec un sex-ratio un peu plus élevé, de l'ordre de 2.8. Cela est dû au fait que les patients admis sont majoritairement militaires, donc de sexe masculin.

L'exploration des protéines sériques et urinaires est un important outil du diagnostic biologique des IMM. Dans 74% des cas de la série étudiée, l'électrophorèse des protéines sériques a mis en évidence un pic étroit correspondant à une immunoglobuline monoclonale migrant dans la zone des bêta- ou gammaglobulines. Sa présence est responsable d'une hyperprotidémie supérieure à 80 g.L⁻¹. Le pic bêta a été objectivé dans tous les cas d'IMM de type A. Dans 26% des cas de notre série, il n'existe pas de pic monoclonal à l'électrophorèse des protéines sériques. Il s'agit des cas de myélome multiple de BJ et de myélome à plasmocytes non excrétant. Dans ces cas, l'anomalie sérique usuelle est une hypoprotéïnémie due à une hypogammaglobulinémie souvent pré-

sente qui constitue un signe d'appel autorisant la réalisation d'immunofixations sérique et urinaire à la recherche de chaînes légères libres monoclonales. Dans les cas de myélome non excrétant (deux cas dans la présente étude), les plasmocytes n'excrètent pas l'immunoglobuline monoclonale. Celle-ci n'est donc détectée ni dans le sérum ni dans les urines [5]. Dans tous les cas, le diagnostic repose sur l'étude du myélogramme qui met en évidence une infiltration plasmocytaire représentant plus de 10% des éléments nucléés d'aspect anormal (cytoplasme flammé, inclusions cristallines, anomalies nucléaires, modification de l'archoplasme). Il est complété, dans les cas de myélome non excrétant, par l'étude immunohistochimique des plasmocytes permettant de conforter le diagnostic de plasmocytose maligne en montrant leur forte réaction avec le marqueur CD 138. L'étude immunohistochimique des plasmocytes a révélé une monotypie attestée par la positivité exclusive avec l'anticorps anti-chaînes légères Lambda.

La répartition étiologique des IMM objective une nette prédominance du myélome multiple (87% des cas de notre série), essentiellement de type IgG/κ (54,5%). Le myélome multiple de type BJ occupe la seconde place avec 27.3% des cas. Cette fréquence relativement élevée caractérise notre série et deux autres séries tunisiennes [2,6], alors que dans les séries internationales [1, 7, 9] la fréquence de ce type d'IMM varie de 2.7 à 7.6% seulement. Le MM de type Ig A représente 15.2%, il n'existe aucun cas de MM à IgD, IgE. La faible fréquence de la macroglobulinémie de Waldenstrom dans notre série (7.9%) est retrouvée dans la plupart des séries de la littérature où elle représente 1.1 à 4.8%. La chaîne légère Kappa est beaucoup plus représentée que la chaîne légère Lambda (κ/λ de 1,38). Ces données corroborent celles de

Marneux, Cottin et col. [7,8] qui ont relevé en France la prédominance des chaînes lourdes gamma et légères κ . Aucun cas d'IMM à chaîne lourde sans association de chaîne légère n'a été retrouvé dans cette série.

Le dosage pondéral des immunoglobulines permet de quantifier l'immunoglobuline monoclonale et apprécie en même temps l'éventuelle diminution des autres immunoglobulines poly clonales. Cette baisse est corrélée avec l'importance de la masse tumorale est responsable de problèmes infectieux dans le myélome multiple [7,8, 10].

La recherche de la protéinurie de Bence Jones formée de chaînes légères libres à différents états de polymérisation est un examen fondamental dans les IMM, en particulier dans le myélome à chaînes légères car elle est généralement positive de type Kappa ou Lambda comme dans la présente étude (100% des cas de myélome à chaînes légères).

Conclusion

Les résultats de notre étude de 76 cas sont pour la plupart comparables à ceux de la littérature. Ils confirment que :

Les IMM sont des pathologies du sujet âgé avec une certaine prédominance masculine,

L'absence de pic monoclonal à l'EPP ne doit pas forcément faire écarter le diagnostic d'IMM : une chaîne légère libre en petite quantité peut n'être détectée que dans les urines.

La prédominance de l'isotype IgG/ κ sur ses homologues dans les myélomes multiples, pathologie la plus fréquente dans les IMM.

La faible fréquence de la macroglobulinémie de Waldenstrom.

Par rapport à la plupart des grandes séries internationales, notre étude se distingue par :

La fréquence relativement élevée des IMM à chaîne légère libre.

Références

- 1- Fine JM, Lambin P, Derycke C, Muller JY, Marneux M. Systematic Survey of monoclonal gammopathies in the sera from blood donors
Transfusion 1979 ; 19 : 332.
- 2- Makin S, Zouari R, Barbouch MR, Ayed K, Moalla M, Zakraoui L. Gammopathies monoclonales en tunisie.
Revue française de transfusion et immunohématologie 1990; 33, 31-8.
- 3- Huez D.
Epidémiologie des gammopathies monoclonales.
Revue du Praticien 1993; 43 (3) : 271-4.
- 4- Yvette Il, Chow J, Wickham NWR.
Monoclonal gammopathy of unknown significance and malignant paraproteinemia in Hong Kong.
AJCP 1996; 106 (4): 449-56.
- 5- Moreau L, Cosson A, Valcke JC, Preud'homme JL, Philbert M, Favriel JM.
Myélome à plasmocytes «non excréteur» précédé d'une anémie réfractaire sidéroblastique.
Sem Hôp Paris 1979; 55 : 1794-1796.
- 6- Mseddi-Hdiji S, Haddouk S, Ben Ayed M, Tahar N.
Gammopathies monoclonales en Tunisie.
Pathologie biologique 2005 ; 52 :15-25.
- 7- Cottin S, Ponge A, Debet J.
Les dysglobulinémies monoclonales recensées au centre hospitalier de Saint Nazaire de 1965-1982.
Rhumatologie 1988 ; 40 : 299-305.
- 8- Marneux M, Fine JM.
Données récentes sur les gammopathies monoclonales.
Revue de transfusion et immuno-hématologie 1985; 28 : 591-600.
- 9- Pick A, Shoenfeld Y, Frohlichmann R et al.
Plasma cell dyscrasia. Analysis of 423 patients.
Jama 1979; 24: 2275-8.
- 10- Facon T, Yakoub-Agha I, Leleu X.
Myélome multiple.

Antiphospholipid antibodies in 100 homozygous sickle cell patients (SSFA2) in Abidjan, Côte d'Ivoire.

D. SAWADOGO^{1,2},
M. YAYO AYÉ^{1,2},
D. KOUASSI¹,
E. ADJAMBRI^{1,2}

¹ Department of Haematology,
Faculty of Pharmacy, University
of Cocody. Abidjan.
Côte d'Ivoire

² Unity of Haematology.
Central laboratory, Teaching
Hospital of Yopougon.
Abidjan. Côte d'Ivoire

Introduction

Antiphospholipid antibodies (APA) are a wide group of immunoglobulins (Ig), among which lupus anticoagulants (LA) and anticardiolipin antibodies (aCL) are the best known and characterized (1). The main antigens are β 2-glycoprotein I and prothrombin. LA appear to be directed against β 2 glycoprotein I or prothrombin (2). It was reported that aCL bind to β 2-glycoprotein I (2). These antibodies are considered risk factors for arterial and venous thrombosis. APL do probably not cause thrombosis by themselves but rather influence the thrombotic process once negatively charged phospholipid becomes exposed (2). APA were first described in patients with systemic lupus erythematosus. APA can occur in haemolytic disorders such as sickle cell disease (SCD). Repeated sickling produce a disruption and rearrangement of red cells membranes. The exposure of negatively charged phos-

Abstract : Structural changes in sickle red cell membranes appear to be the major factor for inducing increased levels for antiphospholipid antibodies. The aim of the study was to identify antiphospholipid antibodies in homozygous sickle cell patients and to investigate the relationship with the clinical status. Antiphospholipid antibodies were investigated in 100 homozygous sickle cell patients and in 50 healthy subjects. Lupus anticoagulants were detected by clotting tests. Total antiphospholipid antibodies including anticardiolipin were determined by a semi quantitative enzyme-linked immunosorbent assay. Positive patients and the controls were analysed for antibodies to deoxyribonucleic acid and rheumatoid factors with a slide latex agglutination test. We did not find antiphospholipid antibodies in the controls. The lupus anticoagulants and total antiphospholipid antibodies frequencies were respectively 9 and 44%. One patient was positive for both. We did not find anti deoxyribonucleic acid antibodies in antiphospholipid antibodies positive patients. None of the lupus anticoagulants patients was positive for rheumatoid factors. In 9/44 (20.4%) total antiphospholipid antibodies patients, rheumatoid factors were positive with a mean value of 40 UI/ml.

Antiphospholipid antibodies were not related to the clinical status at the time samples were drawn and may be a part of a wider autoimmune disorder.

Key words : homozygous sickle cell disease, antiphospholipid antibodies, lupus anticoagulants, Abidjan

pholipids may result in the induction of antibodies against these cell membrane constituents (3).

Therefore we screened a large number of patients with SCD and control subjects with normal haemoglobin (Hb) AA for the presence of APA. The aim of the study was to identify APA in patients with SCD and to investigate the relationship between APA and the clinical status : steady states or painful vaso-occlusive crises.

Patients, material and methods

The studied population consisted of one hundred Ivorian patients with homozygous SCD (SSFA₂). 50 were in steady state and 50 in painful vaso-occlusive crises. 54 were men and 46 women (sex ratio : 1.17). The median age was 16 (range 1-39 years) (Table I). All the patients were regularly attended by the haematological department of the Teaching Hospital of Yopougon, Abidjan.

No transfusion was given in the three months before the beginning of the study.

The control group consisted of 50 healthy subjects with normal AA Hb. 26 were men and 24 women (sex ratio : 1.08). The median age was 14 (3-30). They have the same repartition as the patients with SCD for sex and age ($p>0.5$) (Table I).

Patients and control group gave their oral agreement for their participation in this study.

Blood was drawn from patients and controls both into dry tubes, into 0.109 M trisodium citrate (1 volume for 9 blood volumes) and into EDTA. Serum and platelet-poor plasma samples were obtained by two cycles of centrifugation at 2.400g for 20 min. Serum and plasma samples were frozen in small aliquots and stored at -80°C until use.

Lupus anticoagulants (LA) tests (2, 4)

LA was diagnosed according to the revised criteria proposed by the Subcommittee for Standardization of lupus Anticoagulants / phospholipid-dependent Antibodies (1,4). LA were detected by mixing procedures which are based on the activated partial thromboplastin time (APTT) determination of a mixture of one part of the patient's plasma and one part of normal plasma. Results were expressed using the numerical Rosner Index calculated according to the following formula : $100 \times (\text{mixture clotting time} - \text{normal plasma clotting time}) / \text{patient's clotting time}$. A value of ≥ 15 being abnormal. Thrombin time (TT) was measured in order to exclude other causes of the prolonged APTT before going on to other LA tests.

The tissue thromboplastin inhibition (TTI) assay was performed using a 1:500 dilution of the thromboplastin reagent (Neoplastine, Diagnostica Stago, Asnières, France) in a solution of 25 mM CaCl_2 . The test was run as a single reagent system using the prothrombin time mode. Results were expressed as the ratio of the patient to control clotting times, with a value of ≥ 1.2 being abnormal.

The phospholipid neutralization test was carried out using the Staclot LA test procedure (Diagnostica Stago, Asnières, France) which uses phosphatidylethanolamine in hexagonal phase as a source of phospholipids for neutralizing LA activity and APTT reagent sensitive to LA. Results were expressed as the decrease of the clotting

time of the plasma containing phosphatidylethanolamine as compared with that of plasma without phosphatidylethanolamine. A decrease of the clotting time ≥ 8 s being considered corrected.

ELISA test

APA directed against both cardiolipin, phosphatidic acid and phosphatidylserine were measured by a semi quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using Asserachrom APA Kit (Diagnostica Stago, Asnières, France). According to the kit, values exceeding 15 UI / ml were regarded as positive.

Only positive patients and controls were analysed for antibodies to native desoxyribonucleic acid (DNA) and rheumatoid factors (RF) with a qualitative and semi-quantitative slide latex agglutination test (Visualine ADNn and Visualine Waaler Rose, Diagnosphere bioControl, Courbevoie, France). The presence of visible agglutination indicates antibodies anti DNA concentration equal or higher than 40 UI/ml. According to the kit, the lack of agglutination indicates a RF level lower than 6 UI/ml in the sample. Results above 20 UI/ml were considered positive.

Statistical analyses

All the studied parameters were expressed as the arithmetical mean and standard error of the mean ($m \pm \text{SD}$). Comparisons between groups were analyzed by chi squared test ; p values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Patients' characteristics are shown in Table I.

Homozygous SSFA₂ patients' profile in painful crisis and in steady state were similar. The degree of haemolytic anaemia was the same in the 2 groups. Mean cell volume and platelets counts were within the normal range. However, white blood cells were higher in painful crisis ($p=0.02$, Table I).

LA and ELISA tests were negative in the control group. LA and total APA frequencies were respectively 9 and 44% (Table II). The prevalence of total APA was 52% because one patient was positive for LA and ELISA tests (Table II). Semi quantitative ELISA test didn't allow the

Table I : Characteristics of the homozygous SSFA₂ patients

	Painful crisis	Steady state	p
Age years	15 (4 - 39)	16 (1 - 36)	> 0.05
Sex M/F	28/22	26/24	> 0.05
Sex ratio	1.27	1.08	
S (%)	85.82 ± 7.36	87.07 ± 6.57	> 0.05
F (%)	12.28 ± 7.17	12.78 ± 6.75	> 0.05
A ₂ (%)	1.92 ± 1.1	2.32 ± 1.53	> 0.05
Haemoglobin (g/l)	8.35 ± 1.53	8.22 ± 1.07	> 0.05
Mean cell volume (fl)	92.25 ± 13.03	88.35 ± 9.64	> 0.05
White cells (x 10 ⁹ /l)	20.4 ± 15	14.63 ± 12.22	0.02
Platelets (x 10 ⁹ /l)	298.49 ± 133.46	389.52 ± 131.71	0.001

determination of the aCL isotypes.

APA were not related to the clinical status steady state or painful crisis at the time the samples were drawn (p > 0.05, Table II).

We did not find anti DNA antibodies in all APA positive patients. Of the 52 APA patients, 9 (17.3%) had increased values of RF (> 20 UI/ml). In these RF positive patients, LA were negative but total APA measured by semi quantitative ELISA method were increased. The frequency of RF in ELISA positive patients was 20.4% (9/44). RF were positive with a mean value of 40 (24-96) UI/ml. Six patients were in painful crises and 3 in steady states. Mean value of RF was 48 UI/ml in the

SCD patients in painful crises and 24UI/ml for the SSFA₂ patients in steady states.

Discussion

Some authors (4,5) have worked on APA in SCD.

However, these populations were heterogeneous with several variants of SCD like sickle cell thalassaemia (SFA (2) or SAFA(2), sickle cell trait (AS), sickle cell haemoglobin C (SC). Our study was confined only to homozygous SSFA (2) patients in painful crises or in steady states but with the same percentage of Hb S and foetal Hb (Hb F) (Table I). Polymerization of Hb S can be hindered by Hb F. High or low concentration of Hb F

Table II : Frequency of APA in 100 homozygous SSFA₂ patients

Control group		Patients			p
		Clinical status			
		Painful crisis	Steady state	Total	
LA	0/50 (0%)	4/50 (8%)	5/50 (10%)	9/100 (9%)	> 0.05
ELISA	0/50 (0%)	27/50 (54%)	17/50 (34%)	44/100 (44%)	> 0.05
Total		31/50 (62%)	22/50 (44%)	52/100 (52%)	

In one patient, LA and ELISA tests were positive, so the prevalence of total APA was 52%.

p > 0.05 : there were no differences between patients in painful crisis or in steady state.

has a relationship with clinical severity of SCD (6).

The elevated white blood cells during painful crisis were surely related to infectious complications (Table I).

Infections are a major cause of morbidity or mortality in SCD. Even if thrombocytopenia is often associated with APA syndrome (1), we found that the platelets counts were normal like in other study (3). However platelets counts were lower in the painful crisis than in the steady state ($p = 0.001$, Table I). SCD is associated with inflammatory illness (6). In painful crisis, patients received anti-inflammatory treatment which could explain this result.

We did not find, according to De Ceulaer (3), APA in the 50 subjects of the control group. Our study showed that APA were frequently increased in SSFA (2) patients with a prevalence of 52% (Table II). De Ceulaer (3), Nsiri (4) and Kucuk (5) had respectively a prevalence of APA of 8%, 44.4% and 68%. The differences between all these frequencies could have a relationship, on the one hand with the nature of the variants of SCD in each population and, on the other hand, with the nature of the APA they screened : LA, aCL or total APA. Nsiri (4) investigated APA on 37 patients including 18 homozygous SSFA₂, 8 S/_ thalassemia and 11 sickle trait. APA were explored by LA and Ig G and Ig M aCL. Kucuk (5) studied 25 patients with SCD. Nineteen of the 25 patients had homozygous SCD, 3 had SC disease and 3 sickle thalassemia. He detected Ig G, Ig A and Ig M aCL. De Ceulaer (3) worked on 108 patients SSFA₂ and screened the presence of Ig G aCL. The LA test was positive in 9/100 (9%) patients (Table II). Nsiri found that the frequency of LA was 62.2%. This difference may be related to the clotting tests.

Indeed, it is very hard to give precise recommendations on which assays to use for detection of LA because of the lack of a golden standard (a well-defined LA-positive patient population) (2).

Total APA including aCL were detected in 44/100 patients (Table II). This result was very similar to Nsiri (44.4%) (4). Asserachrom APA kit contains not only cardiolipin, but also other type of phospholipids such as phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidic acid. This ELISA test didn't allow us to determine aCL

(Ig G, Ig A, IgM) isotypes.

The cause of the increase of antibodies production against phospholipids in these patients is not known. A probable source for antibody generation is the sickle red cell, since the membrane of the red cell has increased hexagonal phase II content (7), which Rauch and Jan (8) have shown to be the critical factor for generation of APA.

APA formation can be induced in mice by phospholipids in a hexagonal phase II but not by phospholipids in a bilayer phase (5). Although structural changes in sickle red cell membranes appear to be the major factor for inducing increased levels of APA in patients with SCD, mechanisms of the antibodies formation against phospholipids are to date still not well established.

There was no relationship between the increase of the level of APA and the clinical status : steady states or painful vaso-occlusive crises ($p > 0.05$, Table II). It could be due to the timing of the APA measurements which are known to fluctuate (9). Membrane alterations on the sickle red cell induce phospholipids changes and the appearance of a procoagulant activity. All these factors are responsible for a procoagulant status in patients with SCD that may contribute to the vaso-occlusive process (10).

There is a growing consensus that LA is a stronger risk factor for thrombosis than aCL (1, 2). APA do probably not cause thrombosis by themselves but rather influence the thrombotic process once negatively charged phospholipids become exposed (2). There is indirect clinical support for the concept of a double-hit scenario: following mild endothelial damage, a small platelet thrombus develops (first hit) ; the slightly activated platelets expose negatively charged phospholipids ; this leads to patchy deposition of bivalent α_2 glycoprotein I-antibody complexes; these complexes cause further platelet activation and thrombus growth (second hit) (2).

Whatever the aetiopathogenesis of APA in SCD was, patients with APA did not show any more serious disease course contrary to patients without APA. This was in agreement with the observation that APA induced complications only at levels much higher than those observed in SCD (3). APA appear either in the context of a generalized immune deregulation as observed in, for example, systemic lupus

erythematosus (so called secondary APA syndrome) or without clear features of an associated immune disorder (so called primary APA syndrome) (1, 9). None of our patients was positive for anti-DNA antibodies (Table II). RF were present in 9 of the 52 (17,3%) APA positive patients (Table II). In these 9 patients, the production of APA may be a part of a wider autoimmune disorder, present in some patients with SCD (3-5, 10).

Conclusion

APA were associated with SCD. Their identification is useful to recognize patients having a higher risk to develop arterial and venous thrombotic complications, but not to predict treatment outcome and disease prognosis.

References

1. Pusterla S, Previtali S, Marziali S, Cortelazzo S Rossi A, Barbui T and Galli M. Antiphospholipid antibodies in lymphoma : prevalence and clinical significance. *The Hematology Journal* 2004 ; 5 : 341-6.
2. Arnout J and Jankowsky M. Antiphospholipid syndrome. *The Hematology Journal* 2004 ; 5 : S1-S5.
3. De Ceulaer K, Khamashta MA, Harris EN, Serjeant GR, Hughes GRV. Antiphospholipid antibodies in homozygous sickle cell disease. *Ann Rheum Dis* 1992 ; 51 : 671-72.
4. Nsiri B, Ghazouani E, Gritli N, Mazigh C, Bayouh F, Messaoud T, Fattoum S and Machghoul S. Antiphospholipid antibodies : lupus anticoagulants, anticardiolipin and antiphospholipid isotypes in patients with sickle cell disease. *Hematol Cell Ther* 1998 ; 40 : 107-12.
5. Kucuck O, Gilman-Sachs A, Beaman K, Lis LJ and Westerman MP. Antiphospholipid antibodies in sickle cell disease. *Am Journal of Hematology* 1993 ; 42 : 380-3.
6. Labie D and Elion J. Modulation polygénique des maladies monogéniques : l'exemple de la drépanocytose. *m/s* 1996 ; 12 : 341-9.
7. Westerman MP, Kleps R, Unger L, Kucuck O, Lis L. Non-lamellar phases in sickle red cells membranes. *Clin Res* 1992; 40 : 425 A.
8. Rauch J and Janoff AS. Phospholipid in the hexagonal II phase is immunogenic : evidence for immunorecognition of non-bilayer lipid phases in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 4112.
9. Goldstein R, Moulds JM, Smith CD and Sengar DPS. MHC studies of the primary antiphospholipid antibody syndrome and of antiphospholipid antibodies in systemic Lupus Erythematosus. *The J Rheumatology* 1996 ; 23 : 1173-78.
10. Elion JE, Brun M, Odievre MH, Lapoumeroulie CL and Krishnamoorthy R. Vaso-occlusion in sickle cell anemia : role of interactions between blood cells and endothelium. *The Hematology Journal* 2004 ; 5 : S195-S198.

Etude clinique et biologique de la lithiase urinaire de l'enfant dans le centre tunisien

A. ALAYA¹,
M. MEKKI²,
M. BELGUTH²,
A. NOURI²,
M.F. NAJJAR¹.

¹ Laboratoire de biochimie-
toxicologie.C.H.U, de Monastir
Tunisie

² Service de chirurgie
pédiatrique. C.H.U, de Monastir
- Tunisie

Introduction

Le terme lithiase rénale désigne la maladie caractérisée par la formation de calculs au niveau des reins ou des voies urinaires. Cette affection est environ vingt fois moins fréquente chez l'enfant que chez l'adulte (1). Son incidence est variable selon les pays, de deux par million d'habitants et par an en Grande-Bretagne à 18 en Israël (2).

L'analyse du calcul représente un élément essentiel de l'enquête étiologique, permettant de relier la pathologie lithiasique à son étiologie en particulier chez l'enfant chez qui une anomalie métabolique est souvent incriminée (3). Le but de cette étude est de préciser les caractéristiques

Résumé : Objectif : Depuis les années 80, les caractéristiques cliniques et biologiques de la lithiase urinaire de l'enfant n'ont pas cessé d'évoluer dans notre pays. Le but de ce travail est de préciser l'état clinique, biologique et thérapeutique de cette pathologie dans le centre de la Tunisie.

Matériel et Méthodes : Notre étude a concerné 104 enfants (âge : 8 mois à 16 ans) hospitalisés pour lithiase urinaire. Un bilan métabolique de première intention, urinaire et plasmatique, a été réalisé chez 96 patients. L'examen morpho-constitutionnel des calculs a été réalisé par un stéréomicroscope et leurs analyses chimiques par spectroscopie infrarouge.

Résultats : Une prédominance masculine a été notée avec un sex-ratio de 1,53. La symptomatologie clinique est dominée par les brûlures mictionnelles (28,8%). L'examen cyto bactériologique des urines était positif chez 15 patients (14,4%). Les calculs collectés avaient une localisation haute dans 75% des cas. L'identification de la composition cristalline a montré que la whewellite était l'espèce la plus fréquente aussi bien chez les enfants (80,0%) que chez les nourrissons (57,1%). L'urate acide d'ammonium était majoritairement présent chez le nourrisson.

Conclusion : la prédominance masculine de cette pathologie est devenue moins fréquente que celle décrite dans les années 80. La symptomatologie clinique est dominée par l'hématurie. Nous avons constaté une baisse des lithiases d'infection avec une stabilité des calculs d'oxalate de calcium. La lithiase endémique reste toujours d'actualité en Tunisie, même si elle est moins fréquente. L'âge des patients constitue un facteur important qui doit être pris en compte lors de l'enquête étiopathogénique. La whewellite reste le composant le plus fréquent des lithiases

Mots clés : Lithiases urinaires / enfants / nourrissons / Centre de la Tunisie

cliniques et biochimiques de la lithiase de l'enfant dans les régions du Sahel et du Centre tunisien.

Patients et méthodes

Notre étude rétrospective porte sur l'examen de 104 dossiers d'enfants lithiasiques hospitalisés dans le service de chirurgie pédiatrique du C.H.U. Fattouma Bourguiba de Monastir durant la période allant de 1994 à 2003.

Les examens radiologiques étaient présents dans seulement 88 dossiers.

Les paramètres de l'étude clinique et biologique comportant les antécédents personnels et familiaux, les cir-

constances de découverte, les données de l'examen physique et de l'imagerie et le traitement des 104 enfants, ont été recueillis sur une fiche de renseignements.

Les examens urinaires (calciurie et oxalurie) et plasmatiques (calcémie, phosphatémie) ont été retrouvés réalisés chez 96 patients. Les perturbations métaboliques qui ont été considérées comme facteurs de risque potentiellement lithogènes étaient : une hypercalciurie supérieure à 0,15 mmol/kg/24h chez le nourrisson et supérieure à 0,1 mmol/kg/24h chez les enfants, une hypercalcémie supérieure à 2,70 mmol/L chez le nourrisson et à 2,60 mmol/L chez l'enfant, une hyperphosphatémie supérieure à 2,25 mmol/L chez le nourrisson et à 1,85 mmol/L chez l'enfant et une hyperoxalurie supérieure à 0,30 mmol/L.

Tous les calculs ont été observés sous stéréomicroscope selon Daudon (4) puis analysés par spectrophotométrie infrarouge

Résultats

Epidémiologie

L'âge des enfants variait de 8 mois à 16 ans (nourrissons : âge \leq 24 mois ; enfants : âge $>$ 24 mois). Notre population montre une prédominance des enfants (90 cas : 86,5%) par rapport aux nourrissons (14 cas : 13,5%) et des garçons (n = 63) par rapport aux filles (n = 41) avec un sex-ratio de 1,53.

Examens radiologiques

L'exploration radio échographique a montré que 79 calculs (89,8%) sont radio-opaques et a mis en évidence 13 anomalies urologiques (12,5%) principalement chez les enfants (76,9%). Les principales anomalies urologiques retrouvées sont le syndrome de la jonction pyélo-urétérale dans 8 cas (61,5%), le reflux vésico-urétéral dans 4 cas (30,8%) et les valves de l'urètre postérieur dans un cas (7,7%).

Ces calculs avaient une localisation basse (urètre et vessie) dans 25% des cas et haute dans 75% des cas. Ces calculs étaient coralliformes dans 15 cas (27,7%).

L'UIV faite chez 86 patients a montré que les calculs étaient obstructifs dans 39 cas, soit 45,3% des cas.

Enquête paraclinique

Des antécédents familiaux de lithiase étaient retrouvés dans 11 cas (10,6%). Des antécédents personnels de

déshydratation ont été rapportés chez 3 patients (2,9%) et une diarrhée chronique chez un enfant (1%).

L'exploration de la fonction rénale a objectivé une insuffisance rénale organique chez un patient (1%). La symptomatologie était dominée par l'hématurie dans 32,7%, les brûlures mictionnelles et la dysurie chacun dans 28,8% et les douleurs abdominales dans 23,1% des cas. Les coliques néphrétiques n'ont été notées que dans trois cas.

Examens biologiques

Le bilan métabolique de première intention, urinaire et plasmatique, réalisé chez 96 patients (92,3%) lors de leur admission dans le service de chirurgie pédiatrique, a retrouvé des anomalies métaboliques dans 22,9% des cas. Ces perturbations métaboliques potentiellement lithogènes, sont essentiellement représentées par :

- une hypercalciurie dans 10 cas dont une associée à une hypercalcémie
- une hyperphosphaturie dans 10 cas
- une hyperoxalurie dans 2 cas.

L'examen cytotactériologique des urines (ECBU) était positif dans 15 cas (14,4%). Les germes les plus fréquemment observés étaient Escherichia Coli dans 8 cas (53,3%) et Proteus mirabilis dans 3 cas (20%). Ces infections urinaires étaient secondaires à une lithiase urinaire dans 12 cas.

Analyse physique des calculs

L'observation de la superficie et de la section des calculs sous stéréomicroscope a permis de déterminer les différents types de structures (figure 1). Les structures wheelitiques (oxalate de calcium monohydraté) de type Ia étaient prépondérantes au niveau de la section comme au niveau de la superficie, montrant ainsi le rôle important de l'hyperoxalurie de débit ou de concentration dans la survenue de cette pathologie. L'oxalate de calcium monohydraté était le composant majoritaire aussi bien chez les enfants que chez les nourrissons (tableau I). L'urate acide d'ammonium était présent dans 51 cas (49%), il était de type IIIId dans 26 cas (25%).

L'étude de la composition chimique des calculs a montré que les calculs étaient purs (composant présent à 90-95% dans le calcul) dans 37,4% des cas (oxalates 64%,

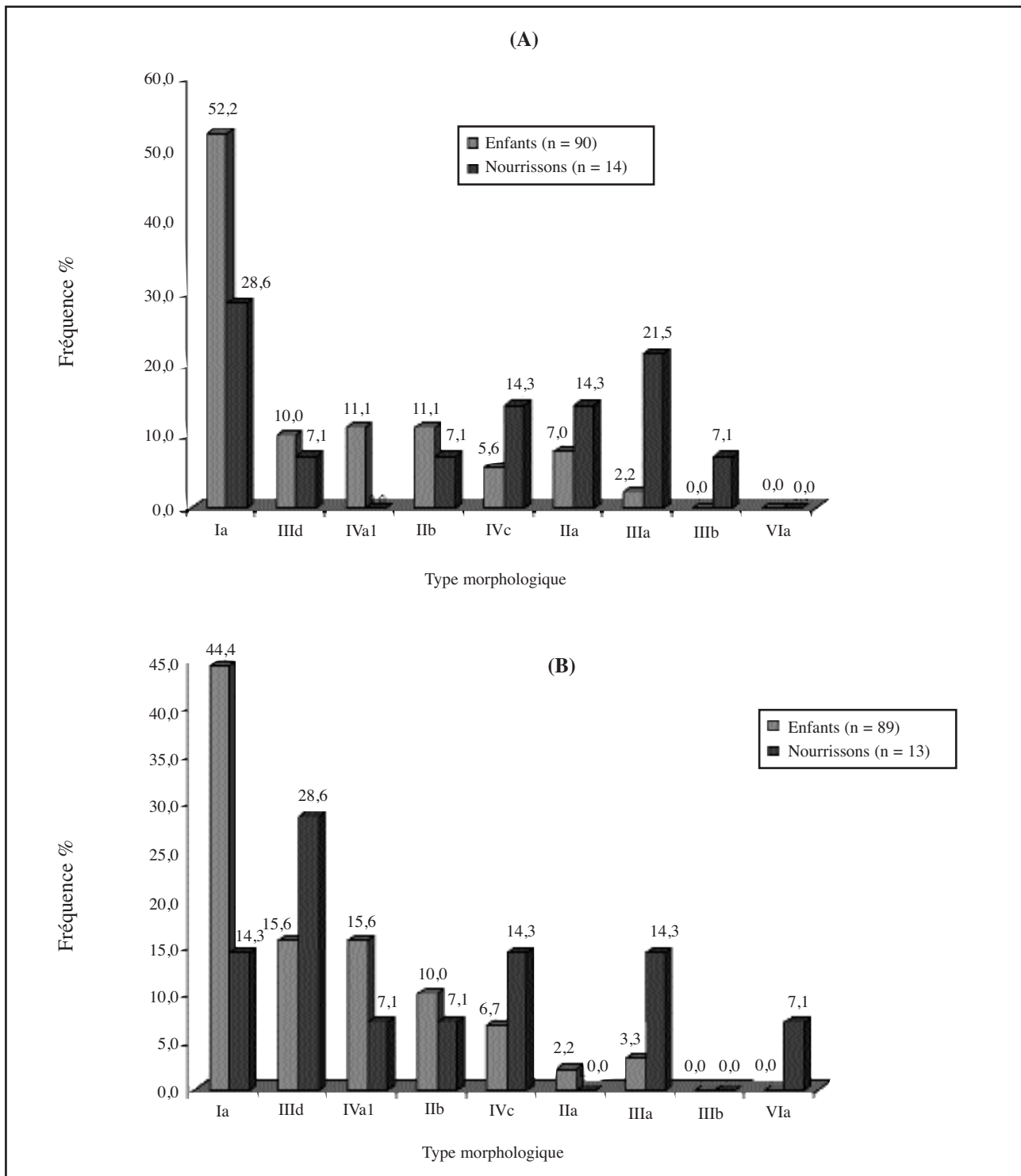


Figure 1 : Variation du type morphologique de la superficie (A) et de la section (B) des calculs en fonction de l'âge (n = 104)

Tableau I : Fréquence des composants lithiasiques dans les calculs (n = 104)

Composants lithiasiques	Nourrissons (n=14)		Enfants (n=90)		Total n=104)	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Whewellite	8	57,1	72	80,0	80	76,9
Protéines	7	50,0	53	58,9	60	57,7
Urate acide d'ammonium	8	57,1	43	47,8	51	49,0
Weddellite	3	21,4	27	30,0	30	28,8
Carbapatite	1	07,1	24	26,7	25	24,0
Struvite	2	14,3	8	08,9	10	09,6
Acide urique anhydre	3	21,4	5	05,6	8	07,6
Urate acide de sodium	1	07,1	4	04,4	5	04,8
PACC	0	00,0	2	02,2	2	02,0
Acide urique dihydraté	1	07,1	0	00,0	1	01,0

phosphates 10% et urates 26%). L'analyse infrarouge des calculs a montré que la whewellite était le composé le plus fréquemment majoritaire aussi bien chez les garçons que chez les filles (Figure 2). Les calculs coralliformes étaient présents dans 15 cas (14,4%) associés à des infections urinaires dans 33,3% des cas. Sous stéréomicroscope, les sections des calculs étaient observées dans 102 cas (Figure 3). Le noyau des calculs n'a pu être clairement individualisé que dans 6 cas (5,8%), leur composition étaient largement dominée par l'urate acide d'ammonium (83,3% des cas). Les calculs d'origine infectieuse étaient clairement identifiés grâce à leur composition chimique de la section dans 15 cas (tableau II).

Discussion

Comme dans d'autres pays du pourtour méditerranéen, la prédominance masculine de cette pathologie reste toujours d'actualité dans notre pays, avec un rapport garçons / filles de 1,53. Ce rapport est inférieur non seulement à celui observé au Maroc (5), en Algérie (6) et au Kuwait (7), mais également à ceux rapportés dans notre pays depuis les années 80 par Najjar et al (8) et Kamoun et al (9,10). En Europe, ce ratio est généralement compris entre 1,5 et 2,5 (11) ce qui est comparable à celui de notre étude.

L'étude des antécédents familiaux est particulièrement importante dans les maladies lithiasiques de l'enfant relevant d'une transmission génétique connue, à la fois pour établir le diagnostic et pour identifier les sujets à

Tableau II : Composition des sections des lithiases d'infection (n=15)

Composition de la section	Nombre de cas	%
Carbapatite	3	21,4
Struvite	1	07,1
Carbapatite+ Urate d'Ammonium	2	14,3
Struvite + Carbapatite	2	14,3
Struvite + Urate d'Ammonium	5	35,7
Whewellite + Weddellite + Carbapatite + Struvite	1	07,1

risque susceptibles de bénéficier de mesures préventives particulières (12). Ces antécédents familiaux de lithiase de l'enfant sont fréquemment retrouvés en Afrique du Nord et au Proche-Orient où la notion de consanguinité est très répandue, représentant ainsi le premier facteur de risque de lithiase urinaire de l'enfant au Kuwait (83%) (7). Ces antécédents familiaux sont retrouvés dans 10,6% des cas, ce qui est relativement faible par rapport à celui retrouvé par Kamoun et al (9), qui retrouvent 20,5% dans le Nord Tunisien.

Les anomalies métaboliques dans notre série sont jugées peu fréquentes (22,9%) par rapport à celles décelées au Kuwait (7). Cette grande différence peut être expliquée soit par l'absence de consensus sur la valeur de la biologie urinaire chez l'enfant et le nourrisson faisant que la fréquence

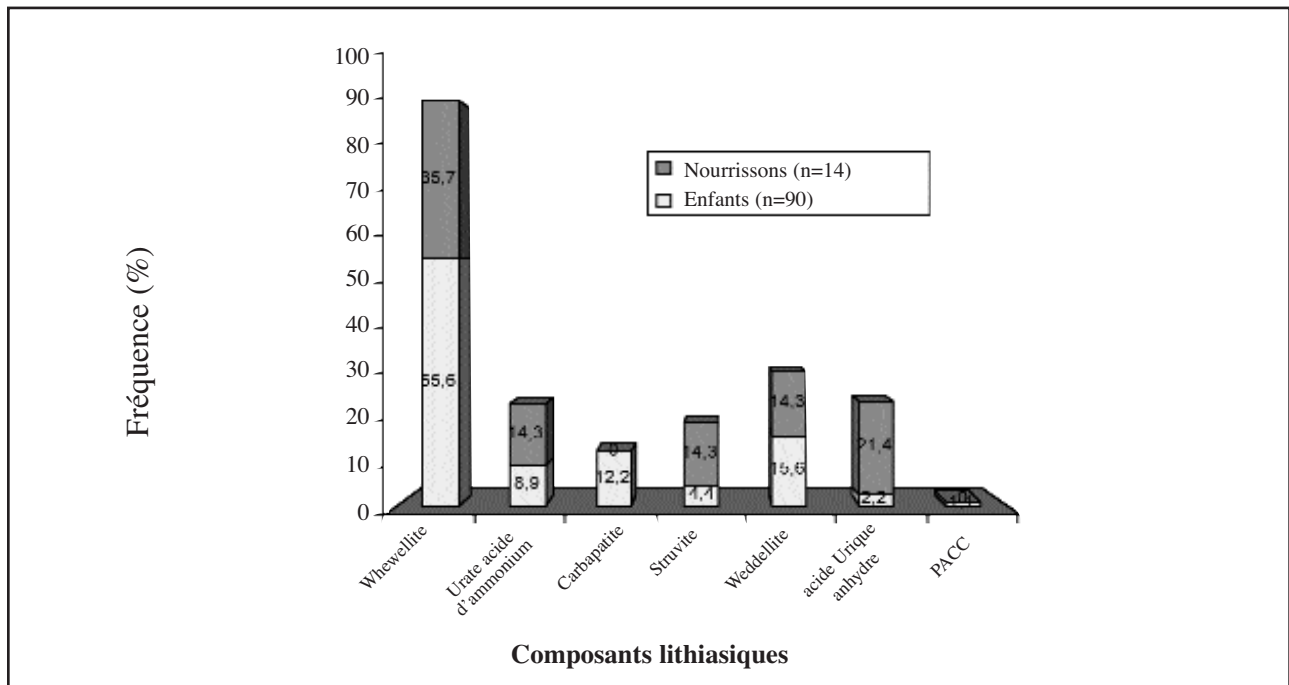


Figure 2 : Composants majoritaires (%) de la superficie des calculs (n = 104)

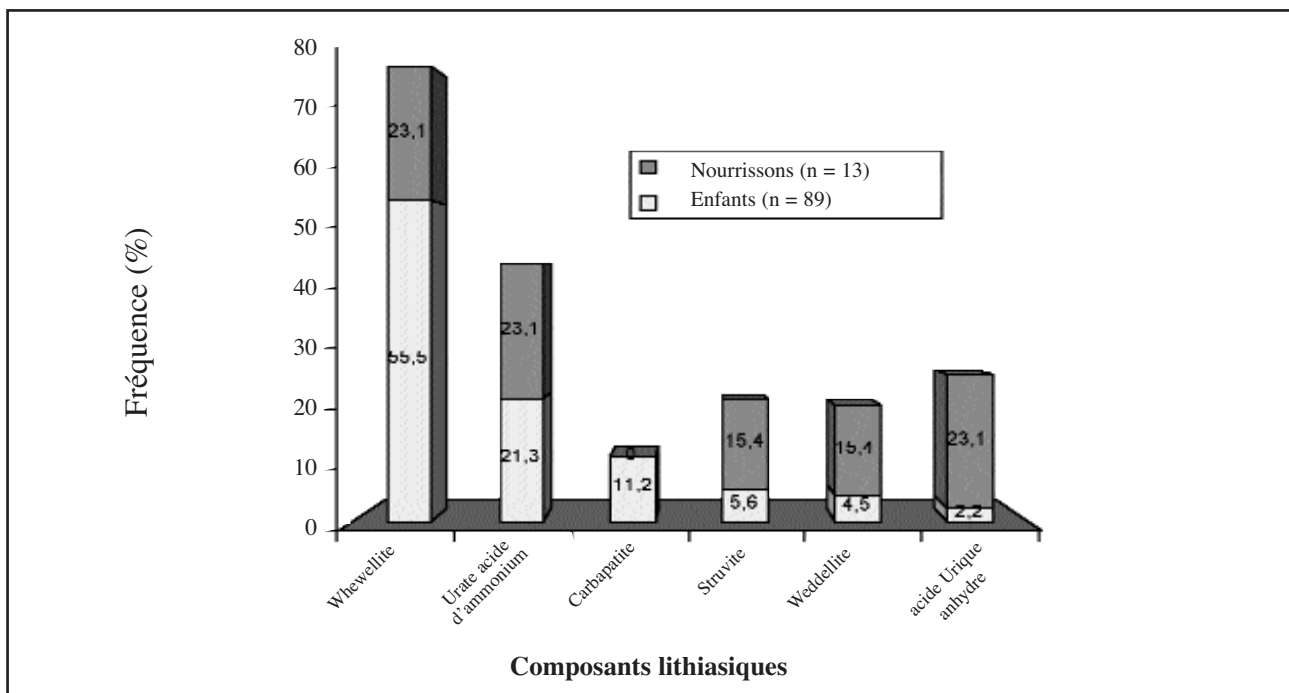


Figure 3 : Composants majoritaires (%) des sections des calculs (n = 102*)

* : Deux calculs ne présentaient pas de composé majoritaire

des anomalies métaboliques est parfois sous estimée, parfois surestimée en fonction des valeurs seuils utilisées (13), soit à une consanguinité très importante ce qui peut induire l'expression d'une maladie métabolique récessive responsable des perturbations observées (7).

Plusieurs données laissent penser que les aspects épidémiologiques de la lithiase urinaire de l'enfant dans notre région sont comparables à ceux des pays en voie de développement (10). Cependant, dans notre étude, 18,3% des calculs étaient de localisation vésicale ce qui est nettement inférieur à ceux observés au Maroc (51,1%) (5) et au Cameroun (71%) (14), plaçant ainsi le profil actuel de la lithiase urinaire dans le centre tunisien entre celui des pays développés et des pays en voie de développement. La composition chimique des calculs était dominée, chez les enfants et les nourrissons par la whewellite, ce qui est comparable aux résultats décrits au Maroc (15), au Cameroun (14) et ceux décrits auparavant en Tunisie (8, 16).

Plusieurs études ont rapporté que l'infection urinaire à germes uréasiques jouait un rôle primordial dans la survenue de lithiases, particulièrement phosphatiques (struvite) et uratiques (urate d'ammonium) (1,16,17).

D'autres travaux ont suggéré l'intervention de germes non uréasiques dans la survenue des lithiases phosphocalciques (18). Cependant, dans notre série, l'infection urinaire n'était à l'origine du processus lithiasique que dans 14,4% des cas, dont 5 étaient liées à des infections urinaires à *Escherichia coli*, ce qui montre une très nette diminution par rapport aux résultats décrits durant les années 80 dans la même région (8).

La struvite était le composé majoritaire dans 4 calculs, suggérant ainsi le rôle important des bactéries uréolétiques dans la genèse de ces calculs. Cependant, 9 calculs présentaient de la struvite dans la zone de nucléation (tableau II), indiquant que 5 autres lithiases étaient induites par les germes uréasiques. Ces résultats démontrent la grande importance de l'analyse infrarouge de la zone de nucléation et la détermination des composés majoritaires des calculs.

L'urate d'ammonium, est surtout considéré comme un marqueur de lithiases endémiques lorsqu'il est pur ou associé à l'oxalate de calcium (l'urate favorise la nuclé-

tion hétérogène de l'oxalate) et qu'il constitue le noyau des calculs (5), ce qui était le cas dans 25% des calculs de notre série, ce qui est relativement bas par rapport aux travaux décrits récemment par Kamoun et al (10).

Conclusion

La prédominance masculine de cette pathologie est moins fréquente que celle décrite dans les années 80. La symptomatologie clinique est dominée par l'hématurie. Nous avons constaté une baisse des lithiases d'infection avec une stabilité des calculs d'oxalate de calcium. La lithiase endémique reste toujours d'actualité dans le centre de la Tunisie, même si elle est moins fréquente. L'âge des patients constitue un facteur important qui doit être pris en compte lors des enquêtes étiopathogéniques. La whewellite reste le composant le plus fréquent des lithiases

Bibliographie

1. Jungers P, Daudon M, Conort P. Lithiase rénale : diagnostic et traitement. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 1999 : 173.
2. Freundlich E, Saab K, Bitterman W. Urinary calculi in children. *Urology* 1982 ; 20 : 503-505.
3. Jabouirik F, Aitoumar H, Belhadj MH. Lithiase urinaire de l'enfant : Analyse chimique à propos de 47 cas. *Rev Maghr Pédiatr* 2003 ; 13 : 289-294.
4. Daudon M. L'analyse morphoconstitutionnelle des calculs dans le diagnostic étiologique d'une lithiase urinaire de l'enfant. *Arch Pédiatr* 2000 ; 7 : 855-865.
5. Oussama A, Kzaiber F, Mernari B, Semmoud A, Daudon M. Analyse de la lithiase de l'enfant dans le moyen Atlas Marocain par spectrométrie infrarouge. *Ann Urol* 2000 ; 34:384-390.
6. Harrache D, Mesri Z, Addou A, Semmoud A, Lacour B, Daudon M. La lithiase urinaire chez l'enfant dans l'ouest algérien. *Ann Urol* 1997 ;31:84-85.
7. Al-Aisa AA, Al-Hunayyan A, Gupta R. Pediatric urolithiasis in Kuwait. *Int Urol Nephrol* 2002 ; 33:3-6.
8. Najjar MF, Najjar F, Boukef K, Oueslati A, Memmi J, Bechraoui T. La lithiase infantile dans la région de Monastir : étude clinique et biologique. *Le Biologiste* 1986 ; 165 : 31-39.

- 9.** Kamoun A, Zghal A, Daudon M, Ben Ammar S, Zrelli L, Abdelmoula J, Chaouachi B, Houissa T, Belkahia C, Lakhoua R. La lithiase urinaire de l'enfant : contributions de l'anamnèse, de l'exploration biologique et de l'analyse physique des calculs au diagnostic étiologique. *Arch Pédiatr* 1997 ; 4 : 629-945.
- 10.** Kamoun A, Daudon M, Abdelmoula J, Hamzaoui M, Chaouachi B, Houissa T, Zghal A, Ben Ammar S, Belkahia C, Lakhoua R. Urolithiasis in Tunisian children : a study of 120 cases based on stone composition. *Pediatr Nephrol* 1999 ; 3 : 920-925.
- 11.** Daudon M, Jungers P. Epidémiologie de la lithiase urinaire. *L'Eurobiologiste* 2001 ; 253 : 5-15.
- 12.** Hulton SA. Evaluation of urinary tract calculi in children. *Arch Dis Child* 2001 ; 84 : 320-323.
- 13.** Jellouli M, Jouini R, Mekki M, Belghith M, Najjar MF, Nouri A. Particularités de la lithiase urinaire du nourrisson en Tunisie. A propos de 64 observations. *Prog Urol* 2004 ; 14 : 376-379.
- 14.** Angwafo FF, Daudon M, Wonkam A, Kuwong PM, Kropp KA. Pediatric urolithiasis in sub-saharian Africa : A comparative study in two regions of Cameroon. *Eur Urol* 2000 ; 37 : 106-111.
- 15.** Bennani S, Debbagh A, Oussama A, El Mrini M, Ben Jalloun S. Spectrophotométrie infrarouge et lithiase urinaire. À propos de 80 cas. *Ann Urol* 2000 ; 34 : 376-383.
- 16.** Kamoun A, Daudon M, Kabaar N, Dhaouil R, Ben Ammar S, Zghal A, Zrelli L, Chaouachi B, Belkahia C, Lakhoua R. Facteurs étiologiques de la lithiase urinaire de l'enfant en Tunisie. *Prog Urol* 1995 ; 5 : 942-945.
- 17.** Kayal S, Berche P. Bactéries uréolytiques et lithiases urinaires. *Feuillets de Biologie* 2000 ; 236 : 15-16.
- 18.** Cohen MS, Davis CP, Czerwinski EW, Warren MM. Calcium phosphate crystal formation in *Escherichia coli* from human urine : an in vitro study. *J Urol* 1982 ; 127 : 184-185.

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 Na^+ , K^+ et 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 ^{er} cas	1 mois	37,2	F508del/F508del
2 ^{ème} 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.

Mise au point et validation d'une technique de dosage du méthotrexate par chromatographie liquide haute performance

N. JEBABLI,
A. KLOUZ,
S. TRABELSI,
H. BEN ABDA,
R. BEN ALI,
M. LAKHAL,
C. BELKAHIA

Laboratoire de Pharmacologie
Clinique, Centre National
Tunisien de Pharmacovigilance,
Tunisie

Introduction

Le méthotrexate (MTX) est un anticancéreux du groupe des anti-métabolites. Son effet est dose dépendant mais il n'existe pas de fourchette de concentrations plasmatiques bien définie pour ce médicament. On définit plutôt un seuil de toxicité.

L'utilisation clinique du méthotrexate est confrontée à plusieurs problèmes, les variations inter et intra-individuelles ainsi que le risque de survenue d'effets indésirables notamment la néphrotoxicité. Compte tenu de ces variations, la détermination de la concentration circulante est indispensable, afin de permettre d'administrer aux malades les quantités adéquates d'acide folinique [1].

Il existe différentes méthodes analytiques pour doser le méthotrexate, des méthodes immunochimiques par polarisation de fluorescence (TDX[®]) [1-2-3-4], des méthodes

Résumé : Le méthotrexate est un anticancéreux du groupe des antimétaboliques. Son potentiel toxique et la variabilité inter et intra-individuelle de sa pharmacocinétique, rendent nécessaire l'adaptation des protocoles thérapeutiques en fonction des concentrations plasmatiques. Dans ce travail nous décrivons une technique de dosage du méthotrexate par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) mise au point dans notre laboratoire et utilisable en routine, en recourant à une détection UV. Nous décrivons également les conditions opératoires optimisées de cette technique de dosage, dont la température et le débit d'élution, la composition et le pH de la phase mobile et les modalités d'extraction.

Les procédures de validations de notre technique montrent que l'imprécision de la reproductibilité et de la répétabilité est respectivement de 3,65% et de 3%. La linéarité a été vérifiée pour les concentrations comprises entre 0,03 et 500 $\mu\text{mol/l}$ avec un coefficient de corrélation de 99%. La limite de détection est de 0,02 $\mu\text{mol/l}$.

Nous avons en dernier lieu comparé deux techniques de dosage du MTX : la Chromatographie Liquide à Haute Performance et la Technique Immunologique par Polarisation de Fluorescence (FPIA)

La technique que nous avons mise au point est donc simple, rapide, fiable, reproductible, et surtout adaptée aux conditions techniques d'un laboratoire de pharmacologie clinique de routine.

Mots clés : Méthotrexate - Validation - HPLC/UV

immunoenzymatiques directes (EMIT[®]) [1-5].

Ces techniques ont l'avantage d'être facile et relativement rapide à réaliser. Toutefois ; la variation importante des concentrations plasmatiques du MTX en fonction du temps des protocoles d'hyperhydratation et des protocoles d'administrations, oblige l'utilisateur des techniques à réaliser de multiples protocoles de dilution (au moins 4 pour la technique la plus utilisée en routine de laboratoire qui est la technique immunologique par polarisation de fluorescence (FPIA)). Ces protocoles de dilution sont sources d'erreurs et de dépense supplémentaires.

Ainsi, le but de notre travail est de mettre au point une technique de dosage du méthotrexate par HPLC, fiable, facile à réaliser en pratique quotidienne et ensuite de la valider enfin de la comparer à la Technique Immunologique par Polarisation de Fluorescence (FPIA)

Matériel et méthodes

Patients et prélèvements

Nous avons effectué une étude chez 34 patients atteints de Leucémie Aiguë Lymphoblastique (LAL) au Service de Pharmacologie Clinique du Centre National de Pharmacovigilance.

Les prélèvements des malades nous ont été adressés du service d'Hématologie de l'Hôpital Aziza Othmana de Tunis, du service de Pédiatrie "B" de l'Hôpital d'enfants de Tunis et du Centre National de Greffe de Moelle Osseuse. Les malades ont reçu une forte dose de MTX (5 à 8 g/m²) en bolus intraveineux pendant 24 heures, puis les prélèvements ont été effectués à des temps différents par rapport à la fin de la perfusion : H₂₄ : 24 heures après la fin de la perfusion, H₃₆, H₄₈, H₇₂, H₉₆, H₁₂₀.

Les échantillons de sang veineux (3 à 5 ml) ont été prélevés sur tubes héparinés, après une centrifugation durant cinq minutes à 4000 tours par minute, on a récupéré le plasma.

Tous les prélèvements étaient accompagnés d'une fiche de renseignement qui comprenait les informations suivantes : Le nom et prénom du patient, âge, poids, le nom du médecin traitant, service, Hôpital d'accueil et médicaments associés. Les malades prenant la spécialité Bactrim® ont été exclus de notre étude.

Concernant la prise de méthotrexate : nom de spécialité, posologie et rythme d'administration, date du début du traitement, dernière modification de la posologie, dernière prise, date du prélèvement.

Motif de la prescription, les effets indésirables et les éventuelles pathologies associées.

Les médicaments associés : nom de spécialité, posologie.

Les effets indésirables

Le dosage des échantillons plasmatiques a été effectué par deux méthodes : HPLC (méthode mise au point) et FPIA (méthode de référence) par TDx®.

Appareillage

• HPLC

Une pompe L-6000 Merck, une colonne RP18 avec un diamètre intérieur de 4 mm et de porosité 5 µm, 250 mm, Merck. Un détecteur UV-Visible 4200 Merck ; un four L-5025 Merck. Les chromatogrammes sont enregistrés et les calculs de concentration sont effectués par

un intégrateur D-2500.

• FPIA

Automated fluorescence polarisation analyzer : 600volt-amps, 50 /60Hz, (laboratoire Abbott diagnostic division) Le TDx® Abbott utilisé est un analyseur automatique basé sur la mesure de la polarisation de fluorescence des complexes antigène anticorps formés (Fluorescence Polarisation Immuno Assay : FPIA). Les réactifs sont prêts à l'emploi et le paramètre analysé reconnu par l'appareil grâce à une identification par code à barres.

Solvants et réactifs

Acétonitrile 114291 Merck

Chloroforme 102444 Merck

Méthotrexate 9929 Sigma

Sulfaméthoxazole 7507 Sigma

Tous les réactifs et solvants utilisés dans notre travail sont de qualité HPLC.

Les tests statistiques

Les données ont été analysées au moyen du logiciel «BIOSTAT».

L'étude de la corrélation et des liaisons entre deux variables quantitatives a été réalisée par le coefficient de corrélation. La comparaison entre les deux techniques a été effectuée par le test ANOVA série appariée

Préparation des solutions

La phase mobile est constituée de 80% de tampon phosphate 40 mM (pH = 6,1) et de 20% de méthanol pur à 99%. Diluer 5,6 g de sodium dibasique anhydre dans un litre d'eau de qualité HPLC sans oublier d'ajuster le pH à 6,1 par l'ajout d'acide orthophosphorique à 85% (toujours conserver le tampon à 4°C).

Ce mélange est agité avec un agitateur magnétique pendant 10 min et l'éluant obtenu sera filtré à 0,45 µm (conservation à 4°C). La solution mère de méthotrexate (1651 µmol/l) est préparée dans le carbonate monosodique ainsi que la gamme d'étalonnage qui varie de 0,03 à 500 µmol/l. La solution mère de sulfaméthoxazole (SMX) (2 mg/ml) est préparée dans une solution constituée de phase mobile/méthanol (5/5)

Analyse qualitative des chromatogrammes obtenus

Le volume de l'échantillon après extraction est injecté

dans la boucle d'injection (50 μ l). La durée totale de l'injection est de 15 minutes.

L'analyse qualitative consiste à déterminer le coefficient de résolution entre les pics afin d'avoir une idée sur l'efficacité de la séparation

$$(R_S = 2 (TR_{SMX} - TR_{MTX}) / (W_{MTX} + W_{SMX}))$$

W_{MTX} et W_{SMX} sont les largeurs à la base des pics relatives aux solutés qui ont pour temps de rétention TR_{MTX} et TR_{EI} .

Quantification du Méthotrexate extrait

Le calcul de la concentration du MTX se fait en fonction de la hauteur des pics de MTX et de son étalon interne (EI) obtenue sur le chromatogramme et de la valeur de la constante de proportionnalité K' relative au chromatogramme témoin.

Validation de la méthode

Le calcul du coefficient de variation (CV) a permis d'évaluer les paramètres de validation. Dans notre travail nous nous sommes fixés un $CV < 5\%$.

Résultats

A- Conditions Chromatographiques

Optimisation des différents facteurs d'élution et de quantification :

• Choix de l'étalon interne

Notre technique de dosage étant quantitative, l'utilisation d'un étalon interne (EI) a été impérative. Sachant que les molécules comme le triméthoprime et le sulfaméthoxazole (SMX) sont proches structuralement du MTX, ainsi elles ont été testées comme étalon interne.

Dans les conditions de travail initiales choisies arbitrairement, l'injection de triméthoprime n'a montré aucun pic, pour le SMX un pic à 8 min. Ce dernier a été retenu car le pic de MTX et du SMX sont suffisamment séparés avec un temps d'analyse compatible avec un usage de routine de ce dosage.

• Optimisation de la longueur d'onde

Une quantité constante de MTX et de SMX a été injectée à différentes longueurs d'onde (de 257 à 330 nm). Nous avons obtenu à une longueur d'onde égale à 297 nm une bonne absorbance du MTX.

• Optimisation de la température

Après avoir varié la température entre 30°C et 70°C et déterminé les coefficients de résolution (R_S entre [0,77 ; 1,2]) nous avons retenu une température d'élution égale à 40°C (R_S égale à 1,2).

• Optimisation du débit

La variation du débit d'élution entre 0,7 ml/min et 1 ml/min montre des coefficients de résolution variant entre [0,70 ; 1,03]. Nous avons choisi un débit d'élution égal à 1 ml/min ayant un R_S de 1,2.

• Optimisation de la phase mobile et de son pH

Notre phase mobile initiale est constituée de 80% de tampon phosphate 40 mM (pH = 6,1) et de 20% de méthanol, mais dans ces conditions et même en optimisant la composition de ces derniers nous n'avons pas eu une bonne séparation entre les pics de MTX/EI. L'ajout progressif d'acétonitrile à cette phase mobile tout en diminuant la proportion de méthanol nous a permis d'avoir une bonne résolution entre les pics pour une phase mobile constituée de 82% de tampon phosphate, 12% de méthanol et 6% d'acétonitrile (R_S égale à 1,76). La variation du pH, a permis d'avoir de meilleures conditions de séparation à un pH = 4 (R_S égale à 1,77)

B- Procédure d'extraction

La quantification du MTX étant réalisé sur une matrice biologique, une étape d'extraction doit être réalisée afin d'éliminer les molécules exogènes et endogènes qui peuvent interférer avec la détection et la quantification du MTX. Ainsi une déprotéinisation est nécessaire, pour la réaliser, plusieurs réactifs ont été utilisés. Notre choix s'est porté sur l'acétonitrile. Le chloroforme a été utilisé comme solvant d'extraction nous avons obtenu une phase organique inférieure qui est le chloroforme, une phase médiane constituée de protéines dénaturées et une phase supérieure qui est l'acétonitrile qui contient les deux molécules.

50 μ l de la phase supérieure a été injecté dans le système chromatographique dans les conditions suivantes : $T^\circ = 40^\circ\text{C}$, débit = 1 ml/min ; longueur d'onde égale à 297 nm et une phase mobile constitué de (tampon phosphate/méthanol/acétonitrile). Le chromatogramme obtenu montre deux pics successifs de MTX et du SMX (figure 2).

C- Validation

• Etude de la linéarité

L'évaluation de la linéarité a été effectuée pour des concentrations allant de 0,03 à 500 $\mu\text{mol/l}$. L'étude de la régression a été réalisée par l'évaluation du coefficient de corrélation ($R = 0,99$), la pente (0,866) et l'ordonnée à l'origine (1,007). L'homogénéité des variances a été étudiée par le test de *Cochran*. Elle ne montre aucune valeur aberrante ou suspecte dans notre travail. (figure 1)

• Evaluation de la précision

Elle exprime la variabilité maximale des résultats. Le but de cet essai est la détermination de l'imprécision, de la répétabilité et de la reproductibilité pour une concentration connue de 0,4 $\mu\text{mol/l}$. Les recouvrements des moyennes, l'intervalle de confiance, le CV et l'écart-

15 min d'injection. Le dosage par TDx[®] d'un carrousel entier de 20 échantillons nécessite 10 à 30 min.

Le dosage du MTX par TDx[®] est plus rapide que par HPLC.

• Le coût de chaque technique

Le coût du dosage du MTX par HPLC, mis à part l'investissement initial pour l'acquisition du matériel (verreries: tubes à fond rond, seringue Hamilton, kit de filtration, éprouvette, etc ...), est relativement bas : 7 Dinars. Il résulte essentiellement de la consommation de solvants et de colonnes de chromatographie.

Le coût du dosage du MTX par TDx[®] est de 15 Dinars.

• Conservation des réactifs

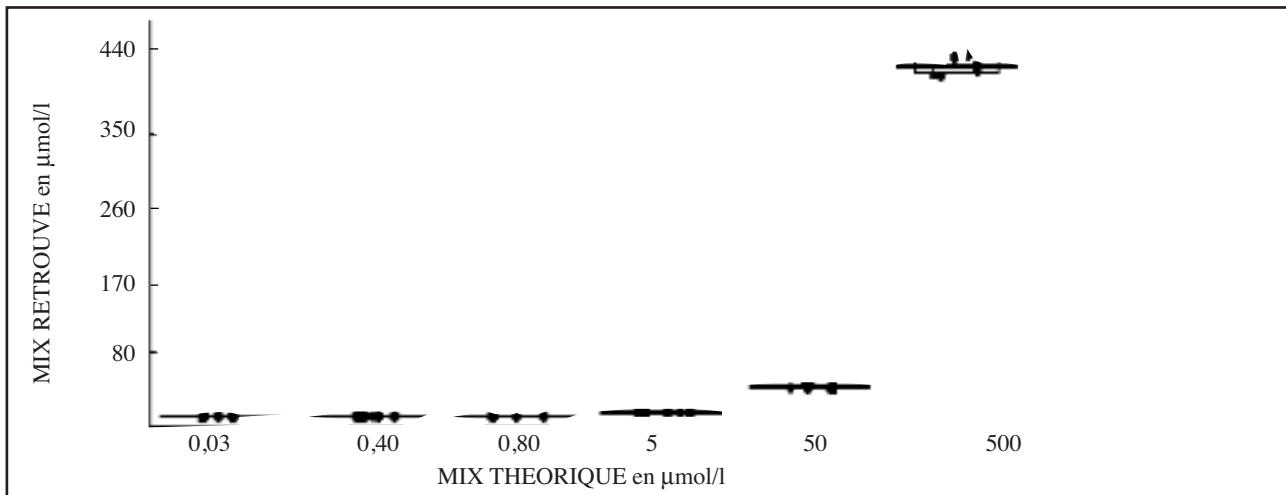


Figure 1 : Représentation de l'homogénéité des variances

Cette figure représente l'étude de l'homogénéité des variances par le test de *Cochran*.

Elle ne montre aucune valeur aberrante ou suspecte dans notre travail.

type sont mentionnés sur le tableau I.

• Limite de quantification et de détection

Les limites de quantification et de détection sont respectivement égales à 0,03 $\mu\text{mol/l}$ et 0,02 $\mu\text{mol/l}$.

D- Comparaison

Afin de comparer les deux techniques de dosage (FPIA et HPLC), nous avons pris en considération ces différents points :

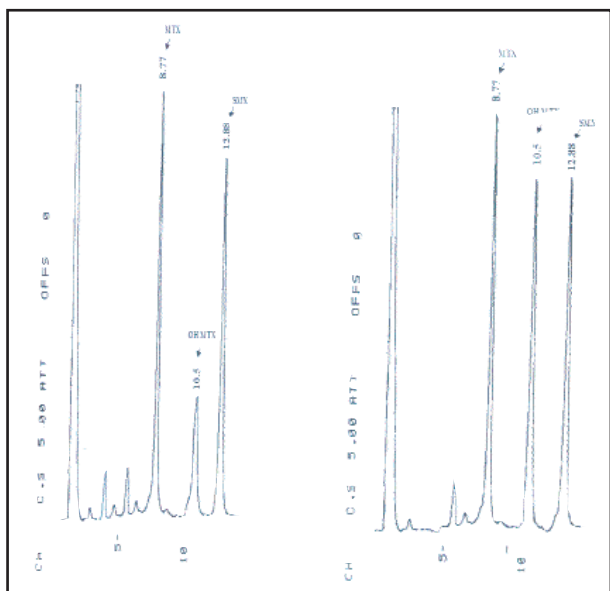
• Temps d'analyse

Pour réaliser le dosage d'un seul échantillon par HPLC il nous a fallu au moins 30 min pour l'extraction du MTX,

Les réactifs de TDx[®] nécessitent une gestion de stock en prenant en considération les dates de péremption des réactifs et d'achat plus complexe qu'avec les réactifs HPLC.

• Personnel qualifié

La HPLC exige une formation particulière des techniciens. Nous avons effectué 34 dosages par les deux techniques appropriées dont la moyenne des concentrations vaut 0,31 $\mu\text{mol/l}$ pour la chromatographie liquide avec un minimum de 0,02 $\mu\text{mol/l}$ et un maximum 1,33 $\mu\text{mol/l}$ alors que par la technique immunologique nous avons une moyenne de 0,25 $\mu\text{mol/l}$ avec des concentrations



Chromatogramme du témoin Chromatogramme du malade

Figure 2 : Tracés chromatographiques

Chromatogrammes d'un témoin et d'un malade représentant le pic de méthotrexate à 8,77 min et de son étalon interne le sulfaméthoxazole un pic à 12,88 min

les deux techniques avec $p = 0,18$ ($p > 5\%$)

Discussion

Le dosage du MTX par HPLC nécessite comme il a été rapporté dans la littérature plusieurs étapes : l'utilisation d'un EI, une déprotéinisation, une étape d'extraction et l'analyse chromatographique.

Dans notre travail après avoir testé différents étalons internes notre choix s'est porté sur le SMX en suivant une approche structurale. La littérature rapporte l'utilisation soit d'une méthode d'étalonnage externe [11] soit d'autres étalons internes comme l'aminoptérine ou le 7-hydroxyméthotrexate [10].

Sachant que le MTX se fixe à plus de 50% aux protéines plasmatiques [6] une étape de déprotéinisation doit être réalisée afin d'éliminer les molécules pouvant interférer avec le MTX et son EI. Dans la littérature plusieurs réactifs ont été utilisés, Il s'agit d'acétone [8], de butanol [8], de diéthyl éther [7], d'acide trichloroacétique [16] ou d'acétonitrile [10] ce dernier a été adopté dans notre travail pour la réalisation de la déprotéinisation.

Tableau I : Résultats de l'évaluation de la précision, des recouvrements et des intervalles de confiance de la méthode

	Concentration ($\mu\text{mol/l}$)	Moyenne des concentrations \pm Ecart type ($\mu\text{mol/l}$, n=6)	CV (%)	Moyenne des recouvrements	Intervalle de Confiance
Inter-jour	0,4	0,35 \pm 0,0126	3,61	87,5 \pm 3,16	[82,3-92,7]
Intra-jour	0,4	0,36 \pm 0,0109	3	89,4 \pm 2,73	[87,23-92,76]

L'étude de l'imprécision, de la répétabilité et de la reproductibilité sont résumés dans ce tableau qui représente : les recouvrements des moyennes, l'intervalle de confiance, le CV et l'écart-type.

allant de 0,03 $\mu\text{mol/l}$ à 1,64 $\mu\text{mol/l}$.

La valeur de la médiane pour la HPLC est de 0,115 $\mu\text{mol/l}$ et de 0,145 $\mu\text{mol/l}$ pour FPIA

L'estimation de la droite de régression, la pente est égale 0,73 avec une probabilité $< 0,0001$ et l'ordonnée à l'origine est égale à 0,026 ce qui n'est pas significativement différent de zéro ($p = 0,57$). Une corrélation acceptable $r = 0,80$ entre les résultats obtenus par les deux techniques de dosage.

L'étude statistique en ANOVA 1 facteur et séries appariées montre bien une différence non significative entre

Une étape d'extraction par le chloroforme a été réalisée afin d'éliminer les molécules qui peuvent interférer avec le MTX et son EI. La littérature rapporte l'extraction solide/ liquide se faisant avec les cartouches d'extraction [6-13-14-15] et même des techniques de dosage ne faisant pas appel à une extraction [16].

La détection du MTX à été faite à des longueurs d'onde allant de 295 nm à 313 nm [2-6-7-10-14-16]. Dans notre technique nous avons opté pour une longueur d'onde égale à 297 nm, laquelle nous a permis

d'avoir la meilleure détection.

La température d'élution habituellement utilisée dans la littérature est généralement la température ambiante. Dans notre travail nous avons opté pour une température de 40°C. Par ailleurs le débit d'élution décrit dans les publications varie de 1 à 1,5 ml/min. Notre choix s'est porté sur un débit de 1 ml/min (R_s égale à 1,2)

D'après les références bibliographiques l'étude de la linéarité a été effectuée de 0,03 à 0,30 $\mu\text{mol/l}$ avec un coefficient de corrélation $R = 0,99$ [6-10] et de 0,15 à 1 $\mu\text{mol/l}$ avec $R = 0,99$ [13-16]. Dans notre analyse la linéarité est allée de 0,03 à 500 $\mu\text{mol/l}$ avec des coefficients de variations allant de 1,42 à 3,41% et un coefficient de corrélation égal à 0,99 ($P < 0,001$). L'étude de la précision inter et intra-journalière dans notre travail est de 3,61% et 1,58%. Dans la littérature elle varie de 3% à 4% [6-10-13-16]. (tableau II)

Il n'est pas possible de choisir exclusivement une technique de dosage sur des arguments analytiques, il faut considérer le prix des réactifs, l'équipement et le personnel nécessaires, la rapidité de l'analyse la situation clinique du patient, la nature et le volume de l'échantillon. En effet, si le coût des réactifs nécessaires à la technique immunologique est un inconvénient majeur par rapport à la technique chromatographique, leur réalisation qui est beaucoup plus rapide ne nécessite pas de main

d'œuvre spécialisée.

Il est certain cependant que la chromatographie reste la technique de référence [12-17] qui a la plus grande gamme d'applications

Conclusion

Nous avons donc mis au point une technique simple de dosage du MTX par HPLC. Cette technique a nécessité l'utilisation d'un étalon interne. Notre choix s'est porté sur le sulfaméthoxazole moyennant une extraction Liq/Liq. Cette technique nous a permis d'avoir un pic de MTX et de son étalon interne bien définis avec un bon coefficient de résolution.

La validation de notre technique montre qu'elle est linéaire dans la plage des concentrations allant de 0,03 $\mu\text{mol/l}$ à 500 $\mu\text{mol/l}$ avec un coefficient de corrélation $R_{\text{liq/liq}} = 0,9994$, reproductible avec un $CV_{\text{liq/liq}} = 3,61\%$, répétable avec un $CV_{\text{liq/liq}} = 1,58\%$. Les limites de détection et de quantification sont respectivement de 0,02 et 0,03 $\mu\text{mol/l}$. Notre technique est donc valide, fiable, facilement réalisable même en urgence.

L'application clinique de cette méthode en comparaison avec le dosage par FPIA montre une corrélation acceptable. En effet, même si on constate une différence de l'ordre de 17% entre les deux techniques, elle reste non significative ($p < 0,05$).

Tableau II : Comparaison des résultats trouvés par rapport à la littérature

Etudes	Linéarité	Precision (CV%)		R
		Inter-journalière	intra-journalière	
Notre étude	0,03 à 500 $\mu\text{mol/l}$	3,61	1,58	0,99
Aboleenn [6] Cociglio [10]	0,03 à 0,3 $\mu\text{mol/l}$	3	4	0,99
Turci [13] Nadège [16]	0,15 à 1 $\mu\text{mol/l}$	3,5	3,8	0,99

Références

1- Lennard L. Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs, Clin Pharmacol, 1999 ; 47 : 131-143.

2- Najjar TA, Matar KM, Alfawaz IM. Comparaison of a new high-performance liquid chromatography method with fluorescence polarization immunoassay for analysis of methotrexate, Therapeutic Drug Monitoring Ther Drug Monit 1992 ; 14 : 142-146.

- 3- Press J, Berkovitch M, Laxer R, Giesbrecht E, Silverman E, Klein J, and Koren G. Evaluation of therapeutic drug monitoring of methotrexate in saliva of children with rheumatic diseases, *Therapeutic Drug Monitoring* 1995 ; 17:247-250.
- 4- Sakamoto S, Matsuhisa T, Miyoshi K, Naruse R, Urayama H, Shimokawa T, Okabe K, Toki H, Motoi M, Moriwaki S. Serum monitoring of methotrexate (MTX) and 7-hydroxymethotrexate concentration in patients treated with MTX using high-pressure liquid chromatography (HPLC) and comparison of serum MTX levels between HPLC method and fluorescence polarization immunoassay (FPIA), *Gan To Kagaku Ryoho* 1991 ; 18 : 1119-25.
- 5- Albertioni F, Rask C, Eksborg S, Poulsen JH, Pettersson B, Beck O, Schroeder I, Peterson C. Evaluation of clinical assays for measuring high-dose methotrexate in plasma, *Clin Chem* 1996 ; 42 : 39-44.
- 6- Aboleneen H, Simpson J, Backes D. Determination of methotrexate in serum by high-performance liquid chromatography, *J Chromatography B Biomed Appl* 1996 ; 681 : 317-22.
- 7- Albertioni F, Pettersson B, Beck O, Rask C, Seidemen P, Peterson C. Simultaneous quantitation of methotrexate and its two main metabolites in biological fluids by a novel solid-phase extraction procedure using high-performance liquid chromatography, *J Chromatography B Biomed Sci Appl* 1995 ; 665 : 163-70.
- 8- Assadullahi TP, Dagli E, Warner JO. High-performance liquid chromatography method for serum methotrexate levels in children with severe steroid-dependant asthma, *J Chromatography* 1991 ; 565 : 349-56.
- 9- Cairnes DA, Evans WE. High-performance liquid chromatographic assay of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, 4-deoxy-4-amino-N10-methylpteroic acid and sulfamethoxazole in serum, urine and cerebrospinal fluid, *J Chromatography* 1982 ; 231 : 103-10.
- 10- Cociglio M, Hillaire-Buys D, Alric C. Determination of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate by liquid chromatography for routine monitoring of plasma levels, *J Chromatography B Biomed Sci Appl* 1995 ; 674 :101-10.
- 11- Floridia L, Pietropaolo AM, Tavazzani M, Rubino FM, Colombi A. High-performance liquid chromatography of methotrexate for environmental monitoring of surface contamination in hospital départements and assessment of occupational exposure, *J Chromatography B Biomed Sci Appl* 1999 ; 726 : 95-103.
- 12- Vassault A, Grafmeyer D, De Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation techniques, *Annales de Biologie Clinique* 1999 ; 57 : 685-95.
- 13- Turci R, Fiorentino ML, Sottani C, Minoia C. Determination of methotrexate in human urine at trace levels by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000 ; 4 : 173-9.
- 14- Turci R, Micoli G, Minoia C. Determination of methotrexate in environmental samples by solid phase extract and high performance liquid chromatography : ultraviolet or tandem mass spectrometry detection ? *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000 ; 14 : 685-91.
- 15- Watson E, Cohen JL, Chan KK. High-pressure liquid chromatographic determination of methotrexate and its major metabolite, 7-hydroxymethotrexate, in human plasma, *Cancer Treat Rep* 1978 ; 62 : 381-7.
- 16- Nadège L, Mathieu F, Stéphanie B, Alain Thuillier, and Christine Fernandez. In vitro stability of methotrexate in blood and plasma samples for routine monitoring, *Therapeutic Drug Monitoring* 2003 ; 25 : 81-87.
- 17- So N, Chandra DP, Alexander IS, Webster VJ, O' Gorman Hughes DW. Determination of serum methotrexate and 7-hydroxymethotrexate concentrations, Method evaluation showing advantages of high-performance liquid chromatography, *J Chromatography* 1995 ; 337 : 81-90.

Les infections du site opératoire sur matériel orthopédique chez l'adulte

S. BESBES¹,
S. BOUHDIBA²,
M. HACHED¹,
A. BEN GHANEM²,
M. DOUIK²

Résumé : Notre étude rétrospective a porté sur 1388 patients opérés aux services d'orthopédie adulte et de traumatologie à l'Institut Mohamed Kassab d'orthopédie, avec mise en place de matériel prothétique ou ostéosynthèse. Vingt trois patients ont développé une infection du site opératoire dont l'incidence était de 1,6%. L'âge moyen de la population était de 51 ans avec une prédominance masculine. Les facteurs favorisant la survenue de ces infections étaient : le type de matériel utilisé, le score ASA, le diabète et les antécédents de chirurgie orthopédique. Ces infections étaient monomicrobiennes pour la plupart, avec prédominance de bacilles Gram négatif. Trente six pour cent des souches isolées étaient résistantes aux antibiotiques malgré une antibioprofylaxie pratiquée selon les recommandations de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation.

Mots clés : Infection post opératoire, chirurgie orthopédique, site opératoire.

Surgical site infection on orthopaedic material

Summary : Our retrospective study concerned 1388 patients operated in adult orthopaedics and traumatology units of the Mohamed Kassab Institute of Orthopaedics, with implantation of material. Twenty three patients developed an infection of the operating site on orthopaedic material (incidence 1,6%). The average age of this population was 51 years with a male ascendancy. The favouring factors of these infections were : the type of used material, the ASA score, the diabetes and the antecedents of orthopaedic surgery. These infections were mono-microbial for the greater part, with ascendancy of negative bacilli Gram. Thirty six percent of the isolated bacteria were resistant to antibiotics. The antibiotic prophylaxis was applied according to recommendations' of

¹ Laboratoire de biologie clinique, Institut Mohamed Kassab d'orthopédie Ksar Saïd, Tunisie

² Service d'orthopédie adulte, Institut Mohamed Kassab d'orthopédie Ksar Saïd, Tunisie

Introduction

Des milliers d'interventions orthopédiques avec implantation de prothèses et de matériel d'ostéosynthèse sont effectués annuellement dans le monde. Le taux d'infections sur matériel est variable mais de faible incidence. Cependant, ces infections demeurent une complication redoutable pour le patient avec un coût considérable pour la santé publique. Les microorganismes responsables d'infections du site chirurgical sont acquis par voie endogène dans deux tiers des cas, à partir de la flore microbienne du patient (*Staphylococcus aureus*) ou par voie exogène à partir du personnel de la salle d'opération ou de l'environnement, dans un tiers des cas (*Staphylococcus coagulase négative*, *Propionibacterium acnes*) [2]. L'éradication des germes est difficile en raison d'une physiopathologie complexe : pré-

sence de biofilm. En cas d'infection post-opératoire précoce, le tableau clinique est franc. En cas d'infections retardées ou tardives, le diagnostic clinique n'est pas évident [3]. Les facteurs de risque sont nombreux mais peuvent être prévenus par des mesures d'hygiène simples, accessibles et peu coûteuses.

Notre travail a consisté à recueillir des données épidémiologiques et bactériologiques concernant ces infections et à les comparer à celles de la littérature.

Matériel et méthodes

Notre étude rétrospective s'est étalée sur une période de deux années du 01 janvier 2004 au 31 décembre 2005, réalisée dans les deux services d'orthopédie (adulte et traumatologie) de l'Institut Mohamed Kassab d'Orthopédie. Nous

avons choisi d'adopter les définitions concernant les infections nosocomiales en chirurgie, admises par le *Center of Disease Control and Prevention* (C.D.C) d'Atlanta aux Etats-Unis.

L'infection du site opératoire se définit comme «toute infection qui n'était pas présente ou en incubation à l'admission survenant dans l'année post-opératoire».

Nous avons inclus les infections superficielles, intermédiaires et profondes [4].

Nous avons analysé en revue 1388 patients dont l'intervention a nécessité la mise en place d'un matériel d'ostéosynthèse ou de prothèse. De cette étude ont été exclus : les enfants de moins de 15 ans et les fractures ouvertes. Tous les patients opérés appartenaient à la classe I d'Altemeier «chirurgie propre» et ont eu une antibio prophylaxie à base de céfapirine selon les recommandations de la Société française d'anesthésie réanimation.

Nous avons étudié les données cliniques et bactériologiques. Nous avons étudié la fréquence des infections selon le type de chirurgie, le type d'implant, le score ASA, et les facteurs de risque.

- Les facteurs de risque liés au patient : âge, obésité (selon l'indice de masse corporelle), score ASA. Selon la classification de la Société Américaine d'anesthésiologie : **ASA 1** : Patient n'ayant pas d'affection autre que celle nécessitant l'acte chirurgical, **ASA 2** : Patient ayant une perturbation modérée d'une grande fonction. **ASA 3** : Patient ayant une perturbation grave d'une grande fonction. **ASA 4** : Patient ayant un risque vital imminent. **ASA 5** : Patient moribond.

- Le délai d'apparition de l'infection selon la classification de Coventry [5] :

- Infection précoce : les premiers signes et symptômes apparaissent durant les trois premiers mois après la chirurgie.

- Infection retardée : entre le troisième mois et la fin de la deuxième année après la chirurgie.

- Infection tardive : au-delà de deux ans après l'intervention.

- L'étude statistique de notre série a été effectuée à l'aide du test de Chi2 pour la comparaison des pourcentages et le test exact de Fisher avec effectif réduit inférieur à 3 avec un seuil significatif $p < 0,05$.

Résultats

Sur les 1388 patients opérés pour mise en place de matériel orthopédique, seuls 23 dossiers ont été retenus. Ces 23 patients ont présenté les signes d'une infection sur implants dont 2/3 étaient des infections précoces et 1/3 des infections retardées. Le taux d'incidence globale était de 1,6%. Aucune infection tardive (au-delà de 2 ans) n'a été retrouvée.

L'âge moyen des patients infectés était de 51 ± 18 ans avec des extrêmes de 20 et 78 ans. La tranche d'âge présentant le taux le plus élevé de patients infectés est celle des plus de soixante ans (39,1%). Cependant la tranche d'âge des 20-40 ans et des 40-60 ans est similaire (30,4%). Le sex-ratio était de 1,3 (H/F)

Le taux d'infection était différent selon le type de chirurgie : 3,2% pour la chirurgie traumatique et de 2,9% pour la chirurgie orthopédique. Le taux d'infection le plus élevé était observé en cas de gonarthrose (3,2%), suivi par les fractures du col fémoral (2,1%), les fractures de la cheville (2%), les fractures pertrochantériennes (1,4%), les fractures du tibia (1,3%) et les coxarthroses (0,9%) (Tableau I).

Le taux d'infection était variable selon le type d'implant : les fixateurs externes (8,1%), les prothèses totales du genou (PTG) (4,9%), les prothèses céphaliques non cimentées (1,9%), les prothèses totales de hanche (PTH) non cimentées (1,4%), les plaques ou lames plaques d'ostéosynthèse (1,4%) et les enclouages centro-médullaires (ECM) (0,8%). Pour les PTH cimentées et les prothèses céphaliques scellées le taux d'infection était nul (Tableau II).

Le taux d'infection était variable selon le score ASA : le taux d'infection était de : 3,9% pour ASA 3 ; 1,4% pour ASA 1 et 0,5% pour ASA 2 et nul pour les patients ASA 4. Le taux d'infection est significativement plus élevé chez les patients ayant un score ASA égal à 3 ($p < 0,025$). (Tableau III)

Parmi les malades infectés, 61% présentaient un facteur de risque. Le taux d'infection était de 20% pour les patients aux antécédents de pathologie tumorale, 12,2% aux antécédents de chirurgie orthopédique, 4,1% pour les diabétiques et 3,5% pour les tabagiques.

Tableau I : Répartition des patients opérés, des patients infectés selon le type de chirurgie

Type de chirurgie	Pathologie Nb	Population infectée Nb (%)	
Chirurgie orthopédique	Coxarthrose 105	1 (0,9)	8 (34.8%)
	Gonarthrose 158	5 (3,2)	
	Instabilité de la rotule 2	1	
	Cal vicieux de jambe 7	1	
Chirurgie traumatologique	F de l'avant bras 6	1	15 (65.2%)
	Fracture du rachis 8	3	
	Fracture du col du fémur 95	2(2,1)	
	Fracture pertro-chantérienne 221	3(1,4)	
	Fracture du genou 7	1	
	Fracture de la jambe 16	3	
	Fracture du tibia 79	1(1,3)	
	Fracture de la cheville 41	1(2)	
Divers	Autres 743	0	

Les taux ont été calculés pour les pathologies dont le nombre de patients est supérieur à trente

Tableau II : Répartition des patients opérés, des patients infectés et taux d'infection selon le type du matériel orthopédique

Implant Nombre de patients opérés	Nombre de patients infectés	Taux d'infection (%)	P
PTH non cimentée 71	1	1,4	1
PTH cimentée 34	0	0	-
PTG 103	5	4,9	0,023
P. céphalique non cimentée 54	1	1,9	0,62
P. céphalique cimentée 14	0	0	-
Plaques 568	8	1,4	0,67
ECM 128	1	0,8	0,72
Deux implants 24	0	0	-
Fixateurs externes 37	3	8,1	0.021
Autres 355	4	1,1	
Total de patients opérés 1388	23	1,6	

PTH : prothèse totale de hanche, P. : prothèse, ECM enclouage centromédullaire,
PTG : prothèse totale de genou

Tableau III : Le taux d'infection selon le score ASA

Score ASA	Nombre d'interventions	Nombre d'infections	Taux d'infection (%)
1	986	14	1,4
2	188	1	0,5
3	202	8	3,9
4	12	0	0

article original

(Tableau IV). Le taux d'infection était significatif chez les diabétiques ($p < 0,025$) et les patients aux antécédents de chirurgie orthopédique ($p < 10^{-3}$).

Concernant le profil bactériologique ; nous avons observé 47,8% infections à germe unique, 30,4% infections à germes multiples et 21,7% infections à prélèvement stérile. Les germes retrouvés étaient majoritairement des Gram négatif (64%) alors que les Gram positif n'ont représenté que 36%. *Staphylococcus coagulase négative* était le germe le plus fréquemment identifié 6 (24%), puis *Enterobacter cloacae* 5 (20%), suivi par *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus aureus* et *Proteus mirabilis* avec un pourcentage similaire 3 (12%).

Escherichia coli a été isolé dans 2 (8%) des cas et enfin *Enterobacter amnigenus*, *Acinetobacter baumannii* et *Providencia alcalifaciens* ont été retrouvés dans 1 (4%) des cas.

Les souches identifiées étaient sauvages dans 64% des cas. Elles présentaient des résistances acquises dans 36% des cas : 66,7% des SCN étaient méticilline résistants, 20% des *E.cloacae* produisaient des β Lactamases à Spectre Etendu (β LES), 33,3% des *P. mirabilis* présentaient une pénicillinase et les *E.coli* produisaient une céphalosporinase. (Tableau VI)

Le traitement des infections était dans 25% des cas médical (antibiothérapie) et dans 75% des cas médico-chirurgical : antibiothérapie associée à l'explantation de la prothèse ou l'ablation du matériel d'ostéosynthèse associé ou non à un fixateur externe. Dans 78% des cas une bithérapie a été prescrite et adaptée au germe identifié et aux données de l'antibiogramme.

L'évolution n'a été favorable que dans 7 cas. Treize cas ont nécessité une reprise chirurgicale, 2 patients ont été

Tableau IV : Répartition des patients opérés et des patients infectés en fonction des facteurs de risque liés au terrain.

Facteurs de risque Nombre	Nombre de patients opérés n (%)	Nombre de patients infectés N (%)	Nombre de patients infectés N (%)
Diabète 144	235 (17%)	6 (4,2)	14 (61%)
Tabac 28		1 (3,6)	
Obésité 1		0	
Corticothérapie 3		0	
		0	
Polyarthrite rhumatoïde 5		1 (20)	
		6 (12,2)	
Cancer 5			
Antécédent de chirurgie orthopédique 49			
Absence de facteurs de risque 1153	(83%)	9 (39%)	9 (39%)
Total	1388	23	

Les bacilles Gram négatif étaient plus importants que les cocci Gram positif, dans les infections mono-microbiennes. L'association d'un cocci Gram positif et d'un bacille Gram négatif était la plus fréquente pour les infections poly-microbiennes. (Tableau V).

D'après les données recueillies à partir des antibiogrammes

recontaminés par un autre germe et un patient est décédé d'un choc septique.

Discussion

L'incidence globale des infections du site opératoire sur matériel dans notre série était de 1,6%. Cette valeur se situe

Tableau V : Répartition des germes selon le type de l'infection.

		Morphologie	Nombre de cas	Taux d'infection (%)	
Infections mono-microbiennes	Cocci Gram +	<i>SCN</i>	3	27,8	61,1
		<i>S. aureus</i>	2		
	BGN	<i>Enterobacter cloacae</i>	3	33,3	
		<i>Pseudomonas spp</i>	2		
		<i>Proteus mirabilis</i>	1		
Infections poly-microbiennes	2 BGN	<i>E. cloacae + P. aeruginosa</i>	1	16,7	38,9
		<i>P. mirabilis + P. alcalifaciens</i>	1		
		<i>E. amnigenus + E. coli</i>	1		
	1 Cocci Gram + et 1 BGN	<i>S. aureus + E. cloacae</i>	1	22,2	
		<i>SCN + P. mirabilis</i>	1		
		<i>SCN + E. coli</i>	1		
		<i>SCN + A. baumannii</i>	1		

BGN : Bacilles Gram négatif

Tableau VI : Répartition des germes selon leur sensibilité aux antibiotiques

Germes	Sensibilité aux antibiotiques		% de résistance aux antibiotiques
	Souches sauvages	Souches résistantes	
SCN	2 Méti-S	4 Méti-R	66,7%
<i>E. cloacae</i>	4	1 β LSE	20%
<i>P. mirabilis</i>	2	1 Présence de pénicillinase	33.3%
<i>E. coli</i>	0	2 Présence de céphalosporinase	100%

β LSE : Bêta lactamase à spectre élargi

dans les limites de la littérature actuelle. En effet les résultats retrouvés par des auteurs tels que Pittet D. et Bernard L. sont respectivement de (0,2-2,5%) et (1-2%).[7]

La survenue d'une infection sur matériel orthopédique est favorisée par plusieurs facteurs de risque :

1/ Liés à la chirurgie comme le lavage des mains, le respect des conditions d'asepsie, la stérilisation des instruments chirurgicaux.

2/ Liés à l'environnement : l'aérocontamination, le type de salle opératoire, la peau du patient.

3/ Liés au terrain : l'âge, la dénutrition, l'obésité, les traitements immuno-suppresseurs, le tabagisme, l'infection à distance du site opératoire et les pathologies associées : le diabète, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, le cancer,

la drépanocytose, l'hémophilie, l'infection larvée ou en rémission [8,9,2].

Nous avons étudié certains de ces facteurs :

D'une manière générale, les âges extrêmes de la vie constituent un facteur de risque pour l'infection du site opératoire. Pour notre série, l'âge n'était pas un facteur de risque comme cela est rapporté par les études de Fitzgerald en 1977 [10] et Surin en 1983 [11] pour lesquels l'âge du malade (même supérieur à 65 ans) n'est pas associé de façon significative à la survenue d'une infection sur matériel orthopédique et ceci contrairement à d'autres auteurs dont Migaud H. *et al.* [12] pour lequel l'âge est un facteur de risque : le taux d'infection augmente pour les âges extrêmes et la tranche d'âge la

plus exposée est supérieure à 65 ans.

Pour certains auteurs, l'obésité n'est pas associée de façon statistiquement significative à la survenue d'une infection [9]. D'autres, l'ont reconnue comme un facteur de risque pour les infections nosocomiales mais pas pour les infections du site opératoire. Dans notre série, l'obésité n'a pas constitué un facteur de risque.

L'altération des mécanismes de défense pourrait faciliter la survenue d'une infection. C'est un risque difficile à apprécier bien qu'il semble évident que la présence d'un traitement immunosuppresseur (les corticoïdes, les anti-mitotiques : l'azathioprine, ou le méthotrexate) favorise la survenue d'infection du site opératoire [12]. Dans notre série, la corticothérapie n'a pas également constitué un facteur de risque pour les infections du site opératoire sur matériel orthopédique.

Le tabagisme est un facteur de risque non prouvé et le taux d'infection des patients tabagiques n'était pas significatif.

Des études ont montré que la présence d'une infection à distance du site chirurgical était associée à un risque 3 à 4 fois plus élevé d'infections au niveau du site chirurgical [9]. Concernant notre étude, les patients ne présentaient pas une infection à distance du site chirurgical.

En ce qui concerne la classification ASA, l'incidence de l'infection augmente proportionnellement avec la gravité de la classe [12].

Pour notre série, le taux d'infection variat selon la classe ASA (American Society of Anesthesiologists). Il est significativement plus élevé chez les patients ayant un score ASA égal à 3. Alors que pour la littérature l'incidence de l'infection augmente proportionnellement avec la gravité de la classe ASA [12].

Parmi les pathologies associées nous avons retrouvé : le diabète, facteur de risque d'infection nosocomiale et d'infection du site opératoire [9,13]. La polyarthrite rhumatoïde doublait le risque d'infection après chirurgie prothétique par rapport aux autres pathologies rhumatismales [12]. Il existe peu de cas publiés d'infections après intervention orthopédique chez des malades ayant un cancer.

Les prothèses totales du genou et les fixateurs externes ont présenté des taux d'infections significatifs par rapport aux autres types d'ostéosynthèse. Les fixateurs externes

avaient un taux d'infection le plus élevé (8,1%) en raison de la difficulté de stabilisation du foyer fracturaire et des fiches externes qui restent en contact avec le milieu extérieur contaminant. Les prothèses totales du genou avaient un taux d'infection de 4,9%. Ceci s'expliquerait par la proximité cutanée. Pour les autres séries ce taux est variable : il est de 2,7% pour le Centre de Coordination de lutte contre les infections nosocomiales Est [6] et il varie entre 0,87 et 2,22% pour le Center For Diseases Control (CDC) [9].

Pour les prothèses totales de hanche, notre étude a rapporté un taux d'infections de 1,4%, comparable au registre norvégien dont le taux est de 1% [22] et 1,3% pour le Centre de coordination de lutte contre les infections nosocomiales Est [6].

Dans notre étude, les infections étaient précoces dans 69,5% des cas et retardées dans 30,4% des cas. Alors que l'équipe de Mayo Clinic a rapporté : 19% des infections sur prothèses dans les trois mois, 40% entre 3 mois et 2 ans et 41% pour plus de 2 ans [14].

Les infections mono-microbiennes étaient plus fréquentes (47,8%) que les infections poly-microbiennes (30,4%). Les infections à germes non identifiés représentaient 21,7%. Ces résultats corroborent les données de la littérature : 86% des infections sont mono-microbiennes contre 11% qui sont poly-microbiennes pour Desplaces *et al.* [15]. Le nombre d'infections à BGN (64%) était plus important que celui des cocci Gram positif (36%). Ces résultats sont contraires à ceux de la littérature où les Gram positif (Staphylocoques) sont plus importants que les Gram négatif [15]. Lecuire *et al.* rapportent 62% de Staphylocoques et 16% de BGN [16]. Nous avons une incidence d'infection à SCN plus importante que celle des *S. aureus*. Ceci est également décrit dans la littérature, en effet *S. epidermidis* est d'incidence croissante et semble prendre le pas sur *S. aureus* [17,18]. *Enterobacter cloacae* était le second germe retrouvé d'où l'importance de l'hygiène hospitalière et de la préparation du patient en pré-opératoire.

Ces infections ont été causées aussi bien par des bactéries multi-sensibles appartenant à la flore du malade (64%) que par des germes multi-résistants d'origine hospitalière (36%). 66,7% des SCN que nous avons identifié étaient des méti-R donc d'origine hospitalière alors que Lecuire et

al. ont retrouvé 33,3% de Méti-R [16].

Dans notre série, 5 infections (21,7% des cas) n'ont pas mis en évidence de germe, comme le rapporte Lecuire *et al* [16] et Boibieux *et al* [19] avec respectivement 16% et 8,6% des cas. Alors que d'autres séries rapportent des prélèvements négatifs dans 5% à 35% des cas [21]. Plusieurs explications sont possibles : Patients sous antibiotiques, prélèvements de mauvaise qualité, durée d'incubation trop courte, responsabilité d'une mycobactérie ou d'un champignon.

La prise en charge thérapeutique des patients infectés a été médico-chirurgicale dans 75% des cas. Le traitement antibiotique systémique est considéré par tous les auteurs comme indispensable. Bien que ces modalités ne soient pas consensuelles, la bithérapie est de règle pour éviter l'émergence de mutants résistants. Les impératifs de ce traitement sont une durée prolongée, la diffusion osseuse des antibiotiques et enfin l'obtention de concentrations plasmatiques élevées [21].

Sur les 23 patients infectés, l'évolution a été favorable chez 7 patients traités par antibiothérapie seulement alors que pour 13 patients une chirurgie a été associée.

La meilleure gestion de ces infections nosocomiales reste dans leur détection précoce à tous les niveaux pour la conduite et la mise à jour régulière des bonnes recommandations des pratiques hospitalières.

Références

- 1- Martin C. Antibio prophylaxie en milieu chirurgical chez l'adulte. Conférence de consensus de la SFAR. Décembre 1992. La lettre de l'infectiologie 1993 ; 8 : 310-4. Actualisation 1999.
- 2- Francioli P, Nahimana I, Widmer A. Infections du site chirurgical : revue. SWISS-NOSO 1996 ; 3 : 2-19.
- 3- Bernard L. Infections de prothèse articulaire. Med Mal Infect 2003 ; 33 : 231-239.
- 4- Horan TC et col. CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992 : a modification of CDC definitions of surgical wound infections. Infect Control Hosp Epidemiol 1992;13:606-608.
- 5- Coventry MB. Treatment of infections occurring in total hip surgery. Orthop Clin North Am 1975 ; 6 : 991-1003.
- 6- CCLin Est Centre de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales Est. Réseau de surveillance des infections du site opératoire. Paris : CCLin Est ; 2004.
- 7- Pittet D, Harbarth S, Ruef C. Mesures de prévention en salle d'opération dans le cadre de la chirurgie orthopédique. Swiss-Noso 1996 ; 3 : 25-31.
- 8- Desplaces N. Infections nosocomiales en chirurgie orthopédique. Encycl Méd Chir, Appareil locomoteur 2000 ; 14-016-B-10.
- 9- Desplaces N. Facteurs favorisant l'infection en chirurgie orthopédique. In : Cahiers d'enseignement de la SOFCOT n° 84. L'infection en chirurgie orthopédique. Paris : Elsevier; 2003.p. 113-121.
- 10- Fitzgerald RH, Nolan DC, Ilstrup DM, Van Scoy RE, Washington JA, Coventry MB. Deep wound sepsis following total hip arthroplasty. J Bone Joint Surg 1977;59:847-855.
- 11- Surin VV, Sundholm K, Backam L. Infection after total hip replacement with special reference to a discharge from the wound. J Bone Joint Surg 1983;65:412-418.
- 12- Migaud H, Seneville E, Gougeon F, Marchetti E, Amzallag M, Laffargue P. Risque infectieux en chirurgie Orthopédique. Annales de réadaptation et de médecine physique 2005;48:590-597.
- 13- Porcu A, Noya G, Dessenti A, Cottu P, Castiglia P, Dettori G. A new approach to the problem of surgical wound infection in clean operations. Minerva Chir 1996;51:691-696.
- 14- Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Harmsen WS et al. Risk factors for prosthetic joint infection: case control study. Clin Infect Dis 1998;27:1247-1254.
- 15- Desplaces N, Carsenti H. Diagnostic microbiologique de l'infection sur prothèse articulaire. In : Tirésias et SOFCOT, editors. Paris: Tirésias 2002, volume 2. p. 39-46.
- 16- Lecuire F, Gontier D, Carrere J, Giordano N, Rubini J, Basso M. Bilan de 10 ans de surveillance du taux d'infections du site opératoire dans un service d'orthopédie. Rev Chir Orthop 2003;89:479-486.
- 17- Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, et al. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. J Bone Joint Surg Br 1998;80:568-72.
- 18- An YH, Friedman RJ. Prevention of sepsis in total joint

arthroplasty. *J Hosp Infect* 1996;33:93-108.

19- Boibieux A, Brechignac X, Rochas B, Bouhour D, Roure C, Tigaud S, Peyramond D. 208 infections ostéo-articulaires : 4 ans de suivi. Communication RICAI, Paris, 1998. Résumé dans Peyramond D, Boibieux A : Les infections ostéo-articulaires, Paris, Ed. John Libbey, Eurotext, 2000:23-27.

20- Desplaces N. Diagnostic bactériologique et antibiothérapie des infections sur prothèse totale du genou. In : Cahiers d'enseignement de la SOFCOT n°84. Reprises de prothèses

totales du genou. Paris : Elsevier ; 2003. p. 229-236.

21- Besnier JM. Infections sur prothèse ostéo-articulaire : stratégie du traitement. Le point de vue du clinicien. In: Rouveix B, Decazes JM, editors. 23^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. 3^e Actualité en thérapeutique anti-infectieuse. Paris : Editions Médicales et Scientifiques ; 2003. p. 93-106.

22- Espehaug B, Engesaeter LB, Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Review of 10905 primary cemented total hip replacements reported to the norwegian arthroplasty register, 1987 to

informations scientifiques et nouvelles professionnelles

Agenda des manifestations scientifiques

13-15 Février 5th European Congress on Hematologic Malignancies : From clinical Science to Clinical Practice
Munich (Allemagne)

8-11 Mars Annual Conference of the association for General and Applied Microbiology
Bochum (Allemagne)

13-17 Mars American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting (AAAAI)
Washington (USA)

19-21 Mars 19th Annual meeting of the Society for Virology
Leipzig (Allemagne)

26-29 Mars The 1st Middle East Asia Allergy Asthma Immunology Congress
Dubai (Emirates)

16-19 Mai 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)
Helsinki (Finlande)

4-7 Juin 14th congress of the European Haematology Association (EHA)
Berlin (Allemagne)

7-11 Juin Euromedlab
Innsbruck (Autriche)

11-17 Juillet 22nd Congress of the International Society on Thrombosis & Hemostasis
Boston (USA)

28 Juin - 2 Juillet 3rd FEMS Congress of European Microbiologists
Goeteborg (Suède)

13-16 Septembre 2nd European Congress of Immunology
Berlin (Allemagne)

27-30 Septembre 35th European Congress of Cytology
Lisbonne (Portugal)

3-7 Octobre Congrès international Hépatite C
Nice (France)

13-17 Octobre Legionella 2009
Paris (France)

16-19 Octobre Recent Advances in Beta Cell Biology San Francisco (USA)

24-27 Octobre Annual Meeting of the American Association of Blood Banks (AABB)
New Orleans (USA)

6-11 Novembre American College of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting 2009
Miami (USA)

18-21 Novembre Medica
Dusseldorf (Allemagne)

activités de la société

Nouveau Bureau de la STBC

Le 13 juin 2008, au cours des Journées Nationales de Biologie Clinique, a eu lieu l'élection du nouveau bureau de la STBC.

La composition du nouveau bureau est la suivante :

Pr. Hedhili Abderrazek :	Président
Pr. Slama Hamida :	Vice Président
Pr. Naoufel Nabli :	Vice Président
Pr. Leila Slim :	Secrétaire Générale
Pr. Amina Elkadhi :	Vice Secrétaire
Dr. Fethy Ben Hassine :	Trésorier
Pr. Chakib Mazigh :	Vice Trésorier
Dr. Wadii Krouf :	Membre
Pr. Trabelsi Abdelhalim :	Membre

Programme scientifique des JNBC

Les JNBC se tiendront cette année à Hammamet du 14 au 16 Mai 2009. Les principaux thèmes qui seront abordés sont :

- les Salmonelloses,
- le Diagnostic anténatal et la biologie moléculaire,
- les marqueurs de l'obésité,
- le métabolisme osseux,
- les dysthyroïdies (séance d'interface clinico-biologique),
- l'intérêt de l'immuno-phénotypage lymphocytaire dans le syndrome lympho prolifératif chronique B,

- le Cannabis,
- les nouvelles théories de la coagulation,
- les maladies auto-immunes,
- la formation des biologistes.

Les JNBC 2009 seront précédées par deux formations satellites ayant pour thème la biologie moléculaire (11-13 Mai 2008), la rédaction et la lecture d'un article scientifique (14 Mai 2008)

Manifestations scientifiques

La STBC a organisé deux manifestations scientifiques :

- la première à la faculté de pharmacie de Monastir le 02/12/2008, à l'occasion de la journée mondiale du SIDA et en collaboration avec la Faculté de pharmacie et le soutien du global fund. Elle a porté sur le **risque de l'infection par le virus SIDA**

- la deuxième manifestation a eu lieu à Tunis le 18.12.2008 et a traité **des intoxications par les champignons**.

Un grand nombre de Biologistes et de scientifiques Tunisiens ont assisté à ces manifestations.

Location d'un local pour la STBC

Suite à la recommandation de l'Assemblée Générale de la STBC qui a eu lieu le 13 juin 2008, le Bureau de la STBC a loué un local sis à Ennassr Résidence Etoufik bloc A Appartement 5-2 Avenue Hedi Noura Ennassr 2

STBC : www.stbc.org.tn
Consulter notre site pour :

- plus d'information sur la convention signée entre la CNAM et le Syndicat des Biologistes de libre pratique.
- Tout contact, suggestions, participations aux activités scientifiques.
- La consultation de la Revue RTBC en ligne

activités de la société

STBC

*Société Tunisienne
de Biologie Clinique*

Thèmes retenus pour les journées scientifiques et les ateliers pratiques de la STBC 2008-2009

	Lieu	Thème	Coordinateur
14-15 /11/ 08	Hammamet	S1 Qualitologie : Concept de base Phase pré-analytique - Système documentaire - Plan d'action phase pré-analytique	Ben Amor A
26-27 /11/2008	Tunis	ST1 : Concept de base Phase pré-analytique et système documentaire	Besbes S
02/12/2008	Monastir	Journée SIDA* : Risques de l'infection à VIH	Trabelsi H - Hmida S Hedhili A
26/12/2008	Tunis	Les intoxications par les champignons	Hedhili A
15/01/2009	Monastir	Cytométrie en flux	Brahem N + Faki S
16-17 / 01/ /2009	Hammamet	S2 qualitologie : Gestion des équipements, consommables et GRH	Najjar MF
4-5 / 02 / 2009	Tunis	ST 2 : Phase analytique	Gharbi N
04/02 / 2009	Tunis	Séminaire atelier : Cytologie sanguine	Toumi NH + Nciri B
20-21 /02/2009	Hammamet	S3 Qualitologie : Evaluation du SMQ et amélioration continue	Gharbi A
12/03/2009	Tunis	Les gaz du sang	Hayet G - Sanhagi H
27 /03/ 2009	Sfax	Journée de Sfax Thème : Traitements anticoagulants - Cytologie en hématologie (Diagnostic interactif)	Kallel Ch. - Khrouf W
26/03/2009	Tunis	Séminaire atelier* : Diarrhées parasitaires et bactériennes	Chaker E - Masmoudi A
29-30 -04/ 2009	Hammamet	ST3 : Phase post analytique Hygiène et sécurité	Slim L
12-13 /05/2009	Tunis	Séminaire atelier : Biologie moléculaire	Hmida S - Masoud T
14 Pré-congrès	Hammamet	Rédaction d'articles scientifiques	B Amor A
14-15-16/05 /2009	Hammamet	JNBC	
25 /06/2009	Tunis	Séminaire atelier* : Toxicomanie	Ghorbel H + Hedhili A
21-22 /10/09	Tunis	ST4 : Evaluation du SMQ et amélioration continue	Ghariani N

ST : Séminaire pour les techniciens

* Séminaires organisés avec l'appui de GLOBAL FUND

Pour tout renseignement, contacter :

Pr. Slim L. : Secrétaire Général de la STBC - E-mail : leila.saidi@rns.tn

Pr. Hmida S. : Coordinateur du Comité Scientifique - E-mail : hmida.slama@rns.tn

instructions aux auteurs

La Revue Tunisienne de Biologie Clinique (RTBC) est publiée par la Société Tunisienne de Biologie Clinique. Les sujets publiés se rapportent à tous les aspects de la Biologie Clinique de toutes disciplines et tout mode d'exercice. La revue publie des articles originaux, des revues générales, des notes de pratique quotidienne ou de formation continue, des revues de presse ou de livres et des lettres à la rédaction. Toutes les publications se font en français, en anglais ou en arabe et doivent être obligatoirement accompagnées d'un résumé en anglais (Les lettres à la rédaction, les revues de presse ou de livres ainsi que les notes, ne requièrent pas de résumé).

Les manuscrits soumis à la revue ne doivent pas avoir fait l'objet de publication antérieure (en dehors des thèses, mémoires, ou abstracts). Les manuscrits sont soumis à aux moins deux lecteurs anonymes sélectionnés par le comité de rédaction.

Si des corrections sont demandées aux auteurs, la version corrigée doit être soumise de nouveau à la rédaction dans un délai ne dépassant pas 2 mois. Elle doit être accompagnée d'une version sur disquette informatique (logiciel word).

Une fois accepté, le manuscrit ne peut être publié dans une autre revue sans l'autorisation préalable de la RTBC.

Recommandations générales

Soumission des manuscrits

Les manuscrits sont adressés en 3 exemplaires (y compris les illustrations) au rédacteur en chef, à l'adresse suivante :

Revue Tunisienne de Biologie Clinique
Professeur Abderraouf MEBAZAA
Laboratoire de Biochimie
Hôpital La Rabta 1007-Tunis.

Les manuscrits doivent être accompagnés d'une lettre précisant la rubrique à laquelle les auteurs désirent voir apparaître leur manuscrit et les engageant quant à la non soumission à une autre revue. Cette lettre doit porter la signature de tous les auteurs.

Préparation des manuscrits

Les manuscrits doivent être rédigés en interligne 1,5, taille des caractères : 12, sur du papier format A4, en recto uniquement.

Laisser une marge de 2,5 cm des 4 côtés de la page.

Mettre les références, les tableaux et les figures sur des pages séparées du texte. Toutes les pages doivent être numérotées, en commençant par la page de titre. Les différentes sections du manuscrit doivent répondre aux recommandations suivantes :

page de titre

- le titre de la publication, reflétant son contenu (2 lignes maximum)
- les noms et prénoms des auteurs, ainsi que les adresses professionnelles des équipes (lorsqu'il existe plus d'un laboratoire d'origine, indiquer en "exposant" après chaque nom, le numéro du laboratoire correspondant).
- une adresse de correspondance avec N° de téléphone, fax et E-mail.

résumé et mots clés

- Le résumé consiste en un paragraphe unique comportant moins de 200 mots.

- Aucune abréviation ni référence ne doivent apparaître dans le résumé.

- Le résumé est suivi d'une série d'au maximum six mots clés.

remerciements

Les remerciements éventuels sont placés à la fin du texte, avec un caractère différent.

références (1)

Les références sont numérotées par ordre d'apparition dans le texte et présentées selon le modèle suivant :

Pour les articles de revues : Noms des auteurs suivis des initiales des prénoms. Titre de l'article dans la langue d'origine. Nom abrégé de la revue année ; volume : première et dernière page de l'article.

Exemple : Boscato LM, Stuart MC. Incidence specificity of interfe-

rence in two-site immunoassays. Clin Chem 1986 ; 32 : 1491-5.

(1) : *International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. N Engl J Med* 1991 ; 324 : 424-8.

Pour les articles de livres : Noms des auteurs de l'article suivis des initiales des prénoms. Titre de l'article dans la langue d'origine. In : noms et initiales des auteurs de l'ouvrage. Titre du livre. Ville, éditeur, année de publication : première et dernière page de l'article.

Exemple : Kohn RR. Aging and age related disease : Normal processes. In : Johnson HA. Relation Between Normal Aging and Disease. New York, Raven Press, 1985: 1-44.

Pour un livre : Noms des auteurs suivis des initiales des prénoms. Titre du livre. ville, éditeur, année de l'édition : nombre de pages ou les pages exactes à consulter (la 1^{ère} et la dernière).

Exemple : Forbes GB. Human body composition. New York : Springer Verlag, 1987 : 27.

tableaux et figures

Ils sont présentés sur des pages séparées du texte et numérotés respectivement en chiffres romains et arabes.

Ils sont accompagnés de titres et de légendes suffisamment clairs et explicites.

abréviations

Tout sigle ou abréviation nécessaire doit être explicité à sa première apparition dans le texte.

Rubriques

Editorial

Habituellement écrit à la demande du Comité de Rédaction, sur une question «d'actualité», par un auteur qui fait autorité sur le sujet. Il doit être court, de l'ordre de cinq pages dactylographiées et comporter moins de 10 références bibliographiques.

Revue générale

Elles ont pour objet de présenter une mise au point des connaissances et de souligner les acquisitions récentes.

Les revues générales sont normalement publiées sur invitation du comité de rédaction. Toutefois, des suggestions au rédacteur en chef peuvent être avancées.

Les recommandations de la rédaction sont identiques à celles concernant les articles originaux.

Articles originaux

Ils ont pour objet de présenter un travail original se rapportant à la résolution de problèmes en pathologie humaine et où la biologie tient une place prépondérante.

Le nombre de pages est limité à 15, illustrations, références et résumé compris.

Ils doivent comporter les sections suivantes dans l'ordre : titre, résumé, mots clés, introduction, matériel et méthodes, résultats, discussion, remerciements (éventuellement), références, tableaux et figures.

Lettres à la rédaction

Cette rubrique permet aux lecteurs de réagir à propos d'un article paru dans la RTBC, d'une nouveauté ou d'un événement en biologie clinique. La lettre doit être concise (moins de 750 mots, références comprises). Une figure ou un tableau peut y être inclus.

Notes de pratique quotidienne

Il s'agit d'un espace réservé à des articles courts consacrés à l'exercice quotidien de la biologie (évaluation technique et réactovigilance, cas cliniques, valeur sémiologique des analyses, organisation et gestion des laboratoires,...). Ces articles doivent comporter moins de 1500 mots, 2 tableaux ou figures au maximum, et moins de 15 références.