

CAHIER DE

Formation

N° 28

Biologie médicale

2003

**IMMUNOGLOBULINES
MONOCLONALES**



BIOFORMA



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA
déjà parus et distribués gratuitement* à l'ensemble des Laboratoires d'Analyses
de Biologie Médicale en FRANCE.

Ce fichier et son contenu sont la propriété de BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et
photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront
poursuivies devant les tribunaux compétents.

Seule une impression pour une copie personnelle est permise.
(étudiant, interne, biologiste de labm)

Cet ouvrage n'est pas vendu dans le commerce.

* le financement est assuré par la dotation des Caisses d'Assurance Maladie à la formation
continue conventionnelle des biologistes du secteur privé.

230 bd Raspail 75014 Paris - www.bioforma.net - bioforma@wanadoo.fr

IMMUNOGLOBULINES MONOCLONALES

Ouvrage réalisé sous la direction de :
Docteur Bach-Nga PHAM, Hôpital Beaujon, Clichy
Professeur Jean-Louis PREUD'HOMME, Poitiers

LISTE DES AUTEURS

■ Jean-Paul Fermand

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Service d'Immunopathologie
Hôpital Saint-Louis
1, avenue Claude-Vellefaux
75475 Paris Cedex 10

■ Alain Daunizeau

Praticien Hospitalier
Service de Biochimie
Centre Hospitalier Dr Schaffner
99, route de la Bassée
62307 Lens Cedex

■ Bach-Nga Pham

Praticien Hospitalier
Service d'Hématologie et Immunologie
Hôpital Beaujon
100, boulevard du Général-Leclerc
92110 Clichy

■ Liliane Intrator

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier
Service d'Immunologie Biologique
Hôpital Henri-Mondor
51, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny
94010 Créteil Cedex

■ Jacques Bienvenu

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Service d'Immunologie
Centre Hospitalier Lyon-Sud
165, chemin du Grand-Revoyet
69495 Pierre-Bénite Cedex

■ Jean-Louis Preud'homme

Professeur des Universités
86000 Poitiers

INTRODUCTION	9
IMMUNOGLOBULINE MONOCLONALE : ASPECTS CLINIQUES	11
I - Prévalence	11
II - Distribution selon l'isotype.....	11
III - Circonstances du diagnostic.....	12
IV - Démarche diagnostique.....	12
V - L'immunoglobuline monoclonale est une IgG, une IgA ou des chaînes légères isolées.....	13
VI - L'immunoglobuline monoclonale est une IgM.....	17
VII - En dehors du myélome et de la macroglobulinémie de Waldenström	18
VII.1 - Autres hémopathies.....	18
VII.2 - Plasmocytome solitaire, POEMS syndrome	19
VII.3 - Maladies des chaînes lourdes	19
VIII - Complications des immunoglobulines monoclonales.....	20
VIII.1 - Hyperviscosité, troubles de l'hémostase et fausse anémie par hémodilution	20
VIII.2 - Manifestations rénales. Amylose et maladies des dépôts d'immunoglobulines.....	21
VIII.3 - Activité auto-anticorps pathogène des immunoglobulines monoclonales : cryoglobulinémies mixtes, maladie des agglutinines froides et neuropathie des macroglobulinémies	22
IX - Devenir des gammopathies monoclonales	24
X - Bibliographie.....	25
ÉLECTROPHORÈSE DES PROTÉINES DU SÉRUM	26
I - Introduction	26

II - L'électrophorèse	26
II.1 - Séparation des molécules	26
II.2 - Analyse des molécules séparées.....	29
III - L'équipement classique.....	30
IV - Résultats	30
V - Principales applications.....	32
V.1 - Application aux protéines du sérum.....	32
V.2 - Valeurs de référence	32
V.3 - Autres applications en biologie médicale	33
VI - Interprétation des protéinogrammes	34
VI.1 - Variations quantitatives	34
VI.2 - Anomalies qualitatives	36
VI.3 - Difficultés d'interprétation	39
VII - Électrophorèse capillaire.....	42
VII.1 - Généralités.....	42
VII.2 - Instrumentation.....	42
VII.3 - Différents modes de séparation.....	43
VII.4 - Application à la séparation des protéines du sérum.....	44
VIII - Conclusion.....	46
IX - Bibliographie.....	46
IMMUNOGLOBULINES MONOCLONALES :	
RECHERCHE ET IDENTIFICATION	47
I - Généralités.....	47
II - Modalités de prélèvement	48
III - Méthodes	48
III.1 - L'immunoélectrophorèse	49
III.2 - L'immunofixation.....	53
III.3 - L'immunoempreinte	57
III.4 - L'électrophorèse capillaire de zone après immunosoustraction	57
IV - Avantages et inconvénients des différentes méthodes	60
V - Pour ou contre ?	61
VI - Conclusion.....	63
VII - Bibliographie.....	63

DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES SÉRIQUES	66
I - Les différentes méthodes de dosage	66
I.1 - Le principe de l'immunoprécipitation.....	66
I.2 - Les différentes techniques utilisant l'immunoprécipitation.....	67
II - Critères conditionnant la qualité des méthodes de dosage	71
II.1 - Phase préanalytique.....	71
II.2 - Justesse	71
II.3 - Précision	73
II.4 - Limite de détection.....	73
II.5 - Qualité des immunsérums	73
II.6 - Interférences et causes d'erreurs liées à la présence d'une immunoglobuline monoclonale.....	74
III - Contrôle de Qualité et standardisation du dosage des immunoglobulines sériques	74
III.1 - Préparations de référence internationales pour les immunoglobulines sériques	74
III.2 - Premières expériences de Contrôle de Qualité International pour les immunoglobulines.....	75
III.3 - Le matériau de référence CRM 470.....	77
III.4 - Améliorations apportées par le CRM 470 dans la standardisation du dosage des immunoglobulines.....	77
IV - Valeurs de référence des immunoglobulines	78
V - Variations pathologiques des concentrations d'immunoglobulines.....	80
V.1 - Hypogammaglobulinémies.....	80
V.2 - Hypergammaglobulinémies.....	81
VI - Conclusion.....	82
VII - Bibliographie.....	82
 CRYOGLOBULINES : MÉTHODE DE DÉTECTION ET INTERPRÉTRATION	 85
I - Introduction.....	85
II - Mise en évidence des cryoglobulines	86
II.1 - Modalités de prélèvement	86
II.2 - Obtention du sérum	86
II.3 - Résultats : lecture du sérum	86
II.4 - Causes d'erreurs	87
II.5 - Difficultés d'interprétation	88

III - Quantification de la cryoglobuline.....	88
III.1 - Détermination du cryocrite	88
III.2 - Dosage des protéines.....	89
III.3 - Dosage des protéines du cryoprécipité.....	89
IV - Caractérisation immunochimique des cryoglobulines	90
IV.1 - Isolement et purification.....	90
IV.2 - Caractérisation immunochimique	91
IV.3 - Résultats	91
V - Physiopathologie	91
V.1 - Mécanismes de la cryoprécipitation.....	91
V.2 - Mécanismes des lésions	93
VI - Manifestations cliniques associées aux cryoglobulines.....	93
VI.1 - Manifestations cutanées	93
VI.2 - Manifestations rénales.....	95
VI.3 - Manifestations neurologiques	96
VI.4 - Autres manifestations cliniques	96
VII - Maladies associées aux cryoglobulines	97
VII.1 - Hémopathies lymphoïdes	97
VII.2 - Maladies virales.....	98
VII.3 - Maladies bactériennes et parasitaires	98
VII.4 - Maladies auto-immunes	98
VIII - Cryoglobulines essentielles ou idiopathiques	99
IX - Anomalies biologiques liées à la présence de cryoglobulines.....	99
X - Conclusion.....	100
XI - Bibliographie.....	100
MALADIES DES CHAÎNES LOURDES	104
I - Généralités.....	104
II - Les protéines des maladies des chaînes lourdes	106
III - Gènes des maladies des chaînes lourdes.....	108
IV - Diagnostic biologique	111
V - Bibliographie.....	117

Pour bien interpréter la recherche d'**immunoglobuline monoclonale dans le sérum** d'un patient, il est recommandé que tout compte-rendu biologique associe systématiquement les quatre analyses suivantes :

- Électrophorèse des protéines sériques
- Identification de l'immunoglobuline monoclonale
- Dosage pondéral des immunoglobulines polyclonales
- Recherche de cryoglobulines

En fonction du contexte clinique, il ne faudra pas oublier de faire une **recherche de protéine de Bence Jones dans les urines** du patient, de façon concomitante (chapitre non traité dans ce cahier de formation consacré à la recherche d'immunoglobuline monoclonale dans le sérum).



IMMUNOGLOBULINES MONOCLONALES : ASPECTS CLINIQUES

J.P. FERMAND

La présence, dans le sérum ou les urines, d'une immunoglobuline monoclonale définit les gammopathies monoclonales. Cette situation témoigne de l'émergence d'un clone de cellules B produisant des molécules d'immunoglobulines identiques, sans préjuger du caractère bénin ou malin de ce clone. Il y a donc des gammopathies monoclonales traduisant une prolifération maligne, dont les principales sont myélome et macroglobulinémie de Waldenström, et d'autres « bénignes ». En fait, celles-ci doivent être considérées comme des situations intermédiaires « pré-malignes », à risque d'évolution vers une maladie maligne avérée, ce que les anglo-saxons traduisent en les qualifiant de « monoclonal gammopathy of undetermined significance » ou MGUS.

I. PRÉVALENCE

La découverte d'une immunoglobuline monoclonale est une éventualité fréquente. Le problème concerne environ 1 % de l'ensemble d'une population de sujets normaux âgés de plus de 25 ans, comme le montrent les études épidémiologiques réalisées en Suède et dans l'Ouest de la France. D'autres études, effectuées non plus sur des sujets normaux (en général donneurs de sang) mais sur des malades hospitalisés pour des motifs divers, retrouvent des chiffres du même ordre (0,7 % parmi 102 000 malades Italiens ; 1,2 % parmi 73 000 malades Américains).

Les immunoglobulines monoclonales se rencontrent un peu plus souvent chez l'homme que chez la femme. Elles sont rares chez les sujets de race jaune et fréquentes dans la population noire, environ deux fois plus que dans la population blanche. Surtout, l'âge est un facteur déterminant : de l'ordre de 0,2 % avant 50 ans, la prévalence des immunoglobulines monoclonales augmente progressivement pour dépasser 6 % au-delà de 70 ans. Selon une étude effectuée chez des vétérans américains, elle est de 5,4 % entre 70 et 80 ans, atteint 7,4 % entre 80 et 90 ans et dépasse 9 % chez les personnes de plus de 90 ans [1].

II. DISTRIBUTION SELON L'ISOTYPE

La classe IgG représente environ les deux tiers des immunoglobulines monoclonales. Les prévalences des IgM (15-20 %) et des IgA (10-18 %) sont du même ordre, avec d'étonnantes différences régionales concernant, en particulier, l'Ouest de la France où les IgM représentent un tiers de l'ensemble des immunoglobulines monoclonales [2]. La présence

exclusive de chaînes légères caractérise 6 à 8 % des gammopathies. L'observation de gammopathies doubles ou multiples n'est pas rare (environ 3 % des cas). Par contre, la détection d'une IgD est peu fréquente (0,2 %), celle d'une IgE exceptionnelle.

En ce qui concerne le type de chaînes légères, le rapport kappa/lambda est de l'ordre de 3/2, comme pour les immunoglobulines d'un sérum normal. Cela se rapporte aux différents isotopes de chaînes lourdes, à l'exception des IgD, quasi constamment associées à des chaînes légères lambda. La répartition en sous-classes reproduit pratiquement la distribution physiologique, les IgG1, IgG2 et les IgA1 étant les plus fréquentes.

■ III. CIRCONSTANCES DU DIAGNOSTIC

En pratique clinique, la découverte d'une immunoglobuline monoclonale s'effectue dans trois circonstances principales : devant des symptômes de la maladie sous-jacente (signes osseux d'un myélome par exemple), devant des complications rénales ou autres, dues à la protéine elle-même ou, de plus en plus souvent, de façon fortuite, du fait de la multiplication des examens de dépistage. L'un de ceux-ci est la vitesse de sédimentation (VS) dont l'augmentation justifie le plus souvent une électrophorèse des protéines sériques qui permet de distinguer les VS élevées des syndromes biologiques « inflammatoires » (avec hyper- α 2globulinémie, augmentation de la CRP et hyperfibrinémie) des VS élevées par augmentation des immunoglobulines sériques, dans leur ensemble (hypergammaglobulinémie polyclonale) ou d'une seule d'entre elles (immunoglobuline monoclonale).

Une immunoglobuline monoclonale peut être découverte de façon « fortuite » dans des situations connues pour en favoriser l'apparition, comme certaines maladies infectieuses et déficits immunitaires, primitifs ou acquis. Les infections associées aux immunoglobulines monoclonales peuvent être bactériennes (endocardite, ostéomyélite), parasitaires ou surtout virales, avec un rôle privilégié de trois virus : le virus HIV, le cytomégalovirus et le virus d'Epstein-Barr. Parmi les déficits immunitaires, un des exemples les plus intéressants est représenté par les transplantations d'organes ou médullaire dont l'évolution est marquée par l'émergence d'une immunoglobuline monoclonale pratiquement 1 fois sur 3, soit avec une fréquence plus de 10 fois supérieure à celle observée dans une population témoin. Les immunoglobulines monoclonales du transplanté, comme celles satellites d'autres déficits immunitaires ou d'infections, n'ont pas une évolution univoque : elles peuvent rester stables, annoncer une hémopathie ou, parfois, fait remarquable, disparaître spontanément, généralement en même temps que s'améliorent l'infection associée et/ou le déficit immunitaire [3].

■ IV. DÉMARCHE DIAGNOSTIQUE

Quelles qu'en soient les circonstances, la découverte d'une immunoglobuline monoclonale justifie une démarche en trois étapes [2] :

1) L'étape immunochimique permet le diagnostic, la caractérisation et la quantification de l'immunoglobuline monoclonale. Le plus souvent, l'électrophorèse des protéines sériques apporte, à elle seule, les informations essentielles en permettant de reconnaître l'existence de l'immunoglobuline monoclonale, d'évaluer sa concentration et de suspecter s'il existe ou non une diminution de la concentration des immunoglobulines polyclonales normales. L'étude des protéines urinaires (protéinurie et électrophorèse essentiellement) est particulièrement importante lors de l'exploration d'une hypogammaglobulinémie apparemment isolée, anomalie quasi constante au cours des myélomes à chaînes légères.

2) La recherche d'une prolifération lymphocytaire et/ou plasmocytaire avérée et l'inventaire des complications qu'elle entraîne (étape « d'amont ») nécessitent des examens différents selon l'isotype de l'immunoglobuline monoclonale : s'il s'agit d'une IgM, le diagnostic principal est celui de macroglobulinémie de Waldenström dont il faut rechercher la localisation médullaire et le syndrome ganglionnaire. Par contre, si l'immunoglobuline monoclonale est une IgG, une IgA ou des chaînes légères isolées, le problème dominant est de déterminer s'il existe ou non un myélome.

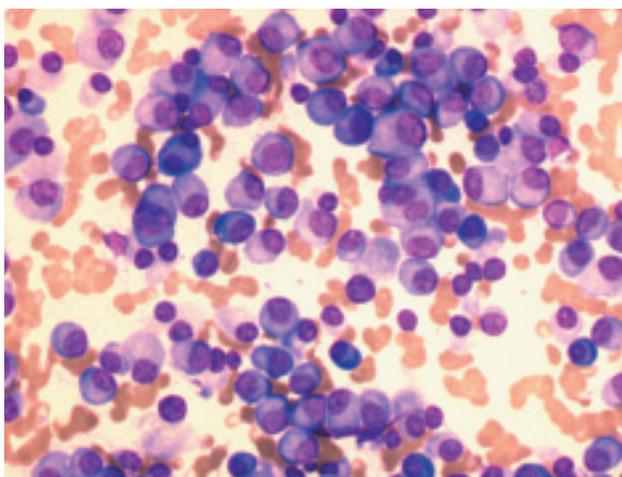
3) Certaines complications liées à la présence dans le sérum et/ou les urines de l'immunoglobuline monoclonale s'observent que l'immunoglobuline monoclonale soit ou non associée à une prolifération lymphoïde patente. Leur recherche (étape « d'aval ») est donc indépendante de l'étape précédente.

■ V. L'IMMUNOGLOBULINE MONOCLONALE EST UNE IgG, UNE IgA OU DES CHAÎNES ISOLÉES

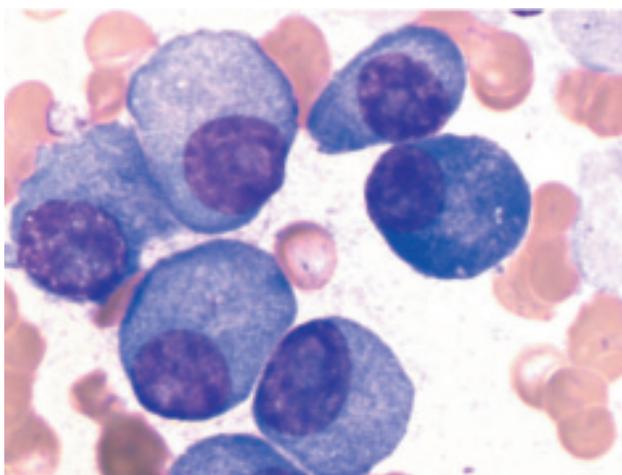
Lorsque l'immunoglobuline monoclonale est une IgG, une IgA ou est représentée par des chaînes légères isolées, les examens « d'amont » recherchent principalement une prolifération plasmocytaire médullaire maligne dont la mise en évidence, directe et/ou indirecte, permet le diagnostic de myélome. Ce diagnostic repose sur l'examen du myélogramme, analysant le pourcentage de plasmocytes et l'existence ou non d'anomalies plasmocytaires, en particulier nucléaires (chromatine fine, nucléoles anormaux). Le diagnostic de myélome est pratiquement certain s'il existe plus de 10 % de plasmocytes, surtout si certains d'entre eux sont dystrophiques (*photo 1*). A elle seule, l'existence de plasmocytes dystrophiques, même en petit nombre, est un argument très important pour considérer qu'il y a bien myélome.

La mise en évidence de complications de la prolifération renforce le diagnostic et détermine la décision de traiter. L'infiltration plasmocytaire médullaire peut être responsable d'une insuffisance médullaire dont la traduction la plus fréquente est une anémie. Les plasmocytes anormaux sécrètent également des cytokines activant les ostéoclastes et modifiant l'équilibre construction-destruction osseuse [2]. Il en résulte une ostéopénie globale et/ou prédominant dans l'environnement de foyers plasmocytaires, à l'origine d'une déminéralisation et de lésions lytiques « à l'emporte pièce » (*photo 2*). Ce syndrome osseux a fréquemment pour conséquence des douleurs, souvent d'origine fracturaire (tassement vertébral) et, éventuellement, une hypercalcémie. L'extension extra-osseuse des

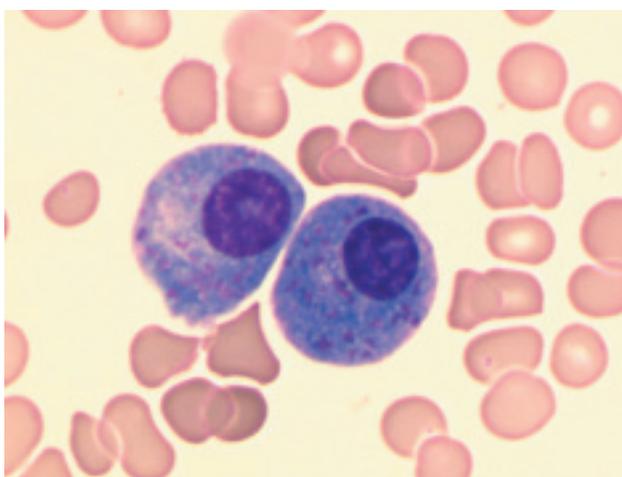
Photo 1 : Myélome multiple



1 a : Envahissement plasmocytaire médullaire massif (X 20).



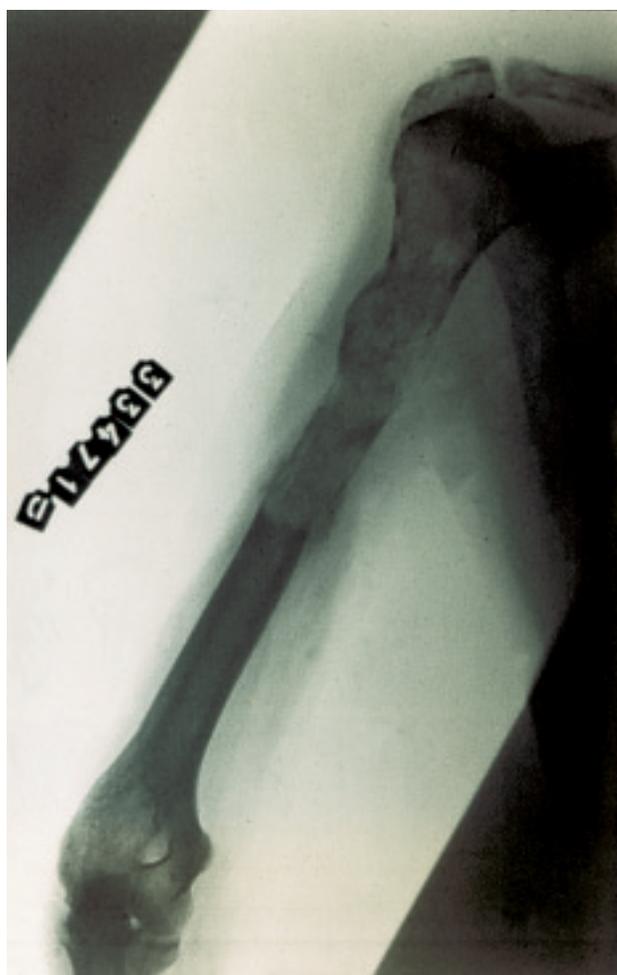
1 b : Plasmocytes dystrophiques avec volumineux nucléoles.



1 c : Plasmocytes dystrophiques avec corps de Russel intra-cytoplasmiques.



Photo 2 : Myélome multiple



Radiologie montrant une lésion ostéolytique importante.

plasmocytomes peut entraîner des symptômes compressifs, notamment une compression médullaire, généralement due à l'extension épidurale d'un foyer plasmocytaire vertébral.

Les examens nécessaires (en principe myélogramme, hémogramme, radiographies du squelette axial, calcémie et, également, créatininémie) amènent à distinguer trois situations :

1) Il y a myélome et il s'agit d'un myélome responsable de symptômes cliniques, biologiques (taux d'hémoglobine inférieur à 10 g/dL, hypercalcémie) ou radiologiques. Cette situation correspond aux stades II et III de la classification de Durie et Salmon qui intègre, également, la concentration de l'immunoglobuline monoclonale (*Table I*). Elle impose d'envisager de débiter un traitement, utilisant le plus souvent le melphalan (alkéran), qui reste le médicament essentiel de cette maladie. La chimiothérapie est en principe effectuée à fortes doses (et alors suivie d'autogreffe) chez les sujets jeunes (moins de 60 voire 65 ans), et à doses modérées, peu cytopéniantes, par cures mensuelles, chez les malades plus âgés.

2) Dans d'autres cas, il y a également myélome (présence indiscutable de plasmocytes anormaux et/ou plus de 10 % de plasmocytes dystrophiques au myélogramme), mais le malade ne présente aucun symptôme et les radiographies du squelette ne mettent pas en évidence de lésions suspectes. Actuellement, ces myélomes de faible masse tumorale et asymptomatiques (stade I de Durie et Salmon) justifient uniquement d'une surveillance, jusqu'à l'apparition d'un symptôme témoignant de l'évolution de la maladie, tout particulièrement d'une augmentation indiscutable de la concentration de l'immunoglobuline monoclonale, évaluée par électrophorèse des protéines sériques (ou urinaires). La durée de la période de surveillance, statistiquement de l'ordre de deux ans pour l'ensemble des malades, varie en fonction de la concentration initiale de l'immunoglobuline (< ou > 30 g/L), du pourcentage de plasmocytes au myélogramme (> ou < 20 %) et, de façon indépendante, des données d'un examen par résonance magnétique (IRM) du rachis [4]. Lorsque l'IRM ne retrouve pas d'anomalies osseuses infra-radiologiques, la période de stabilité dépasse souvent cinq ans.

3) La troisième situation correspond aux gammopathies monoclonales de signification indéterminée ou MGUS : le myélogramme ne montre ni excès ni dystrophie plasmocytaire, l'hémogramme est normal et les radiographies du squelette (et l'IRM du rachis, si elle est faite) ne retrouvent pas de lésion lytique suspecte. Le plus souvent, la concentration de l'immunoglobuline monoclonale est faible (< 20 g/L s'il s'agit d'une IgG ; < 10 g/L s'il s'agit d'une IgA), l'excrétion urinaire de chaînes légères libres ne dépasse pas 300 mg/jour et la concentration des immunoglobulines polyclonales normales est peu ou pas diminuée. Ces données immunochimiques, si elles renforcent le diagnostic de MGUS, ne permettent pas d'exclure un myélome. En particulier, la diminution souvent très franche de la concentration des immunoglobulines polyclonales qui caractérise la majorité des myélomes n'est pas constante et il existe même de (rares) myélomes avec hypergammaglobulinémie polyclonale.

D'autres paramètres ont été envisagés pour distinguer MGUS et myélome débutant. Le taux sérique de la β -2 microglobuline, marqueur pronostique important des myélomes, n'a pas de valeur discriminative. Aucun examen, qu'il soit immunocytologique (antigènes de membrane), cinétique (index de prolifération) ou cytogénétique (contenu en ADN, caryotype, expression d'oncogènes), n'est aujourd'hui validé en pratique courante. De fait, tous sont de réalisation et d'interprétation difficiles, en particulier du fait du faible nombre de plasmocytes anormaux au sein des myélogrammes et de leur « contamination » plus ou

TABLE I

Classification de Durie et Salmon

Établie à partir du calcul précis de la masse tumorale de quelques malades chez lesquels la quantité d'immunoglobuline monoclonale excrétée par les plasmocytes myélomateux a pu être mesurée *in vitro*, la classification de Durie et Salmon permet de distinguer, en fonction de critères cliniques et biologiques simples, des myélomes de masse tumorale faible, forte ou intermédiaire, avec ou sans insuffisance rénale.

STADE I : Myélome de faible masse tumorale ($< 0,6 \cdot 10^{12}$ cellules/m²)

Tous les critères suivants sont présents :

- 1 - Hémoglobine > 10 g/dL
- 2 - Calcémie < 120 mg/L (3 mmoles/L)
- 3 - Absence de lésion osseuse (recherchée par radiographies standards)
- 4 - Concentration de l'immunoglobuline monoclonale
 - IgG < 50 g/L
 - IgA < 30 g/L
 - BJ urines ≤ 4 g/24 h

STADE II : Myélome de masse tumorale intermédiaire (entre 0,6 et $1,2 \cdot 10^{12}$ cellules m²)

Critères de stade I et critères de stade III absents

STADE III : Myélome de forte masse tumorale ($> 1,2 \cdot 10^{12}$ cellules/m²)

Présence d'au moins un des critères suivants :

- 1 - Hémoglobine $> 8,5$ g/dL
- 2 - Calcémie < 120 mg/L (3 mmoles/L)
- 3 - Lésions osseuses multiples (décelées par radiographies standards)
- 4 - Concentration élevée d'immunoglobuline monoclonale
 - IgG > 70 g/L
 - IgA > 50 g/L
 - BJ urines ≥ 12 g/24 h

SOUS-CLASSIFICATION

Stade A : fonction rénale préservée (créatininémie < 20 mg/L)

Stade B : insuffisance rénale (créatininémie ≥ 20 mg/L)

Les myélomes avec une seule lésion osseuse radiologiquement décelable, initialement considérés comme stade I, sont maintenant plutôt classés II, dans la mesure où ils justifient d'un traitement.

moins grande par des plasmocytes normaux. Surtout, les premiers résultats apportés par des techniques discriminatives à l'échelon unicellulaire, comme l'hybridation *in situ*, suggèrent que les anomalies moléculaires considérées comme « signature » de malignité des plasmocytes myélomateux peuvent être décelées au niveau des plasmocytes des MGUS. Ainsi, certaines des translocations qui caractérisent les myélomes, associant la région « switch » des gènes des immunoglobulines (situés en 14q32) avec différents oncogènes (cycline D1 en 11q13, FGFR3 en 4p16...), sont retrouvées dans plus de la moitié des MGUS [5]. Ces constatations doivent faire considérer la plupart (toutes ?) des MGUS non pas comme des maladies authentiquement bénignes mais comme des situations pré-malignes, déjà caractérisées par un événement oncogène et susceptibles d'en subir d'autres, à l'origine de l'émergence secondaire d'un myélome.

Ainsi, lors de la découverte d'une immunoglobuline monoclonale apparemment « bénigne », aucun critère ne permet, actuellement, d'éliminer un myélome débutant et d'évaluer valablement le risque de myélome secondaire. Seules les données de l'évolution permettront de conclure et il est donc essentiel de mettre en place une surveillance prolongée.

■ VI. L'IMMUNOGLOBULINE MONOCLONALE EST UNE IgM

Lorsque l'immunoglobuline monoclonale est une IgM, le principal diagnostic à évoquer est celui de macroglobulinémie de Waldenström. Par définition, cette hémopathie associe une IgM monoclonale sérique et une prolifération lymphoïde médullaire polymorphe, comportant lymphocytes, lympho-plasmocytes et plasmocytes. Cette définition permet habituellement de distinguer la macroglobulinémie de Waldenström des autres hémopathies lymphoïdes B dont certaines, comme la leucémie lymphoïde chronique et les lymphomes non hodgkiniens d'histologies diverses, peuvent s'accompagner d'une IgM monoclonale. Il existe des formes de passage entre la macroglobulinémie de Waldenström et ces hémopathies. Par exemple, la distinction entre macroglobulinémie de Waldenström et leucémie lymphoïde chronique peut poser des problèmes nosologiques difficiles. De même, il existe des formes intermédiaires entre macroglobulinémie de Waldenström et myélome qui peuvent faire parler de myélome à IgM (IgM monoclonale avec cytologie à prédominance plasmocytaire et lyse osseuse) ou, à l'inverse, de « macroglobulinémies » à IgG ou IgA (clinique et histologie d'une macroglobulinémie de Waldenström avec sécrétion d'une IgG ou d'une IgA monoclonale).

Les explorations « d'amont » à réaliser devant une IgM monoclonale ne recherchent pas, sauf cas particulier, de signes osseux mais un syndrome ganglionnaire éventuellement associé à la prolifération médullaire. L'hémogramme peut montrer une hyperlymphocytose, rarement importante. Le myélogramme et la biopsie médullaire recherchent l'infiltration lympho-plasmocytaire et apprécient l'importance d'une éventuelle hypoplasie myéloïde associée. Les adénopathies, une éventuelle hépato-splénomégalie, sont recherchées par l'examen clinique, par une radiographie du thorax, une échographie abdominale voire un examen tomодensitométrique abdominal et/ou thoracique. La ponction d'éven-

tuelles adénopathies périphériques confirme l'infiltration lympho-plasmocytaire ; la réalisation d'une biopsie médullaire n'est le plus souvent pas nécessaire. Des localisations extra-hématopoïétiques sont possibles, leur recherche étant fonction du contexte clinique. L'observation de lésions osseuses est rare et il n'est habituellement pas utile d'effectuer des radiographies du squelette.

Comme précédemment, l'ensemble des examens dégage trois situations :

- 1) Les macroglobulinémies de Waldenström avérées et symptomatiques à traiter, pour limiter les complications, non seulement de la prolifération lymphoïde (insuffisance médullaire, compression), mais également de l'IgM monoclonale (hyperviscosité... cf infra). Les macroglobulinémies de Waldenström menaçant de devenir symptomatiques à bref délai, en particulier, celles où la concentration de l'IgM est supérieure à 30 g/L, appartiennent à ce groupe.
- 2) Les macroglobulinémies de Waldenström non symptomatiques (et dont la concentration d'IgM est faible), à surveiller, en n'envisageant de traiter que devant l'évidence d'une augmentation du syndrome tumoral, le suivi de la concentration de l'immunoglobuline monoclonale représentant, là encore, un marqueur privilégié de la masse tumorale.
- 3) Les IgM monoclonales sans prolifération lymphoïde décelable, « de signification indéterminée ».

■ VII. EN DEHORS DU MYÉLOME ET DE LA MACROGLOBULINÉMIE DE WALDENSTRÖM

VII.1 - Autres hémopathies

D'autres hémopathies peuvent s'accompagner d'une immunoglobuline monoclonale. Comme mentionné au paragraphe précédent, une IgM monoclonale, en général de faible concentration, peut accompagner une leucémie lymphoïde chronique ou un lymphome non hodgkinien d'histologies diverses. Certains types de lymphome non hodgkinien sont plus fréquemment en cause, notamment les lymphomes de Burkitt et les lymphomes de MALT et de la zone marginale. L'observation d'une IgG voire d'une IgA ou de chaînes légères isolées est également possible. La signification d'une immunoglobuline monoclonale dans ces situations n'est pas univoque : comme dans le myélome ou la macroglobulinémie de Waldenström, elle peut être produite par les cellules tumorales ; ailleurs, elle est « satellite » de l'hémopathie et témoigne uniquement du déficit immunitaire qui lui est associé. Ceci est le cas pour beaucoup des immunoglobulines monoclonales observées au cours des leucémies lymphoïdes chroniques, surtout lorsqu'on les recherche par des techniques de détection très sensibles, qui peuvent permettre d'en retrouver une (ou plusieurs) dans pratiquement 80 % des cas (contre environ 20 % avec les techniques « classiques »). Bien entendu, les immunoglobulines monoclonales que l'on peut rencontrer au cours d'hémopathies développées aux dépens de cellules de la lignée lymphocytaire T sont constamment des immunoglobulines « satellites ».

VII.2 - Plasmocytome solitaire, POEMS syndrome

Une IgG ou une IgA monoclonale peut révéler une prolifération plasmocytaire maligne concernant non plus l'ensemble de la moelle osseuse, comme dans le myélome, mais localisée. Ces situations correspondent à des plasmocytomes solitaires qui peuvent être osseux ou extra-osseux, et alors souvent ORL. L'affirmation du caractère « solitaire » de la prolifération suppose un ensemble d'examen incluant deux myélogrammes (en territoires différents) et une IRM du rachis. Les plasmocytomes solitaires sont peu fréquents mais importants à reconnaître, puisque pouvant bénéficier d'un traitement uniquement local, où la radiothérapie a une place prépondérante. Après traitement, la disparition de l'immunoglobuline monoclonale est une condition nécessaire (mais pas suffisante) pour envisager une guérison. Dans tous les cas, l'évolution peut être marquée par l'émergence d'un myélome ou, plus souvent, par la survenue d'autres localisations « solitaires ».

L'acronyme *POEMS* désigne un syndrome caractérisé par l'association d'une prolifération plasmocytaire, le plus souvent un plasmocytome solitaire, et d'une neuropathie périphérique (P pour « polyneuropathy »). Le ou les plasmocytomes ont deux particularités : ils sécrètent une immunoglobuline monoclonale (M pour « monoclonal component ») IgG ou souvent IgA qui porte quasi toujours des chaînes légères lambda ; ils s'accompagnent de lésions osseuses non pas lytiques, mais au moins en partie condensantes. Le syndrome peut s'enrichir d'autres manifestations, dont une organomégalie (O), des signes endocriniens variés (E pour « endocrinopathy ») et des signes cutanés (S pour « skin manifestations »). Fait remarquable, un traitement efficace de la prolifération plasmocytaire, par exemple l'irradiation d'une lésion localisée unique, peut permettre la disparition de l'ensemble des symptômes. A l'inverse, une rechute plasmocytaire s'accompagnera de la réapparition des signes associés, en particulier de la neuropathie [6]. Cette évolution parallèle suggère la sécrétion par les plasmocytes anormaux d'un ou d'une combinaison de facteurs agissant sur les différents organes cibles. Ces facteurs paraissent indépendants de l'immunoglobuline monoclonale et de nature cytokinique.

VII.3 - Maladies des chaînes lourdes

Contrastant avec la normalité de la grande majorité des immunoglobulines monoclonales, certaines ont une structure anormale. Le principal exemple est représenté par les maladies des chaînes lourdes, définies par la présence dans le sérum d'une immunoglobuline monoclonale constituée uniquement de deux chaînes lourdes incomplètes, tronquées, sans chaînes légères associées [7]. La maladie des chaînes lourdes γ a un tableau clinique, hématologique et anatomo-pathologique très variable, même si, le plus souvent, il s'apparente à celui d'une macroglobulinémie. La mise en évidence d'une prolifération lymphoïde maligne sous-jacente est inconstante et, surtout dans ces cas, des manifestations auto-immunes sont fréquentes. La rare maladie des chaînes lourdes μ est à évoquer devant un tableau de leucémie lymphoïde chronique avec présence de plasmocytes vacuolés sur le myélogramme. La maladie des chaînes lourdes α , la plus fréquente de ces maladies, est très habituellement découverte devant une diarrhée chronique avec syndrome de malabsorption. Les lésions progressent d'un stade initial, caractérisé par une infiltration lympho-plasmocytaire diffuse de l'intestin grêle et des gan-

glions mésentériques, à un stade tumoral marqué par l'existence d'un lymphome malin, le plus souvent immunoblastique. Le contexte épidémiologique est très remarquable : sujets jeunes, le plus souvent âgés de 10 à 30 ans, originaires pas seulement du pourtour du bassin méditerranéen mais, plus largement, de régions à bas niveau socio-économique et à conditions d'hygiène précaires. L'évolution est également remarquable, puisque, au stade initial, des rémissions complètes, incluant la disparition de la protéine anormale du sérum et du liquide jéjunal, peuvent être obtenues par la seule administration d'antibiotiques oraux. Ces données font de la maladie des chaînes lourdes α un modèle de physiopathologie des hémopathies lymphoïdes reliant des stimulations antigéniques répétées (infections intestinales) à une prolifération lymphoïde sécrétant l'immunoglobuline anormale, initialement non maligne, mais susceptible de transformation en un lymphome agressif.

■ VIII. COMPLICATIONS DES IMMUNOGLOBULINES MONOCLONALES

Qu'il y ait ou non prolifération lymphoïde avérée, il faut rechercher d'éventuelles complications liées à la protéine monoclonale elle-même. Ces manifestations d'« aval » peuvent être la conséquence d'une concentration élevée de l'immunoglobuline monoclonale, de propriétés physico-chimiques particulières ou d'une activité auto-anticorps pathogène.

VIII.1 - Hyperviscosité, troubles de l'hémostase et fausse anémie par hémodilution

Une immunoglobuline monoclonale circulante peut entraîner une hyperviscosité, une hypervolémie et des anomalies de l'hémostase. Ces perturbations, qui dépendent de la taille de la protéine monoclonale et compliquent donc surtout les IgM monoclonales [2], peuvent également s'observer avec des IgA et certaines IgG (sous-classe IgG3) ayant une tendance spontanée à s'agréger entre elles. Dans tous ces cas, le syndrome « des grosses molécules » est possible, quoique inconstant, et ne s'observe que lorsque la concentration de l'immunoglobuline est élevée, en pratique jamais inférieure à 30 g/L.

Les symptômes liés à une **hyperviscosité sanguine**, essentiellement neurosensoriels, sont le plus souvent modérés et marqués par céphalées, vertiges, hypoacousie, troubles visuels voire torpeur et somnolence. L'examen du fond d'œil est un temps diagnostique essentiel, montrant dilatation veineuse, courant granuleux, voire hémorragies, exsudats et autres signes d'ischémie. La mesure de la viscosité plasmatique, lorsqu'elle est faite, retrouve alors des chiffres très élevés, au moins 3 à 4 fois supérieurs aux valeurs normales.

Lorsqu'existe une immunoglobuline circulante de concentration élevée, l'interprétation d'une diminution du taux d'hémoglobine (et des autres paramètres quantifiant la lignée rouge) doit tenir compte d'une possible **hypervolémie plasmatique**, à apprécier, éventuellement, par mesure isotopique des volumes plasmatique et globulaire. La correction excessive d'une « fausse anémie » par des transfusions accentue la viscosité sanguine et peut entraîner des accidents de surcharge (œdème aigu du poumon).

Les **manifestations hémorragiques** sont surtout muqueuses (épistaxis, gingivorragies), parfois cutanées (ecchymoses). Elles sont le plus souvent dues à une interaction physique entre les plaquettes ou les monomères de fibrine, et l'immunoglobuline monoclonale. Il en résulte un allongement des temps de saignement et de thrombine, traduisant des anomalies des fonctions plaquettaires et de l'étape de polymérisation de la fibrine. En prévention d'un accident hémorragique, une exploration de l'hémostase incluant temps de saignement et temps de thrombine est un préalable indispensable à un geste chirurgical (y compris à une avulsion dentaire) chez tout malade ayant une immunoglobuline monoclonale dont la concentration sérique dépasse 30 g/L.

Les manifestations du syndrome « des grosses molécules » peuvent imposer de diminuer rapidement la concentration sérique de l'immunoglobuline monoclonale. Ceci peut être obtenu par des échanges plasmatiques, parfois indiqués en urgence, par exemple devant un syndrome hémorragique ou des signes neuro-sensoriels menaçants, dont les plasmaphérèses permettent une amélioration remarquable, souvent avec une rapidité spectaculaire [2].

VIII.2 - Manifestations rénales. Amylose et maladies des dépôts d'immunoglobulines

La survenue d'une insuffisance rénale est une complication fréquente et redoutée des myélomes et le dosage de la créatininémie est un examen essentiel au diagnostic et à la surveillance des malades. La cause principale est la **précipitation intra-tubulaire de chaînes légères** sous forme de structures cristallines cylindriques, constituées de la chaîne légère et d'une protéine physiologique, la protéine de Tamm-Horsfall [2]. L'excrétion de chaînes légères dans les urines, même à taux élevé, n'est pas une condition suffisante pour expliquer la formation des cylindres myélomateux. De fait, les chaînes légères n'ont pas toutes le même potentiel néphrotoxique, peut-être en raison d'une aptitude variable à s'agréger entre elles et avec la protéine de Tamm-Horsfall. Que le risque rénal soit ou non élevé, il est favorisé par une réduction du débit urinaire et/ou l'excrétion d'urines acides et, de façon à être autant que possible préventif, il est essentiel de sensibiliser le malade sur l'importance d'une hydratation importante et alcaline. Toute déshydratation doit être reconnue et traitée énergiquement, en même temps que sa cause (hypercalcémie, fièvre, diarrhée...). Les facteurs iatrogènes potentiels doivent être bien connus et évités. Parmi ceux-ci, les plus importants sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens, trop souvent prescrits en raison des douleurs osseuses, et les examens radiologiques comportant l'injection d'un produit de contraste iodé, scanner inclus. Sauf cas particulier, ceux-ci sont contre-indiqués dès qu'existe une excrétion notable de chaînes légères urinaires.

Les complications rénales des immunoglobulines monoclonales ne se résument pas à la tubulopathie myélomateuse. La survenue d'une néphropathie glomérulaire, évoquée devant une protéinurie non sélective voire un syndrome néphrotique, doit faire rechercher des dépôts d'immunoglobulines. Les principaux ont la structure organisée en fibrilles des différentes amyloses dont l'amylose immunoglobulinique (ou amylose AL) est une des formes les plus fréquentes. Plus rarement, les dépôts, non organisés et granuleux, se situent le long des membranes basales glomérulaires et surtout tubulaires, définissant la maladie des dépôts d'immunoglobulines ou maladie de Randall. Dans les deux cas, les

dépôts ne concernent pas uniquement les reins, et de très nombreux symptômes extra-rénaux (syndrome du canal carpien, macroglossie, hépatomégalie, signes cutanés divers...) peuvent les révéler et/ou prendre une importance pronostique déterminante (manifestations cardiaques). Des biopsies simples, cutanées, de la graisse abdominale, gingivales voire rectales doivent rechercher ces dépôts avant d'envisager un examen histologique rénal (ou hépatique) qui devra comporter les colorations spécifiques des amyloses (rouge congo) ainsi qu'une étude immuno-histochimique.

VIII.3 - Activité auto-anticorps pathogène des immunoglobulines monoclonales : cryoglobulinémies mixtes, maladie des agglutinines froides et neuropathie des macroglobulinémies

Les immunoglobulines monoclonales, principalement les IgM, peuvent être des auto-anticorps sans, le plus souvent, que cela ait une traduction clinique. Dans certains cas cependant, l'activité auto-anticorps a des conséquences délétères dues soit à la formation de complexes immuns (cas des cryoglobulinémies mixtes), soit à un effet pathogène direct de l'auto-anticorps monoclonal, par exemple au niveau des globules rouges (IgM de type agglutinine froide) ou du nerf périphérique (IgM anti-myéline) [2].

Les cryoglobulinémies mixtes, conséquence de la précipitation au froid de complexes formés d'une IgM monoclonale rhumatoïde et d'IgG polyclonales, sont traitées, avec les autres types de cryoglobuline, dans un autre chapitre de cette monographie.

La maladie des agglutinines froides est liée aux propriétés agglutinantes et d'anticorps froid (i.e. dont l'affinité pour l'antigène augmente à basse température) d'une IgM monoclonale presque toujours kappa. L'immunoglobuline monoclonale reconnaît habituellement des carbohydrates appartenant au système antigénique érythrocytaire Ii, plus rarement d'autres spécificités (Pr, M, P, Gd,...). La maladie se traduit essentiellement par des manifestations d'ischémie des extrémités, liées à l'agglutination des hématies, et par une hémolyse aiguë intra-vasculaire. Les symptômes, acrocyanose et émission d'urines noires par hémoglobinurie notamment, sont déclenchés ou favorisés par l'exposition au froid. Au plan biologique, une auto-agglutination des hématies dans les tubes de prélèvement ou des résultats augmentés et aberrants de VGM et CCMH doivent faire évoquer le diagnostic. Le test de Coombs est constamment positif, de type complément avec, en indirect, détection d'un titre souvent élevé voire très élevé d'agglutinines froides. Lors du diagnostic, la concentration sérique de l'IgM monoclonale est habituellement faible, inférieure à 5 g/L, et les examens « d'amont » ne décèlent pas de prolifération lymphoïde. L'évolution est variable mais le traitement préventif, en évitant les expositions au froid et en conseillant une protection optimale des extrémités, est souvent suffisant pour limiter la fréquence et la gravité des crises hémolytiques.

Une neuropathie périphérique complique environ 5 % des IgM monoclonales. Le plus souvent, le tableau est celui d'une polyneuropathie symétrique à prédominance sensitive de survenue insidieuse et d'évolution très lente. Des troubles sensitifs distaux, d'abord des membres inférieurs, puis des membres supérieurs, précèdent l'éventuelle apparition de signes moteurs. Une ataxie, un tremblement sont fréquents et évocateurs. L'examen du liquide céphalo-rachidien montre habituellement une hyperprotéinorachie sans hypercytose. Les données électromyographiques et, éventuellement, histologiques sont celles

d'une neuropathie démyélinisante avec dégénérescence axonale secondaire. Ces neuropathies sont fréquemment à l'origine de la découverte d'une IgM monoclonale de faible concentration, sans prolifération lymphoïde avérée associée. La recherche d'une IgM monoclonale doit être systématique devant toute neuropathie périphérique.

Environ 80 % des IgM monoclonales associées à une neuropathie périphérique ont une activité anticorps dirigée contre un constituant de la myéline. Cette constatation suggère un rôle de l'IgM dans la physiopathologie de la neuropathie, d'autant plus qu'elle peut être détectée autour des fibres nerveuses des malades, associée aux protéines terminales de la cascade du complément. De plus, des études expérimentales animales indiquent que l'injection intraneurale de l'IgM ou son transfert passif peut entraîner des lésions du nerf périphérique.

La majorité des IgM avec neuropathie reconnaissent une glycoprotéine mineure de la myéline, la MAG (pour myelin associated glycoprotein), au niveau de sa copule glucidique. Les IgM anti-MAG réagissent également avec des glycolipides du système nerveux périphérique, en particulier le glucuronyl sulfate paragloboside (SGPG), et avec d'autres glycoprotéines dont la molécule d'adhésion N-CAM. Elles reconnaissent des épitopes distincts d'un même déterminant glucuronyl sulfate. En immunofluorescence sur coupe de nerfs périphériques humains, les IgM anti-MAG fixent nettement les feuillettes myéliniques ; par contre, le groupe minoritaire des IgM monoclonales avec neuropathie qui ne sont pas anti-MAG donne une réaction négative ou faiblement positive. Ces IgM non anti-MAG peuvent réagir avec une série de glycolipides (dont le SGPG), mais ceci est également le cas d'IgM sans neuropathie, d'où une incertitude quant au rôle pathogène de cette réactivité.

A côté des IgM anti-myéline, d'autres activités auto-anticorps ont été mises en évidence, en particulier dirigées contre les gangliosides GM1 et asialo-GM1, chez des malades ayant une neuropathie motrice, le plus souvent avec bloc de conduction, réalisant un tableau proche de celui d'une sclérose latérale amyotrophique. Cette situation est importante à connaître car elle paraît améliorée, beaucoup plus souvent que les autres, par la réalisation de perfusions d'immunoglobulines intraveineuses.

En dehors des cryoglobulinémies de type II, de la maladie des agglutinines froides et des neuropathies avec IgM monoclonales, **d'autres situations** peuvent témoigner de complications liées à une immunoglobuline monoclonale, du fait d'une activité auto-anticorps pathogène (anti-VIII ou dirigée contre d'autres facteurs de la coagulation, anti-lipoprotéines à l'origine de xanthomes...) ou de mécanisme plus incertain (œdèmes angio-neurontiques acquis avec IgM monoclonale). De plus, certaines situations s'associent de façon quasi constante à la présence d'une immunoglobuline monoclonale, sans que l'éventuel lien entre l'anomalie immunochimique et la physiopathologie des symptômes soit connu. Il s'agit, par exemple, d'affections dermatologiques comme la mucinose papuleuse, du syndrome de fuite capillaire marqué par la survenue inopinée de chocs hypovolémiques avec hémococoncentration liés à l'extravasation brutale des protéines plasmatiques, ou du syndrome de Schnitzler associant IgM monoclonale et vascularite urticarienne.

Même si l'introduction des fortes doses de melphalan, l'apport de nouvelles drogues (dont la thalidomide) et une meilleure prise en charge des complications de la maladie (notamment osseuses, par l'utilisation d'inhibiteurs des ostéoclastes, les bisphosphonates) ont amélioré l'espérance de vie des malades symptomatiques (aujourd'hui de l'ordre de 5-6 ans), le myélome reste une maladie incurable. La macroglobulinémie de Waldenström a une évolution plus chronique, favorisée par les traitements (chloramiphen et fludarabine, principalement).

L'évolution des MGUS a fait l'objet d'études dont la plus importante a concerné 1 384 personnes ayant une IgG (70 %), une IgA (12 %) ou une IgM (15 %) monoclonale de concentration inférieure à 30 g/L [8]. Au cours d'un suivi très prolongé (plus de 15 ans en médiane, plus de 11 000 années-personnes), la disparition spontanée de l'immunoglobuline monoclonale a été observée 27 fois (2 %), et il s'agissait toujours d'immunoglobuline de très faible concentration, le plus souvent juste visible mais non quantifiable par électrophorèse. Une gammopathie-maladie avérée est survenue chez 115 personnes et des signes d'évolution (essentiellement une augmentation de la concentration de l'immunoglobuline monoclonale) ont été constatés chez 32 patients supplémentaires. La plus fréquente des maladies observées a été le myélome (n = 75, risque relatif (RR) par rapport à une population témoin : 25), les autres pathologies étant des lymphomes IgM (n = 19 ; RR : 2,4), l'amylose AL (n = 10 ; RR : 8,4), la macroglobulinémie de Waldenström (n = 7 ; RR : 46), des leucémies lymphoïdes chroniques (n = 3 ; RR : 0,9) et un plasmocytome solitaire (RR : 8,5). Cette série permet d'évaluer les probabilités de progression d'une MGUS à 12 % à 10 ans, 25 % à 20 ans et 30 % à 25 ans. Le risque de « transformation », environ 1 % par an, reste stable dans le temps et persiste même très à distance de la découverte de l'immunoglobuline monoclonale. Une IgM ou une IgA représente un risque d'évolution accru par rapport à une IgG. La détection de chaînes légères dans les urines ou la diminution de la concentration des immunoglobulines polyclonales normales (présente chez 319 des 1 384 patients précédents) n'a pas d'incidence pronostique évidente. Par contre, la concentration initiale de l'immunoglobuline monoclonale est un facteur prédictif majeur de l'évolution, avec des risques de progression à 20 ans variant entre 14 % (Ig \leq 5 g/L) et 64 % (Ig \leq 30 g/L), et augmentant de façon régulière (25 % si Ig \leq 15 g/L ; 41 % si Ig \leq 20 g/L ; 49 % si Ig \leq 25 g/L).

Le risque d'environ 1 % par an qu'une MGUS se « transforme » en une gammopathie-maladie justifie l'instauration d'une **surveillance** qui doit être régulière et prolongée. Au cours du suivi, l'examen principal est l'électrophorèse des protéines sériques, beaucoup plus fiable pour apprécier les variations de concentration de l'immunoglobuline monoclonale que les dosages « pondéraux ». Des données biologiques simples (hémogramme, créatininémie, calcémie et protéinurie si l'immunoglobuline monoclonale est une IgG ou une IgA) sont également à contrôler. Des examens supplémentaires (myélogramme, radiographies du squelette par exemple) ne sont justifiés que si surviennent des modifications cliniques ou biologiques, tout particulièrement une augmentation de la concentration de l'immunoglobuline monoclonale, à considérer comme un « marqueur tumoral » quasi « idéal ». Le rythme de la surveillance est fonction du contexte. Le plus souvent, il

est souhaitable de contrôler les principaux examens trois mois environ après la découverte de la gammopathie. Ensuite, lorsque l'ensemble des données suggère sans ambiguïté le diagnostic de MGUS, une surveillance semestrielle (voire annuelle, lorsque la concentration de l'immunoglobuline est faible) est suffisante. Les contrôles doivent être rapprochés s'il y a des éléments cytologiques, immunochimiques ou évolutifs suspects. Dans toutes ces situations, aucun traitement n'est indiqué et l'instauration d'une chimiothérapie ne doit être envisagée que si survient une gammopathie-maladie avérée et évolutive.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- COHEN H.J., CRAWFORD J., RAO M.K., PIEPER C.F., CURRIE M.S. Racial differences in the prevalence of monoclonal gammopathy in a community-based sample of the elderly. *Am. J. Med.*, 1998 ; 104 : 439-444.
- 2- FERMAND J.P. Monographie consacrée aux gammopathies monoclonales. *Revue du Praticien*, 1993 ; 3 : 269-331.
- 3- TOUCHARD G., PASDELOUP T., PARPEIX J., HAUET T., BAUWENS M., DUMONT G., AUCOUTURIER P., PREUD'HOMME J.L. High prevalence and usual persistence of serum monoclonal immunoglobulins evidenced by sensitive methods in renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1997 ; 12 : 1199-1203.
- 4- MARIETTE X., ZADGDANSKI A.M., GUERMAZI A., BERGOT C., ARNOULD A., FRIJA J., BROUET J.C., FERMAND J.P. Prognostic value of vertebral lesions detected by magnetic resonance imaging in patients with stage I multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 1999 ; 104 : 723-729.
- 5- AVET-LOISEAU H., MINVIELLE S., MELLERIN M.P., MAGRANGEAS F., BATAILLE R. 14q32 chromosomal translocations : a hallmark of plasma cell dyscrasias ? *Hematol. J.*, 2000 ; 1 : 292-294.
- 6- JACCARD A., ROYER B., BORDESSOULE D., BROUET J.C., FERMAND J.P. High-dose therapy and autologous blood stem cell transplantation in POEMS syndrome. *Blood*, 2002 ; 99 : 3057-3059.
- 7- FERMAND J.P., BROUET J.C. Heavy-chain diseases. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 1999 ; 13 : 1281-1294.
- 8- KYLE R.A., THERNEAU T.M., RAJKUMAR S.V., OFFORD J.R., LARSON D.R., PLEVAK M.F., MELTON III L.J. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.*, 2002 ; 346 : 564-569.

ELECTROPHORÈSE DES PROTÉINES DU SÉRUM

A. DAUNIZEAU

■ I. INTRODUCTION

Dès le début du vingtième siècle, des chercheurs imaginent de se servir d'un champ électrique pour déplacer des molécules en solution, afin de les séparer de part et d'autre de membranes perméables aux ions (Ikeda et Suzuki : 1912, Williams : 1929). C'est en 1937 que Tiselius se passe des membranes et met au point la première électrophorèse en milieu liquide, puis en 1941, l'électrophorèse stationnaire en ampholytes.

Le principe de l'électrophorèse est fondé sur le déplacement de molécules chargées électriquement, placées dans un champ électrique.

Ce principe est universellement utilisé dans de très nombreuses applications, dans tous les domaines de la biologie, ou de la chimie, partout où il est nécessaire de séparer des molécules. En effet, selon leurs caractéristiques propres, notamment de taille et de charge électrique, les molécules placées dans un champ électrique vont montrer des mobilités différentes et ainsi pouvoir être séparées.

Ce chapitre est volontairement centré sur l'étude de l'électrophorèse des protéines du sérum humain et de son intérêt en biologie médicale, qui justifie quelques rappels de notions de physicochimie nécessaires à la compréhension des techniques et à leur bonne maîtrise.

■ II. L'ÉLECTROPHORÈSE

On définit deux grands principes d'électrophorèse :

– L'électrophorèse dite « libre », où les molécules sont en solution dans une veine liquide ; nous l'évoquerons dans la deuxième partie de ce document à propos de l'électrophorèse capillaire ;

– L'électrophorèse dite « de zone », où la veine liquide est stabilisée par un support sous la forme d'un gel imbibé d'une solution tampon. C'est celle qui est classiquement utilisée aujourd'hui pour la séparation des protéines du sérum, et que nous allons développer.

L'électrophorèse comprend deux étapes principales : la séparation des molécules, puis, l'analyse des molécules séparées.

II.1 - Séparation des molécules

Différents facteurs interviennent pour mobiliser les molécules et favoriser leur séparation, ou au contraire, pour en perturber le bon déroulement.

a) Le champ électrique

Il est établi par l'application d'une différence de potentiel continue entre deux électrodes placées à chaque extrémité de la veine liquide ou du support. Une molécule porteuse d'une charge électrique donnée, placée dans un tel champ, sera d'autant plus mobilisée que le champ électrique sera élevé.

b) La charge des molécules

En solution dans l'eau, les électrolytes forts sont complètement ionisés. Les électrolytes faibles ne le sont que partiellement, et seules les formes dissociées portent une charge différente de zéro. Les molécules amphotères (c'est le cas des protéines) se dissocient différemment selon le pH du milieu, en donnant soit des ions chargés positivement (exemple : $R - NH_3^+$), soit des ions négatifs ($R - COO^-$). Il existe une valeur de pH du milieu où la charge apparente d'une molécule est nulle (égalité du nombre des charges positives et des charges négatives) ; on l'appelle le pH isoélectrique (pHi) de la molécule. Sa valeur est une constante caractéristique de la molécule.

Placée dans un milieu de pH supérieur à son pHi, une protéine acquiert une charge électrique apparente (somme des charges positives et des charges négatives) négative ; elle se comporte comme un anion et se déplace vers l'anode (électrode positive). Dans un milieu de pH inférieur à son pHi, sa charge apparente est positive. La protéine se comporte comme un cation et elle se déplace vers la cathode (électrode négative).

Pour un champ électrique donné, plus la charge de la molécule est élevée, plus la force qui la mobilise (force électrocinétique) est intense et plus la molécule se déplace rapidement.

c) L'effet de relaxation

En solution dans un solvant contenant des ions (solution tampon), une molécule chargée se retrouve entourée de plusieurs couches d'ions de charges électriques alternativement opposées, qui assurent l'équilibre des charges. Si la molécule est mobilisée par un champ électrique, l'équilibre entre les couches d'ions est modifié. Des forces apparaissent pour rétablir l'équilibre et rapprocher les couches de signes opposés. Ces forces retiennent les molécules et freinent d'autant plus leur déplacement que celui-ci est rapide.

d) Le rôle du solvant

– **Le pH du solvant** : comme on l'a vu plus haut, il conditionne la charge des molécules et donc leur déplacement. Si l'on veut que ce déplacement soit constant et reproductible d'une analyse à l'autre, il faut que ce pH soit fixé. On utilise donc une solution tampon. Pour les protéines dont les pH isoélectriques sont presque tous inférieurs à 7, on utilise le plus souvent des solutions tamponnées à pH 8,6 (tampons TRIS-Véronal). Dans ces conditions, les molécules se déplaceront vers l'anode.

– **La force ionique du tampon** : liée à la concentration en ions (c) et à leur valence (v), la force ionique ($f_i = 1/2 \sum c_i v_i^2$, où i représente chaque type d'ion en solution) diminue la mobilité des molécules lorsqu'elle s'accroît.

– **La viscosité du solvant** : caractéristique physique du solvant, la viscosité s'oppose au déplacement des molécules. Par ailleurs, on définit une viscosité apparente : les molécules

qui se déplacent entraînent avec elles des molécules du solvant ; pour rétablir l'équilibre des masses, il y a un déplacement de solvant en sens contraire qui ralentit les particules.

La viscosité freine d'autant plus les molécules que celles-ci sont volumineuses.

– **Le rôle d'additifs** : dans certains cas, on peut compléter la composition du tampon par divers additifs : agents dissociants pour éviter la polymérisation de protéines et faciliter leur solubilité (β mercapto-éthanol) ; substances modifiant la charge des molécules pour augmenter leur mobilité telles que le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) ; polyanion qui se fixe sur les protéines et leur confère une charge apparente négative...

e) La température

Elle intervient de plusieurs façons sur la séparation des molécules, soit en la favorisant, soit en la diminuant :

- La viscosité du milieu diminue lorsque la température augmente ;
- La température augmente la mobilité des ions du tampon ;
- Tout échauffement accroît l'effet Joule, créant un cercle vicieux qui ne peut être maîtrisé qu'en contrôlant le courant et la tension appliquée aux électrodes ; il est parfois nécessaire de réfrigérer le support ;
- La température augmente la diffusion des molécules et leur dispersion dans le milieu, réduisant ainsi la résolution.

f) Le rôle du support

Pourquoi un support ? Pour contenir et stabiliser la phase liquide, limiter les courants de convection, réduire l'influence des vibrations et faciliter les manipulations. Ce sont des supports poreux, très souvent des gels, gel d'acétate de cellulose, d'agarose, ou de polyacrylamide.

Le rôle du support dans les techniques d'électrophorèse de zone est essentiel et multiple.

– **Tamissage moléculaire** : cette structure poreuse constitue pour les molécules en solution une sorte de tamis qui peut perturber leur trajet. Si la porosité diminue, si les pores du support ont une faible taille, les molécules peuvent être nettement ralenties (les grosses molécules plus fortement que les plus petites) au point d'être, dans certains cas, bloquées à l'emplacement où elles ont été déposées. Ce phénomène de tamissage moléculaire permet la séparation des molécules, non seulement en fonction de leur charge électrique, mais aussi en fonction de leur taille. On peut ainsi espérer séparer des molécules de même charge.

– **Courant d'endosmose** : dans la plupart des cas, le support est porteur de charges négatives. Sous l'influence du champ électrique, il a tendance à se déplacer vers l'anode, ce qui n'est pas mécaniquement possible. Le principe de l'action et de la réaction fait que c'est le tampon qui se déplace alors dans le sens inverse, vers la cathode, freinant et entraînant, parfois, les molécules à séparer.

– **Phénomènes d'adsorption** : les mêmes charges que précédemment peuvent attirer et parfois fixer les molécules de charge opposée. D'autres interactions de type hydrophobe peuvent également intervenir.

– **Phénomène d'évaporation** : le plus souvent, le support est disposé horizontalement à l'air libre. Si l'échauffement est important, l'eau du solvant s'évapore. On démontre que l'évaporation est maximale au centre du support, ce qui crée un courant de tampon des extrémités vers le centre, accélérant ou freinant les molécules selon leur position sur le support. Ce phénomène est maîtrisé par l'installation du support dans une enceinte de volume réduit (cuve + couvercle) rapidement saturée en vapeur d'eau et, au besoin, par l'utilisation d'un système de refroidissement.

Principales qualités d'un bon support :

- Bonne résistance mécanique ;
- Porosité (degré de réticulation) adaptée aux molécules à séparer ;
- Structure et composition adaptées au mode de révélation ;
- Inertie chimique et insolubilité.

Le choix du support et de ses caractéristiques est essentiel pour garantir la qualité des résultats, selon les applications.

II.2- Analyse des molécules séparées

• L'analyse doit être réalisée aussitôt après l'arrêt du générateur pour limiter la diffusion des molécules qui aboutirait à leur mélange. Cette analyse détermine l'emplacement et la quantité des différentes molécules.

Cela peut se faire par une mesure directe d'une propriété des molécules : mesure de l'indice de réfraction, mesure d'absorption en lumière visible (hémoglobine), ultraviolet (ex. : protéines à 280 nm, ou à 210 nm), ou en fluorescence. Ce type de mesure est bien adapté à l'électrophorèse libre.

On peut aussi effectuer une mesure indirecte après coloration, méthode très utilisée en électrophorèse de zone. Dans ce cas, il est essentiel de fixer les molécules à l'emplacement qu'elles occupaient à l'arrêt du générateur. Pour les protéines, il suffit de les précipiter par de l'acide acétique. Le précipité se trouve alors imbriqué dans les mailles du gel.

• On colore ensuite les molécules. Quelques exemples de colorants :

- Protéines : vert de lissamine, amidoschwarz, rouge ponceau, violet cristal, bleu de Coomassie, etc... Des quantités très faibles de protéines peuvent être mises en évidence par des colorations très sensibles (coloration à l'argent).
- Lipoprotéines : noir soudan.
- Glycoprotéines : réactif de Schiff.
- Acides aminés : ninhydrine.

• La dernière étape consiste à laver le support pour éliminer le colorant qui ne s'est pas fixé aux molécules, puis de le sécher. On peut alors repérer l'emplacement de chaque molécule et mesurer l'intensité de sa coloration.

D'autres techniques sont utilisées pour diverses applications : précipitation immunologique, précipitation de lipoprotéines par des polyanions, révélation d'une activité enzymatique, marquage isotopique et autoradiographies, etc...

■ III. L'ÉQUIPEMENT CLASSIQUE

Il se compose :

- D'un générateur de courant continu, à tension variable et contrôlée, pouvant être maintenue constante ;
- D'une cuve contenant deux bacs remplis de tampon, dans lesquels plongent les électrodes reliées au générateur, et un système permettant d'installer le gel entre les bacs et d'établir le contact avec les électrodes ;
- D'un dispositif de contrôle de la température au besoin ;
- De bacs permettant la coloration et la décoloration des gels ;
- D'un système de lecture appelé densitomètre intégrateur qui mesure le résultat de la migration, trace une courbe représentant l'importance de chaque pic de molécule (électrophorogramme) et en détermine la quantité relative.

Cet équipement est aujourd'hui semi-automatisé, ou entièrement automatique dans les laboratoires où le nombre d'analyses est suffisamment élevé.

■ IV. RÉSULTATS

Dans l'ensemble, les résultats sont satisfaisants. Les reproductibilités habituelles montrent des coefficients de variation (CV) d'environ 2 à 3 % pour le pic d'albumine, 4 à 5 % pour les γ -globulines. Il existe peu de différence entre les techniques.

Lorsque ces niveaux de performances ne sont pas obtenus, il est bon de vérifier que les conditions d'une bonne analyse sont remplies, et de penser aux risques d'erreur.

Conditions d'une bonne analyse

D'une façon générale, et particulièrement pour les électrophorèses qui sont des techniques délicates, il faut respecter scrupuleusement les instructions opératoires.

Au cours de la séparation

– **Le champ électrique** : la tension doit être maintenue constante. Bien veiller au respect des polarités, sous peine de faire migrer les protéines dans le sens inverse de celui prévu, et de les « récupérer » dans un des bacs de tampon.

– **Le tampon** : il conditionne le déplacement des molécules. S'assurer que son pH et sa force ionique ont les valeurs requises. Ne pas oublier qu'au cours d'une seule migration, les ions se déplacent et que la composition du tampon change. Il doit donc être renouvelé très souvent.

– **Le support** : sa nature et sa composition sont aussi des éléments essentiels qui doivent être parfaitement adaptés à l'application envisagée. Avant toute migration, s'assurer de l'état du support : homogénéité, absence de marques, de poussières, tout défaut pouvant entraîner des migrations déformées. Bien vérifier le degré d'humidité du gel, tout point

de séchage précoce pouvant être le départ d'une combustion du support sous l'effet du courant électrique.

– **La température** : son rôle important a été décrit précédemment, notamment sur la diffusion des molécules et l'évaporation du gel. Ceux qui ont eu la chance de vivre des étés particulièrement chauds dans des laboratoires mal climatisés savent que, même avec un dispositif de refroidissement, la température ambiante peut parfois provoquer des migrations très surprenantes.

– **La qualité de l'échantillon** : lorsque l'on veut analyser les protéines du sérum, il convient de ne pas apporter avec l'échantillon de protéines d'une autre origine, pouvant provenir d'éléments figurés (hématies, bactéries), eux-mêmes riches en protéines, ni de fibrinogène, ni de particules diverses pouvant fixer le colorant et gêner l'interprétation. Bien laisser coaguler les échantillons, rejeter les échantillons hémolysés, utiliser des échantillons « frais » ou conservés à l'abri des microorganismes.

Au cours de la révélation et de la lecture

– **La concentration de l'échantillon** : si la concentration en molécules à analyser est trop faible, celles-ci ne pourront être détectées. Si la concentration en molécules à analyser est trop forte, leur répartition dans le gel pourra conduire à le saturer en certains endroits, conduisant à des migrations modifiées et surtout, à des défauts de coloration par encombrement moléculaire. Dans ce cas, les fractions en cause seront sous-estimées.

– **Le support** : il doit permettre le passage des photons, donc être transparent, et ceci de façon homogène, pour que la mesure du bruit de fond (mesure du « zéro ») faite en un point donné soit valable pour toute l'étendue du gel. Attention à ne pas « faire le zéro » sur une zone où se trouveraient des protéines en petite quantité (cas de la préalbumine).

Par ailleurs, le support doit être parfaitement sec avant la coloration, sous peine de ne pas pouvoir être décoloré.

– **Le colorant** : il permet la coloration des molécules et contribue souvent à les fixer. Ne pas oublier qu'à chaque coloration, une certaine quantité de colorant est fixée sur les molécules, une autre captée par le gel et éliminée au lavage. Ainsi, au cours du temps, ce colorant s'épuise. Ne pas oublier de le changer régulièrement.

Pour être efficace, le colorant non fixé sur les molécules doit être éliminé au lavage. Bien respecter les temps et la température de coloration et de décoloration pour s'éviter de devoir recommencer l'analyse à cause d'un gel qui « refuse » de se décolorer.

Ne pas oublier que le colorant ne se fixe pas de la même façon sur chaque protéine, et que tout changement de type de colorant peut amener à modifier les valeurs de référence. De plus, le produit coloré ne suit pas la loi de Beer.

– **Le système d'intégration** : Le choix de la longueur d'onde doit être fait pour obtenir la meilleure sensibilité pour le colorant utilisé.

Par ailleurs, il est souhaitable que le faisceau lumineux soit le plus étroit possible ; un faisceau trop large peut conduire à une sous-estimation des fractions les plus importantes, souvent de l'albumine.

■ V. PRINCIPALES APPLICATIONS

V.1- Application aux protéines du sérum

Les techniques les plus répandues aujourd'hui pour les protéines du sérum utilisent des gels d'acétate de cellulose ou d'agarose, sous des tensions de l'ordre de 200 à 300 V, pendant une vingtaine de minutes en tampon TRIS-véronal à pH 8,6. Les protéines sont révélées par coloration au rouge ponceau ou à l'amidoschwarz.

Tableau I : Principales techniques utilisées (* : techniques les plus répandues)

	Acétate de cellulose/ Rouge ponceau	Agarose/ Rouge ponceau	Agarose/ Amidoschwarz
Beckman-Coulter	–	–	Paragon
Biomidi	Midifilm	–	–
Helena	Titan III*	REP SPE 30	Titan gel
Sebia	Sebiagel	–	Hydragel*
Sebia	Celloplaque	–	Hydragel Hydrasys

Dans de telles conditions, on pourra observer un protéinogramme normal constitué de 5 à 6 fractions. Dans l'ordre, de l'anode vers la cathode, les fractions sont : préalbumine, albumine, α 1-globulines, α 2-globulines, β -globulines et γ -globulines.

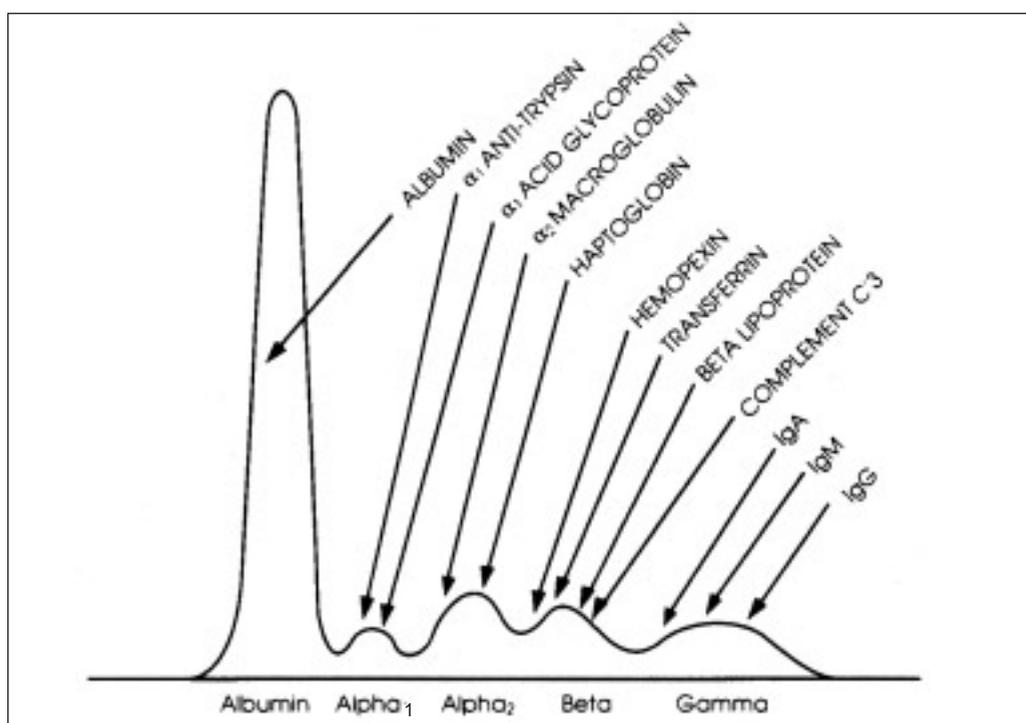


Figure 1 : Profil électrophorétique normal et principales protéines des différentes fractions.

V.2- Valeurs de référence

A titre indicatif, pour une technique sur acétate de cellulose, avec coloration au rouge ponceau, les valeurs de référence habituellement retenues sont les suivantes :

– Protides totaux :	60 – 80 g/L	
– Albumine :	58 ± 5 %	32 – 50 g/L
– α1-globulines :	3 ± 1,5 %	1 – 4 g/L
– α2-globulines :	9 ± 3 %	6 – 10 g/L
– β-globulines :	14 ± 3 %	6 – 13 g/L
– γ-globulines :	16 ± 4 %	7 – 15 g/L

Il ne faut pas oublier que les valeurs indiquées ici pour les concentrations ne sont que le résultat du calcul obtenu à partir des pourcentages des protides totaux. Ces résultats peuvent être très différents de ceux provenant d'un dosage spécifique d'une protéine ou d'une classe de protéines, pour plusieurs raisons :

- D'une part, il n'y a pas de rapport entre la fixation d'un colorant sur les protéines et la réactivité d'un anticorps utilisé pour le dosage. Par ailleurs, on sait que les colorants ne se fixent pas de la même manière sur chaque protéine ;
- D'autre part, il existe plusieurs centaines de protéines différentes dans le sérum. Chacune des fractions de globulines représente donc quelques dizaines de protéines différentes, qui peuvent varier en sens inverse, ce qui peut donner un pourcentage apparemment normal ;
- Enfin, chaque fraction n'est pas totalement séparée de sa voisine, l'une et l'autre se chevauchant. Ainsi, même si la majeure partie des immunoglobulines se retrouve dans la zone des γ-globulines, certaines migrent jusque dans la zone α2-globulines.

V.3- Autres applications en biologie médicale

Les électrophorèses sont aujourd'hui surtout utilisées pour l'étude des protéines du sérum. Cependant, elles permettent l'étude des protéines d'autres liquides biologiques.

– **Electrophorèse des protéines urinaires** : cette application a pour but de séparer les protéines en fonction de leur taille, pour trouver l'origine glomérulaire ou tubulaire d'une protéinurie. On sait, en effet, que lors d'une atteinte glomérulaire du rein, le filtre glomérulaire retient moins bien les protéines du sérum qu'à l'état physiologique. On voit alors apparaître des protéines dans les urines, d'abord de l'albumine, puis si les lésions s'aggravent, des protéines de plus grande taille : transferrine, puis immunoglobulines entières.

Pour obtenir de bons résultats, on travaille le plus souvent sur des échantillons traités par du SDS pour charger toutes les protéines de la même façon. La séparation sur des gels à haute résolution (agarose ou polyacrylamide) permet alors de ne les séparer qu'en fonction de leur taille. En cas de tubulopathie, on peut observer des protéines de petite taille, secrétées par les tubules rénaux : β2-microglobuline, R.B.P. (Retinol Binding Protein), lysozyme, etc...

L'autre intérêt de l'électrophorèse urinaire est la détection d'une protéinurie de Bence Jones (chaînes légères libres monoclonales), qu'il convient ensuite de typer par immunoelectrophorèse ou par immunofixation.

– **Electrophorèse des protéines du Liquide Céphalo-Rachidien (LCR)** : le but recherché est, le plus souvent, la mise en évidence de bandes particulières dans la zone des γ-globulines qui signent la production intrathécale d'immunoglobulines. Cette production s'observe au

cours d'affections neurologiques et, en particulier, de la sclérose en plaques, donnant un aspect dit « oligoclonal » du profil. La méthode nécessite une concentration préalable des protéines du LCR, l'utilisation d'un gel à haute résolution et d'un colorant très sensible (violet cristal, ou bleu de Coomassie).

On peut recommander une autre technique plus performante qui comprend une isofocalisation sur gel d'agarose en présence d'ampholytes, suivie d'une coloration à l'argent extrêmement sensible. Cela donne une excellente résolution, permet d'éviter de concentrer le LCR et d'en utiliser qu'un très faible volume.

– **Electrophorèse de l'hémoglobine** : destinée à rechercher des variants d'hémoglobine, l'électrophorèse constitue la première étape d'une telle recherche. Généralement, on effectue deux migrations, une en milieu alcalin et une autre en milieu acide, de façon à séparer l'une des molécules qui ne l'aurait pas été de l'autre. En cas de mise en évidence d'une hémoglobine anormale, d'autres techniques complètent cette étape, jusqu'au typage précis de l'hémoglobine anormale, aujourd'hui par des techniques de biologie moléculaire.

– **Autres** : d'autres applications existent qui ne sont que peu utilisées et souvent en voie de disparition dans les laboratoires de biologie médicale : électrophorèse des lipoprotéines, d'isoenzymes, etc.

Quant aux applications dans le domaine de la recherche, elles sont quotidiennement utilisées, innombrables, et ne peuvent être développées ici.

■ VI. INTERPRÉTATION DES PROTÉINOGRAMMES

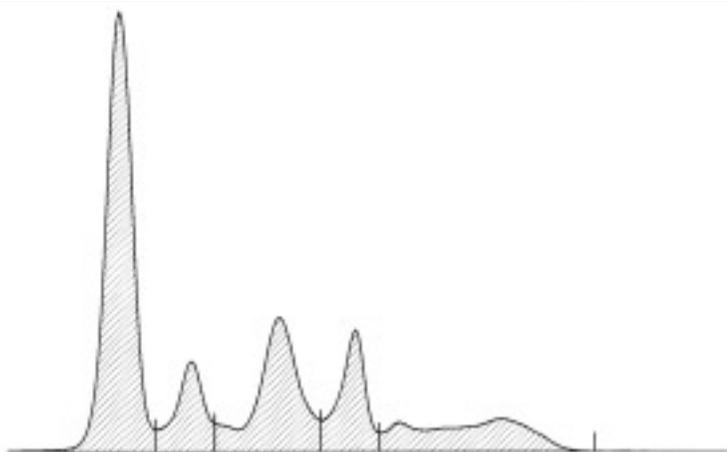
L'interprétation d'un protéinogramme consiste à rechercher deux types d'anomalies :

- Des variations quantitatives d'une ou plusieurs fractions ;
- Des anomalies qualitatives, notamment la présence d'un pic supplémentaire témoignant de la présence d'une immunoglobuline monoclonale.

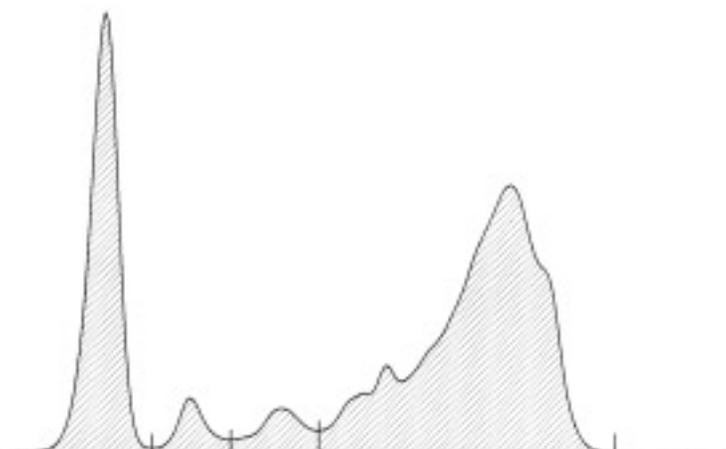
VI.1- Variations quantitatives

Le passage du gel séché et coloré dans le densitomètre fournit un tracé. Il permet de déterminer la proportion de chaque zone et de calculer des résultats en pourcentage et en g/L. On peut alors connaître les variations de chaque fraction par rapport aux valeurs de référence.

Il ne suffit pas de regarder le tracé et d'interpréter ces calculs. Il est indispensable d'observer le gel lui-même pour vérifier la qualité de la migration, et pour vérifier qu'aucun artéfact ne se situe sur la zone enregistrée, tel qu'une poussière, une rayure du gel, une bulle dans le gel, une tâche de colorant, ou toute autre anomalie. C'est parfois aussi la seule façon de distinguer un vrai pic monoclonal très discret sur le fond coloré. L'œil est un détecteur extrêmement sensible. Cette méthode permet de mettre en évidence des variations quantitatives des différentes fractions et d'observer des profils caractéristiques de différentes situations pathologiques, telles que syndrome néphrotique, insuffisance hépatique, cirrhose, dénutrition, syndrome inflammatoire, déficit immunitaire, hypergammaglobulinémie, et d'en suivre l'évolution.



FRACTION	%	G/L	VALEURS USUELLES %	VALEURS USUELLES G/L
ALBUMINE	47.5-	34.7	52.0 - 66.0	30.0 - 48.0
ALPHA 1	8.9+	6.5+	3.3 - 7.0	1.8 - 4.8
ALPHA 2	19.5+	14.2+	6.0 - 12.0	3.3 - 11.0
BETA	11.0	8.0	8.0 - 14.0	5.4 - 12.8
GAMMA	13.2	9.6	11.0 - 20.0	6.6 - 17.6
TOTAL		73.0		60.0 - 75.0
ALB/GLOBULINES	0.90			



FRACTION	%	G/L	VALEURS USUELLES %	VALEURS USUELLES G/L
ALBUMINE	31.8	15.6		
ALPHA 1	3.6	1.8		
ALPHA 2	4.6	2.2		
BETA/GAMMA	60.0	29.4		
TOTAL		49.0-		60.0 - 75.0
ALB/GLOBULINES	0.47			

COMMENTAIRE :

Sérum ictérique.

Figure 2 : Exemples de tracés perturbés.

2a : Syndrome inflammatoire.

2b : Cirrhose décompensée.

On observe un discret pic étroit cathodique correspondant à la présence d'une immunoglobuline monoclonale IgG Kappa.

Tableau II : Exemples de variations des protéines à l'électrophorèse

	Protéines	Albumine	Alpha 1	Alpha 2	Béta	Gamma
Inflammation aiguë		↓ ou N	↑	↑↑		N ou ↑
Inflammation chronique			↑	↑		↑
Hépatite grave	↓ ou N	↓	↓	↓	↓	↓
Cirrhose décompensée		↓↓			Bloc β-γ	↑↑
Syndrome néphrotique	↓↓	↓↓	↓	↑↑	↓	↓ ou N
Hypergammaglobulinémie	N ou ↑	↓ ou N				↑↑
Hypo ou α-gammaglobulinémie	N ou ↓					↓↓↓
Gammopathie monoclonale	N ou ↑	↓ ou N		Pic étroit		
Déficit en α1-antitrypsine			↓↓			

VI.2- Anomalies qualitatives

Gammopathies monoclonales

Le type d'anomalie qualitative le plus fréquemment rencontré est la présence d'un pic supplémentaire, généralement étroit, d'importance et de position variables. Cela correspond à la synthèse d'une immunoglobuline par un même clone plasmocytaire.

Au début, l'immunoglobuline monoclonale est produite en une quantité ne permettant pas qu'on la distingue des autres immunoglobulines normales. Au fur et à mesure que le clone prolifère, la quantité d'immunoglobuline monoclonale produite augmente, et elle finit par « se distinguer » des autres et être observable sous la forme d'un pic fin, étroit, le plus souvent dans la zone des γ-globulines, mais parfois dans les zones des β-globulines ou même, des α2-globulines, où il est parfois difficile de la distinguer. La prolifération du clone peut aboutir à des concentrations sériques d'immunoglobuline monoclonale très élevées (50 g/L ou plus). Le pic correspondant peut devenir très important, plus que celui de l'albumine, et représenter à lui seul plus de 50 % des protéines.

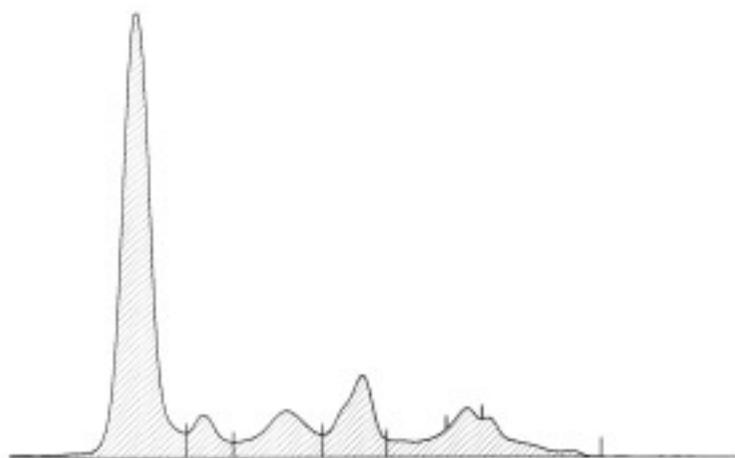
Dans tous les cas, il est important de détecter de tels pics le plus précocément possible et de caractériser le type d'immunoglobuline en cause par des techniques particulières (voir chapitre correspondant).

Le plus souvent, il s'agit d'une immunoglobuline monoclonale unique et complète. On peut parfois observer deux pics (voire plus), correspondant à un même type d'immunoglobuline, ou à des types différents d'immunoglobulines. Il peut s'agir de deux immunoglobulines monoclonales différentes, ou d'une même immunoglobuline, présente sous différents états de polymérisation (cas des IgA ou des IgM). Parfois, il s'agit de chaînes légères monoclonales isolées, Kappa ou Lambda. Il s'agit rarement de chaînes lourdes seules.

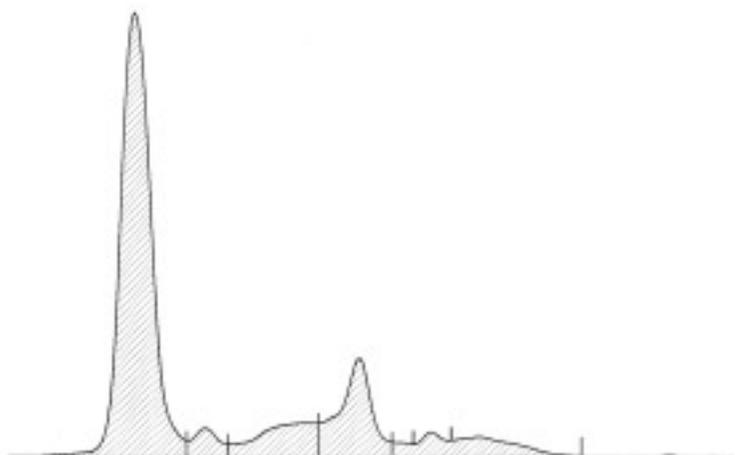
Il est important d'évaluer la quantité d'immunoglobuline monoclonale, pour en apprécier au mieux son évolution.

On peut aussi observer des pics monoclonaux au cours de diverses affections : hémopathies (leucémies lymphoïdes, lymphomes...) ou autres pathologies (cirrhoses, hépatites...).

Dans d'autres cas, en dehors de tout contexte malin, on peut mettre en évidence un pic électrophorétique qui peut soit persister sans évoluer pendant des années, soit diminuer



FRACTION	%	G/L	VALEURS USUELLES †	VALEURS USUELLES G/L
ALBUMINE	60.7	34.6	52.0 - 66.0	30.0 - 48.0
ALPHA 1	4.7	2.7	3.3 - 7.0	1.8 - 4.8
ALPHA 2	9.4	5.3	6.0 - 12.0	3.3 - 11.0
BETA	10.8	6.2	8.0 - 14.0	5.4 - 12.8
GAMMA	14.3	8.2	11.0 - 20.0	6.6 - 17.6
TOTAL		57.0-		60.0 - 75.0
PIC MONOCLONAL SUR GAMMA		3.2 G/L		
ALB/GLOBULINES	1.55			

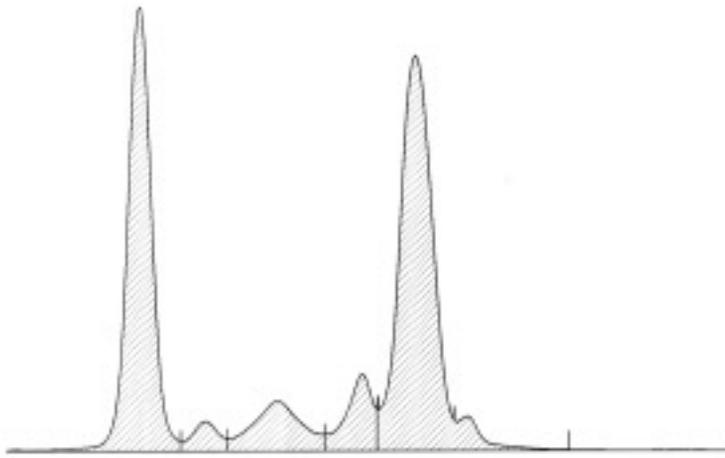


FRACTION	%	G/L	VALEURS USUELLES †	VALEURS USUELLES G/L
ALBUMINE	66.1+	46.3	52.0 - 66.0	30.0 - 48.0
ALPHA 1	3.1-	2.2	3.3 - 7.0	1.8 - 4.8
ALPHA 2	8.7	6.1	6.0 - 12.0	3.3 - 11.0
BETA	13.3	9.3	8.0 - 14.0	5.4 - 12.8
GAMMA	8.8-	6.1-	11.0 - 20.0	6.6 - 17.6
TOTAL		70.0		60.0 - 75.0
PIC MONOCLONAL SUR GAMMA		2.0 G/L		
ALB/GLOBULINES	1.95			

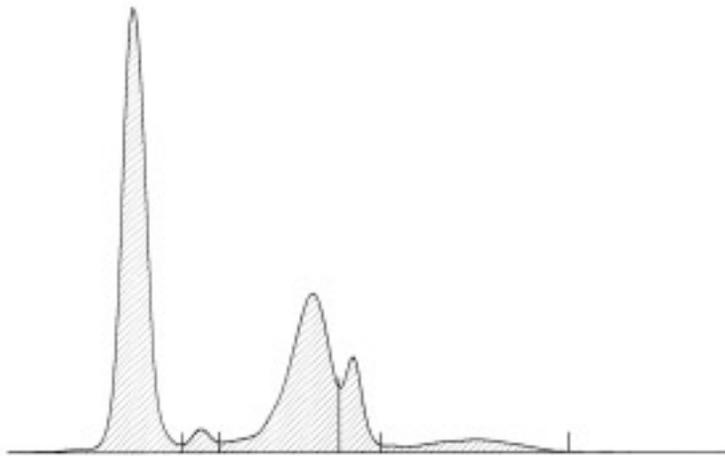
Figure 3 : Quelques exemples de pics monoclonaux.

3a : Présence de deux pics étroits (double IgM Kappa).

3b : Pic étroit dans les γ -globulines correspondant à une IgM Kappa monoclonale en faible quantité.



FRACTION	%	G/L	VALEURS USUELLES †	VALEURS USUELLES G/L
ALBUMINE	39.0-	40.2	52.0 - 66.0	30.0 - 48.0
ALPHA 1	2.5-	2.6	3.3 - 7.0	1.8 - 4.8
ALPHA 2	7.8	8.0	6.0 - 12.0	3.3 - 11.0
BETA	6.4-	6.6	8.0 - 14.0	5.4 - 12.8
GAMMA	44.3+	45.6+	11.0 - 20.0	6.6 - 17.6
TOTAL		103.0+		60.0 - 75.0
PIC MONOCLONAL SUR GAMMA		42.8 G/L		
ALB/GLOBULINES	0.64			



FRACTION	%	G/L	VALEURS USUELLES †	VALEURS USUELLES G/L
ALBUMINE	54.7	45.4	52.0 - 66.0	30.0 - 48.0
ALPHA 1	2.2-	1.8	3.3 - 7.0	1.8 - 4.8
ALPHA 2	30.0+	24.9+	6.0 - 12.0	3.3 - 11.0
BETA	7.8-	6.5	8.0 - 14.0	5.4 - 12.8
GAMMA	5.3-	4.4-	11.0 - 20.0	6.6 - 17.6
TOTAL		83.0+		60.0 - 75.0
ALB/GLOBULINES	1.21			

Figure 3 : (suite)

3c : Présence de deux pics étroits (IgA Kappa monoclonale avec protéine de Bence Jones Kappa).

3d : Pic étroit dans les α 2-globulines (IgA Kappa monoclonale).

progressivement et finir par disparaître. On parle alors de gammopathie monoclonale de signification indéterminée.

Autres anomalies qualitatives

– Bisalbuminémie : c'est une situation relativement rare, où l'on observe parfois un dédoublement du pic de l'albumine qui peut correspondre à une anomalie génétique sans retentissement clinique notable, à une anomalie acquise au cours d'un traitement antibiotique (bétalactamines), ou, parfois, en cas de fistule pancréatique (libération de protéases qui dégradent l'albumine *in vivo*).

VI.3- Difficultés d'interprétation

– Excepté l'albumine qui est à peu près « isolée », les autres fractions sont constituées d'un mélange de nombreuses protéines. La variation de quantité de l'une ou l'autre de ces fractions correspond donc à la somme des variations, en plus ou en moins, de chacune des protéines qui la compose. Il faut donc être prudent pour affirmer la variation d'une protéine sur le seul résultat d'une électrophorèse.

– Les résultats du dosage spécifique d'une protéine peuvent différer fortement de ceux obtenus par intégration de la fraction contenant cette protéine. Ce n'est pas du tout le même signal qui est mesuré, ni le même analyte. Cela étant, des différences très fortes doivent absolument attirer l'attention et trouver une explication. Nous avons pu ainsi récemment corriger une erreur sur le dosage des protéines totales, trouvé une première fois à 52 g/L chez un patient ayant une IgM monoclonale, elle-même dosée à 49 g/L. Il a été montré que la viscosité de l'échantillon perturbait la prise du volume d'échantillon d'un instrument et sous-estimait la protidémie qui était, en réalité, à 78 g/L. D'autres paramètres du bilan ont aussi pu être corrigés.

– L'hémolyse d'un échantillon va libérer de l'hémoglobine qui migre entre la zone des α_2 -globulines et celle des β -globulines. Elle peut être prise pour ou masquer une immunoglobuline monoclonale. Quant aux proportions de ces fractions, elles sont évidemment faussées.

– L'intégration du gel ne suffit pas, comme on l'a vu plus haut. Il faut aussi l'observer attentivement pour écarter des artéfacts provoqués par des défauts du gel ou la présence de débris ayant fixé le colorant. Dans ces cas, le tracé montre des pics « anormaux » qui, s'ils peuvent évoquer la présence d'immunoglobuline monoclonale, n'en sont évidemment pas.

– Parfois, on peut observer un phénomène de précipitation au point de dépôt. Il peut s'agir d'une polymérisation le plus souvent d'IgM, qui disparaît après traitement de l'échantillon par un agent dissociant (β_2 mercapto-éthanol par exemple), ou d'une cryoglobuline qu'il faudra rechercher, et au besoin typer. Dans ce cas, une électrophorèse faite à 37 °C fait disparaître la précipitation (voir chapitre correspondant).

– De temps en temps, on observe sur les tracés des petits pics dans la zone des γ -globulines sans que l'immunofixation ne mette en évidence d'immunoglobuline monoclonale. L'observation du gel, de la position des pics, du tube de prélèvement, et du reste du bilan biologique du patient peut montrer une CRP très élevée, ou un très beau pic « monoclonal »... de fibrinogène (prélevé sur anticoagulant), que l'on met en évidence avec un anticorps spécifique.

– Il faut toujours se souvenir que de vrais pics liés à la présence d'immunoglobuline monoclonale peuvent échapper à l'observation : immunoglobuline monoclonale en faible quantité dont le pic étroit est masqué par un pic plus important situé au même endroit

(IgA masquée par le pic de transferrine en position bêta) ; pic étroit ne se distinguant pas de son environnement immédiat ; ou encore, pic étroit qu'on ne recherche pas où il faut : attention aux pics situés en position très cathodique.

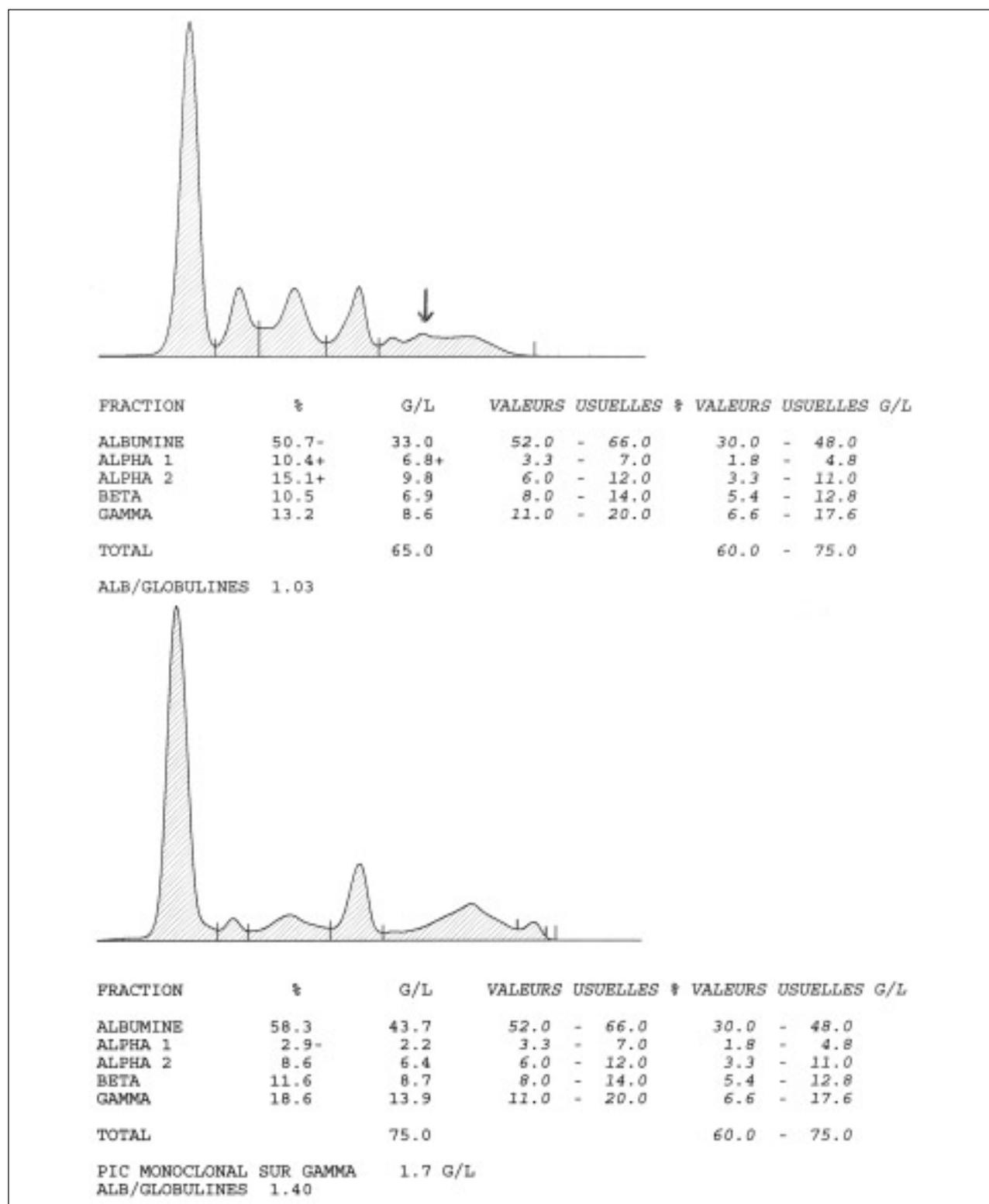
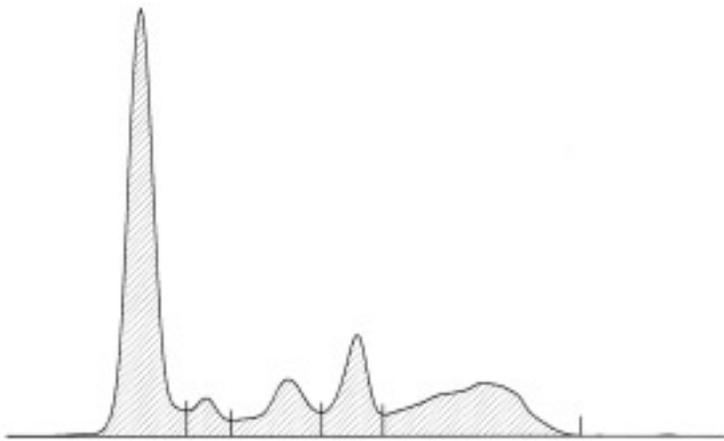


Figure 4 : Difficultés d'interprétation.

4a : Pic de CRP (C reactive protein).

4b : Présence de deux pics étroits, dont l'un est en position très cathodique.



FRACTION	%	G/L	VALEURS USUELLES %	VALEURS USUELLES G/L
ALBUMINE	53.1	41.4	52.0 - 66.0	30.0 - 48.0
ALPHA 1	4.2	3.3	3.3 - 7.0	1.8 - 4.8
ALPHA 2	10.0	7.8	6.0 - 12.0	3.3 - 11.0
BETA	11.4	8.9	8.0 - 14.0	5.4 - 12.8
GAMMA	21.3+	16.6	11.0 - 20.0	6.6 - 17.6
TOTAL		78.0+		60.0 - 75.0
ALB/GLOBULINES	1.13			



FRACTION	%	G/L	VALEURS USUELLES %	VALEURS USUELLES G/L
ALBUMINE	48.3-	28.5-	52.0 - 66.0	30.0 - 48.0
ALPHA 1	5.3	3.1	3.3 - 7.0	1.8 - 4.8
ALPHA 2	6.9	4.1	6.0 - 12.0	3.3 - 11.0
BETA	25.8+	15.2+	8.0 - 14.0	5.4 - 12.8
GAMMA	13.7	8.1	11.0 - 20.0	6.6 - 17.6
TOTAL		59.0-		60.0 - 75.0
ALB/GLOBULINES	0.93			

COMMENTAIRE:

Sérum hémolysé +++

Figure 4 (suite) : Difficultés d'interprétation.
4c : Présence de bulles au niveau de la zone des γ -globulines.
4d : Sérum hémolysé.

■ VII. ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

VII.1- Généralités

L'électrophorèse capillaire est une technique d'électrophorèse conduite dans une veine liquide, contenue dans un tube capillaire de faible diamètre, de 10 à 200 μm .

La géométrie des systèmes utilisés autorise des tensions très élevées (quelques dizaines de kilovolts), qui réduisent considérablement le temps de migration. En même temps, les pertes de résolution par diffusion ou convection sont particulièrement réduites.

L'électrophorèse capillaire est applicable à la séparation de très nombreux types de molécules, des plus petites (ions, acides aminés, peptides de synthèse ou médicaments), jusqu'aux plus grosses (macromolécules complexes telles que protéines ou des acides nucléiques).

L'électrophorèse capillaire présente de nombreux avantages sur les méthodes classiques :

- Simplicité d'utilisation ;
- Séparation très rapide ;
- Séparation, identification et quantification en une seule étape ;
- Très faible volume d'échantillon ;
- Excellent refroidissement qui limite l'effet Joule ;
- Haute résolution ;
- Faible coût de fonctionnement.

En revanche, l'investissement dans un système d'électrophorèse capillaire est relativement important.

VII.2 - Instrumentation

L'appareillage est constitué d'un générateur de haute tension, d'un système d'injection des échantillons à analyser, d'un capillaire dont les deux extrémités sont en contact avec le tampon, et d'un dispositif de détection à travers le capillaire. Les différentes étapes de l'analyse sont contrôlées par un ordinateur.

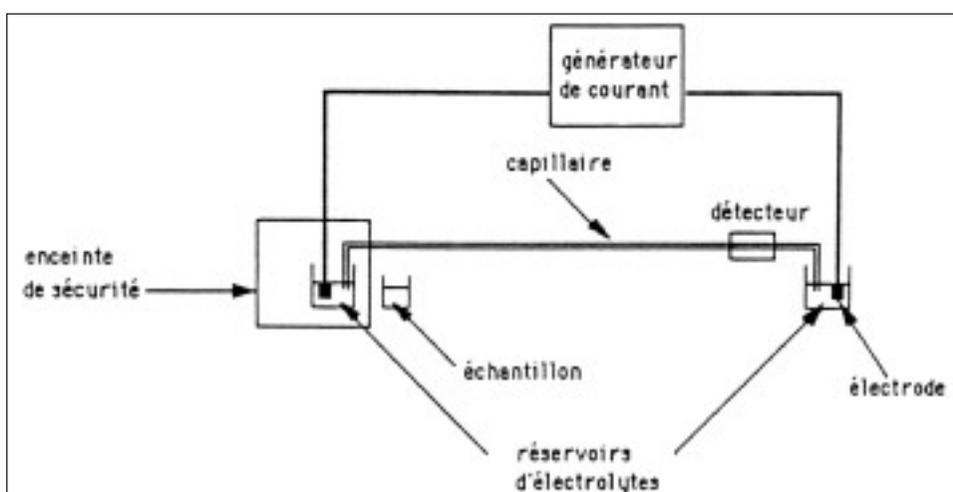


Figure 5 : Principe de l'électrophorèse capillaire.

Le générateur

Le plus souvent, les séparations sont faites à tension constante, à des valeurs pouvant atteindre 30 kV. Les courants peuvent atteindre 100 à 200 μ A. La programmation du générateur permet d'effectuer des paliers, contrôlés en temps et en tension.

Les capillaires

Les capillaires ont des diamètres internes de l'ordre de 20 à 100 μ m et des longueurs variant de quelques centimètres jusqu'à un mètre. Les deux extrémités des capillaires plongent dans des récipients contenant le tampon.

La composition des tubes capillaires, souvent faits de silice fondue, rend possible la détection directe des molécules à travers le tube par absorption lumineuse.

La paroi interne des tubes peut être traitée pour diminuer l'adsorption de certaines molécules telles que des ions ou des protéines.

Le système d'injection

Les volumes d'échantillon injectés dans un capillaire sont de l'ordre de quelques nanolitres. Il est nécessaire d'automatiser l'injection pour obtenir une reproductibilité satisfaisante dans le maniement d'aussi faibles volumes. On dispose de systèmes mécaniques par pression ou par dépression pendant un temps déterminé (les plus utilisés), ou de systèmes d'électro-injection par application d'une tension entre l'échantillon et le tube pendant une durée définie.

Le dispositif de détection

Le mode de détection de loin le plus fréquent est l'absorption lumineuse, en lumière ultraviolette ou en fluorescence. La mesure est effectuée à travers le capillaire, au fur et à mesure que les molécules se déplacent vers son extrémité.

D'autres modes de détection sont utilisés de façon plutôt expérimentale : la fluorimétrie par excitation au laser, la conductimétrie, la réfractométrie ou encore, l'électrochimie qui procure une très grande sensibilité.

VII.3- Différents modes de séparation

Plusieurs types de techniques ont été mises au point sur le même type d'instrument : l'électrophorèse capillaire en solution libre, l'électrophorèse capillaire en gel, l'isotachophorèse capillaire, l'isoélectrofocalisation capillaire, ou la chromatographie capillaire électrocinétique.

L'électrophorèse capillaire en solution libre

C'est la technique la plus simple et la plus utilisée. La séparation des molécules résulte de la force électrocinétique liée à leur charge, et du courant d'électroendosmose, l'une et l'autre déterminés par le pH du tampon. La limite de cette technique est qu'elle ne permet pas la séparation de molécules neutres.

L'électrophorèse capillaire en gel

Elle est surtout utilisée pour séparer des molécules dont la charge électrique est la même. Les gels permettent une séparation en fonction de la taille. Les gels ont aussi l'avantage de limiter la diffusion des molécules, ainsi que les phénomènes de convection. Ils diminuent

les effets du courant d'endosmose et empêchent l'adsorption des molécules sur les parois du tube. Cette technique est bien adaptée à la séparation de molécules telles que les nucléotides, ARN ou ADN, ou les protéines traitées par le SDS.

L'isotachophorèse capillaire

Dans cette technique, on s'arrange pour que l'endosmose soit nulle. Les échantillons à analyser sont injectés entre un électrolyte « meneur », plus rapide que les molécules de l'échantillon, et un électrolyte « terminal », plus lent que les autres molécules. L'établissement du champ électrique entraîne la répartition des molécules selon leur mobilité entre les électrolytes « meneur » et « terminal ». L'ensemble des molécules se déplace alors à vitesse égale et les différentes molécules se trouvent focalisées dans des zones très étroites, conduisant à une séparation à haute résolution.

L'isofocalisation électrique capillaire

Les molécules sont séparées dans un gradient de pH, formé sous l'influence du champ électrique par des ampholytes contenus dans le solvant. Les capillaires étant faciles à refroidir, on peut utiliser des tensions très élevées qui procurent des séparations de courte durée et une focalisation très fine. Des techniques ont été mises au point, aussi bien en solution libre qu'avec gel, qui donnent lieu à de nombreuses applications, comme l'analyse des isoformes de la transferrine ou la recherche de variants d'hémoglobine.

La chromatographie capillaire micellaire

Le principe de cette technique repose sur le partage des molécules à analyser entre une phase micellaire et le solvant. L'addition de micelles au solvant autorise la séparation de molécules neutres ou ayant une mobilité très voisine. De plus, grâce à leur pouvoir solubilisant, il est possible d'analyser des mélanges complexes comme le sérum ou les urines, et de les injecter directement.

VII.4 - Application à la séparation des protéines du sérum

L'électrophorèse des protéines du sérum est une technique utilisée quotidiennement dans les laboratoires, d'une part pour évaluer la répartition des protéines, mais surtout, pour mettre en évidence un composant monoclonal.

Deux systèmes d'électrophorèse capillaire sont actuellement commercialisés pour répondre aux besoins de la biologie médicale : le Paragon CZE 2000 (Beckman Coulter), et le système Capillarys (Sebia) dont le principe est celui de l'électrophorèse de zone. Plusieurs capillaires en silice sont installés en parallèle pour une productivité accrue. Les protéines sont séparées sous une tension de 9 000 volts en quelques minutes, en fonction de leur taille. Le courant d'électroendosmose entraîne toutes les molécules vers l'extrémité cathodique du capillaire, où se trouve un détecteur qui mesure leur absorbance à 214 nm.

La technique permet d'identifier une dizaine de protéines avec une très bonne séparation des fractions β_1 , qui contient la transferrine, et β_2 où se situe le complément C3. L'orosomucoïde est beaucoup mieux détecté qu'avec les techniques utilisant des colorants, ce qui donne un pic d' α_1 -globulines nettement plus important.

La reproductibilité des mesures est meilleure que celle des techniques classiques ; on observe par exemple des CV de l'ordre de 0,5 % pour l'albumine en électrophorèse capillaire, contre 2 à 3 % pour les techniques habituelles.

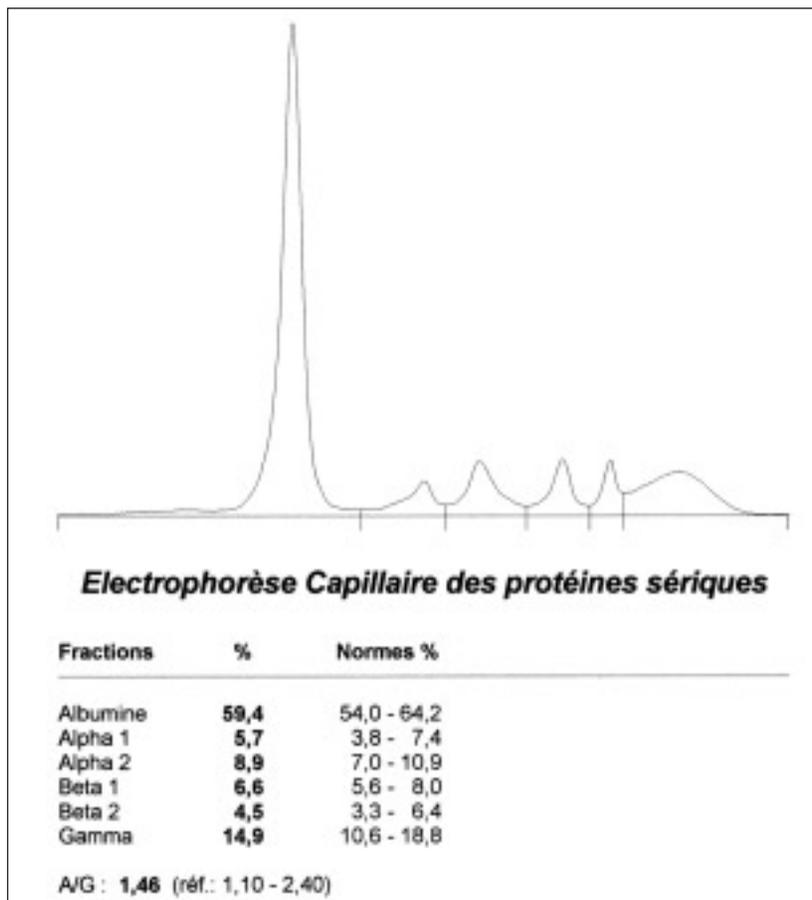


Figure 6 : *Electrophorèse capillaire : protéinogramme normal.*

En revanche, la limite de détection de l'ordre de 500 mg/L est sensiblement moins bonne que pour les techniques classiques où il n'est pas exceptionnel d'observer des bandes correspondant à 200 mg/L voire 150 mg/L de protéines.

Caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale

Les capacités des techniques capillaires et des techniques classiques à détecter un composant monoclonal sont proches. En électrophorèse capillaire, la résolution supérieure et, en particulier la bonne séparation des fractions β_1 et β_2 , améliore la possibilité de détecter un pic monoclonal situé dans ces zones, ce qui est assez fréquent avec des IgA. En revanche, un pic monoclonal de migration très cathodique peut passer inaperçu.

Bien que les progrès techniques soient permanents, il est possible que l'œil reste encore aujourd'hui un système de détection très discriminant et très performant. Dans une électrophorèse classique, même si le support est analysé par densitométrie après coloration, le coup d'œil du biologiste reste le meilleur moyen de contrôler la qualité du résultat, et il n'est pas rare que l'œil voie un pic très fin sur le gel coloré, confirmé comme étant une immunoglobuline monoclonale, qui aurait pu passer inaperçu sur le tracé du densitomètre. En électrophorèse capillaire, l'œil n'intervient plus.

Après détection d'un pic monoclonal, il faut caractériser l'immunoglobuline monoclonale. L'électrophorèse capillaire le permet par une technique « d'immunosoustraction ». Cela consiste à mettre en contact différents aliquots du sérum à étudier avec des anticorps

spécifiques anti-chaînes lourdes et anti-chaînes légères, puis à centrifuger les échantillons et à les injecter, chacun, dans un capillaire. Après détection, on peut observer que sur certains tracés, le pic monoclonal a disparu. Ces tracés correspondent aux échantillons où l'anticorps ajouté a précipité spécifiquement le composant monoclonal qui se trouve ainsi identifié.

Même si elle est très séduisante, rapide et automatisable, cette technique n'est pas encore aussi sensible que l'immunofixation en gel pour le typage d'un composant monoclonal.

■ VIII. CONCLUSION

Depuis quelques années, l'intérêt de l'électrophorèse des protéines du sérum comme outil de diagnostic diminue régulièrement. En effet, le développement des méthodes immunologiques de dosage spécifiques des principales protéines du sérum apporte des informations plus précises et plus justes que la simple évaluation de quelques fractions regroupant diverses protéines.

L'électrophorèse est néanmoins irremplaçable pour détecter la présence, dans le sérum, d'une immunoglobuline monoclonale, ainsi que les techniques qui en découlent (immunoelectrophorèse, immunofixation) pour en assurer le typage.

De plus, l'électrophorèse reste une méthode de choix et à moindre coût dans le suivi de nombreuses pathologies.

Dans les laboratoires où le nombre d'analyses est élevé, l'électrophorèse capillaire trouve sa place aujourd'hui grâce à son automatisation poussée. Si elle ne peut pas remplacer toutes les techniques classiques, notamment dans le domaine des immunoglobulines monoclonales, on peut imaginer que, dans l'avenir, les applications en routine se développeront et apporteront aux biologistes des outils performants.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

FAUCHIER P., BOUSQUET C., MARIEN M. Electrophorèses : principaux tracés normaux et pathologiques. Biologiste et Praticien, Paris.

MARIEN M. Electrophorèse des protéines. Cahier de formation de Biochimie, Bioforma, Paris, 1999.

LE CARRER D. Interprétation de l'électrophorèse des protéines. L'Eurobiologiste, 1989 ; XXIII ; 182 : 221-227.

ROBERT F., BOUILLOUX J.P., DENOROY L. L'électrophorèse capillaire : principe et applications. Ann. Biol. Clin., 1991 ; 49 : 137-148.

BLESSUM C., JEPPSSON J.O., AGUZZI F., BERNON H., BIENVENU J. L'électrophorèse capillaire : principe et applications au laboratoire de biologie clinique. Ann. Biol. Clin., 1999 ; 57 : 643-657.

IMMUNOGLOBULINES MONOCLONALES : RECHERCHE ET IDENTIFICATION

B.N. PHAM, L. INTRATOR

I. GÉNÉRALITÉS

Le terme d'immunoglobuline monoclonale se réfère au produit de sécrétion résultant de l'expansion d'un clone de cellules de la lignée B. L'immunoglobuline monoclonale est habituellement normale sur les plans structural et fonctionnel. Les molécules constituant l'immunoglobuline monoclonale possèdent une même chaîne lourde et une même chaîne légère.

L'expansion clonale B peut être maligne. C'est le cas du myélome multiple qui est une prolifération monoclonale plasmocytaire, avec sécrétion d'immunoglobuline monoclonale dans la majeure partie des cas. Il existe plusieurs variétés « immunochimiques » de myélome. Dans la variété « immunoglobuline monoclonale entière », il existe une synthèse équilibrée de chaînes lourdes et de chaînes légères par les plasmocytes malins. Dans la variété « immunoglobuline monoclonale entière accompagnée de protéine de Bence Jones », il existe une synthèse accrue de chaînes légères par rapport à la synthèse de chaînes lourdes. L'excès de chaînes légères libres (non liées à des chaînes lourdes) monoclonales constitue la protéine de Bence Jones. La protéine de Bence Jones, de part sa faible masse moléculaire, est plus souvent détectée dans les urines que dans le sang (sauf en cas de polymérisation ou d'insuffisance rénale). Dans la variété « protéine de Bence Jones isolée » (environ 20 % des cas), on ne détecte qu'une protéine de Bence Jones, sans immunoglobuline monoclonale entière. Enfin, dans la variété « myélome non excréteur » (environ 1 % des cas), on ne détecte ni immunoglobuline monoclonale entière, ni protéine de Bence Jones sérique et urinaire. Le terme de « non excréteur » est d'ailleurs inapproprié car, dans l'immense majorité des cas, les plasmocytes secrètent une immunoglobuline anormale, dégradée après sa sécrétion et/ou déposée dans les tissus (amylose ou maladie de Randall).

La présence d'immunoglobuline monoclonale dans le sérum d'un patient n'est pas synonyme de malignité. Dans 50 % des cas, voire plus en fonction de la sensibilité des techniques utilisées, l'immunoglobuline monoclonale est associée à des contextes cliniques très variés, en dehors de toute affection maligne, ou à aucun contexte précis (gammopathie monoclonale dite de signification indéterminée, ou MGUS pour monoclonal gammopathy of undetermined significance) [1]. Ainsi, si la présence d'immunoglobuline monoclonale est connue depuis longtemps, elle n'est cependant pas toujours bien comprise. Le suivi à long terme de patients ayant une gammopathie monoclonale de signification indéterminée a montré que le risque de progression de la gammopathie vers le myélome multiple ou les

syndromes apparentés était de l'ordre de 1 % par an [2]. Deux facteurs prédictifs de risque de progression vers un processus malin ont été identifiés. La concentration ainsi que la classe de l'immunoglobuline monoclonale seraient deux facteurs indépendants [2]. Le risque de progression vers un syndrome immunoprolifératif à 10 ans a été évalué à 6 %, 11 % et 34 % lorsque la concentration de l'immunoglobuline monoclonale au moment du dépistage était respectivement de 5 g/L, 15 g/L et 30 g/L. Par ailleurs, les patients ayant une immunoglobuline monoclonale de classe IgA ou IgM seraient plus à risque de progression que ceux ayant une immunoglobuline monoclonale de classe IgG ($p = 0,001$). Ainsi, l'ensemble de ces données soulignent l'importance du diagnostic biologique d'une immunoglobuline monoclonale, en terme de concentration (mieux appréciée par la simple électrophorèse que par le dosage) et d'analyse immunochimique.

La recherche et la caractérisation des immunoglobulines monoclonales ne doivent pas se faire en dehors d'un contexte clinique défini. L'interprétation des résultats doit prendre en compte l'ensemble des données cliniques et biologiques (biochimie, cytologie, etc.). Ce chapitre ne traitera que la recherche d'immunoglobuline monoclonale dans le sang.

■ II. MODALITÉS DE PRÉLÈVEMENT

Comme pour tout anticorps, la recherche d'immunoglobuline monoclonale se fait dans du sérum. Le prélèvement doit être effectué chez les patients en jeûne lipidique. Il est réalisé sur tube sec, sans gel activateur de la coagulation. En cas de recherche de cryoglobuline, le prélèvement devra être effectué et acheminé à 37 °C au plus vite au laboratoire (voir chapitre correspondant). Certaines cryoglobulines, notamment quand elles sont abondantes et susceptibles de précipiter à des températures élevées, sont perdues dans le caillot si ces conditions thermiques ne sont pas respectées. En cas de cryoglobuline connue, le prélèvement doit respecter les conditions énoncées ci-dessus pour l'ensemble de l'étude.

Au laboratoire, le sérum doit être décanté classiquement, réparti en aliquotes si nécessaire, puis gardé à + 4 °C jusqu'à exécution des analyses.

■ III. MÉTHODES

L'analyse immunochimique d'une immunoglobuline monoclonale peut être réalisée par différentes techniques, éventuellement complémentaires : l'immunoélectrophorèse, l'immunofixation, l'immunoempreinte (western blot) et plus récemment, l'électrophorèse capillaire de zone après immunosoustraction.

L'homogénéité structurale des molécules constituant l'immunoglobuline monoclonale implique une homogénéité de charge électrique, qui se traduit par une mobilité électrophorétique étroite propre à chaque immunoglobuline monoclonale. Cette caractéristique biochimique est à la base des différentes techniques utilisées pour distinguer l'immunoglobuline monoclonale des immunoglobulines polyclonales normales.

III.1- L'immunoélectrophorèse

Mise au point par Grabar et Williams, l'immunoélectrophorèse est une technique d'immunodiffusion particulièrement performante [3]. Elle permet d'identifier les constituants d'un mélange par deux propriétés indépendantes : mobilité électrophorétique et spécificité antigénique. Ces propriétés sont celles des réactions de double diffusion en gel. La migration d'une protéine dépend de sa concentration et de sa masse moléculaire ; il existe une ligne de précipitation par complexe antigène-anticorps.

a) Principe

Le premier temps de la technique consiste à appliquer un champ électrique à un mélange d'antigènes (sérum), déposé dans un puits creusé dans un gel d'agarose (*figure 1*). Les différents constituants du sérum sont ainsi séparés selon leur mobilité électrophorétique. Dans un second temps, on dépose un antiserum polyspécifique ou monospécifique dans un réservoir parallèle au champ de migration des protéines. La diffusion des antigènes et anticorps, les uns vers les autres, dans le gel entraîne la formation de lignes de précipitation à l'équivalence. Chaque protéine, en fonction de sa migration électrophorétique, de sa concentration et de sa diffusion, donne lieu, selon l'antisérum utilisé, à une ligne de précipitation dont la forme et la position sont caractéristiques.

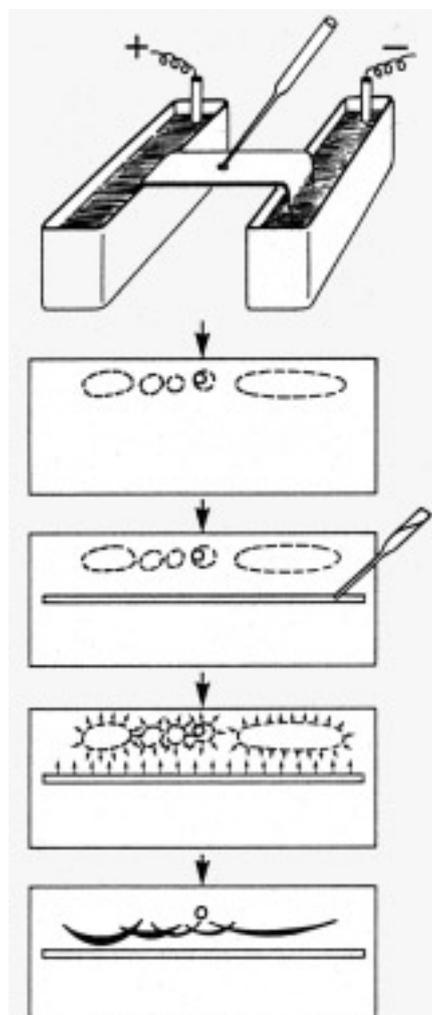


Figure 1 : Principe de l'immunoélectrophorèse.

b) Résultats et interprétation

L'immunoélectrophorèse est une technique semi-quantitative, fondée sur la comparaison de lignes de précipitation avec une préparation témoin, le réservoir pour le dépôt d'anti-sérum étant disposé à égale distance de deux pistes électrophorétiques. L'analyse d'un échantillon se fait donc toujours par rapport à un témoin, appelé sérum humain normal. Le sérum humain normal doit, en fait, être un « pool » de sérums humains normaux, retenus après vérification de la protidémie, de l'électrophorèse des protéines et du dosage des immunoglobulines polyclonales.

Planches 1-4 : Recherche d'immunoglobuline monoclonale par immunoélectrophorèse.

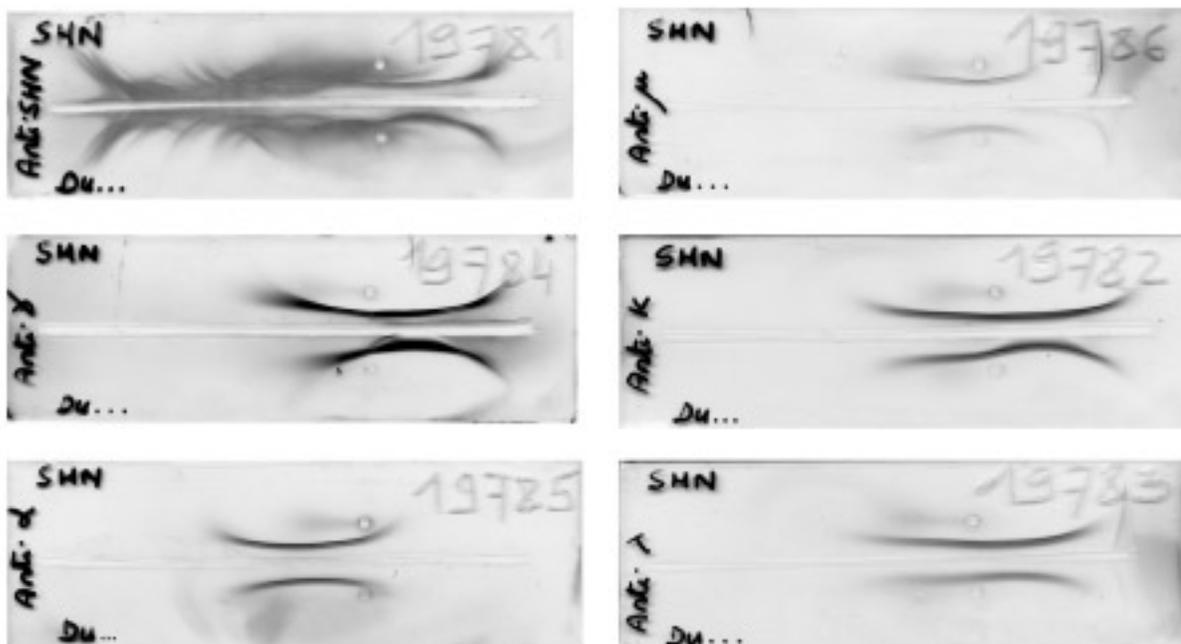


Planche 1 : Immunoglobuline monoclonale de type IgG Kappa.

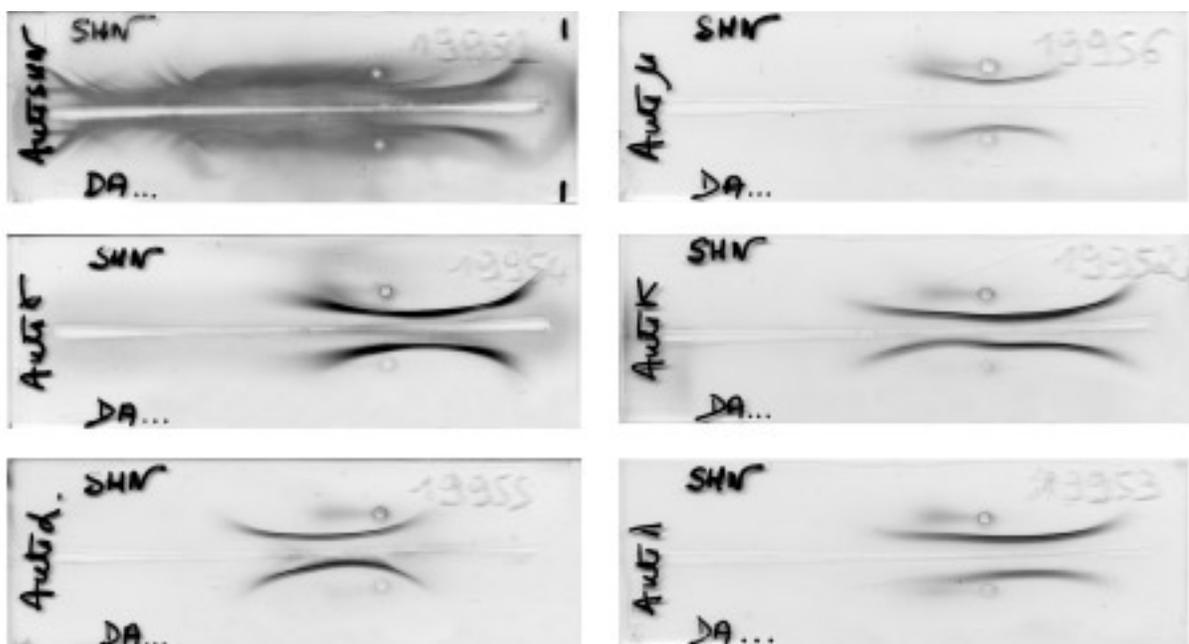


Planche 2 : Immunoglobuline monoclonale de type IgA Kappa.

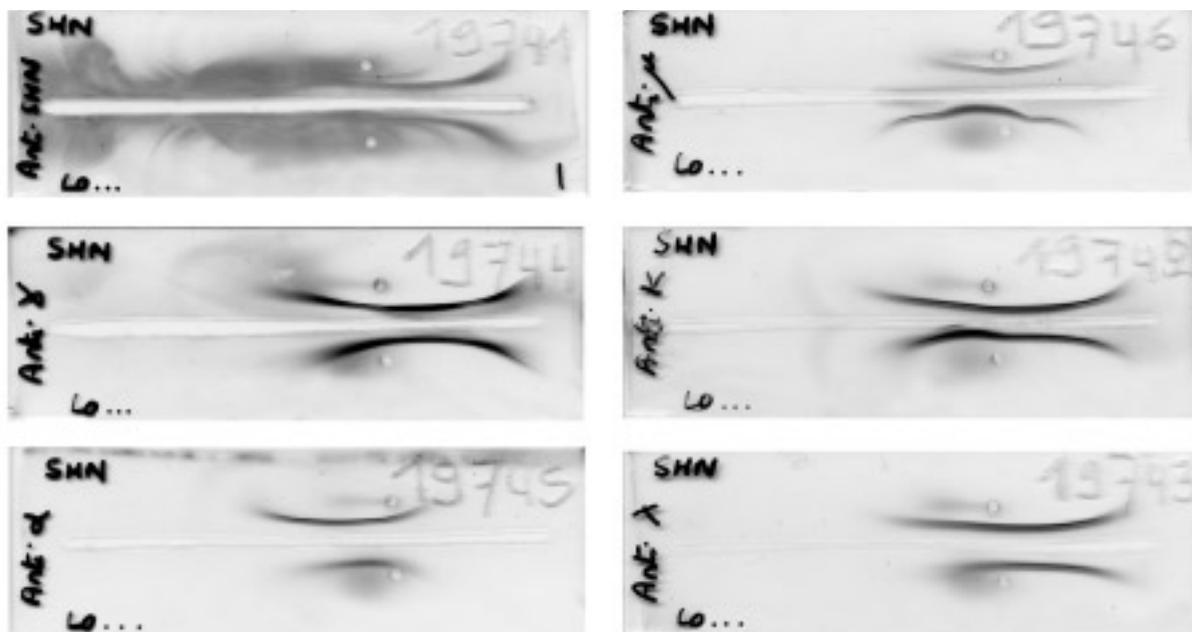


Planche 3 : Immunoglobuline monoclonale de type IgM Kappa.

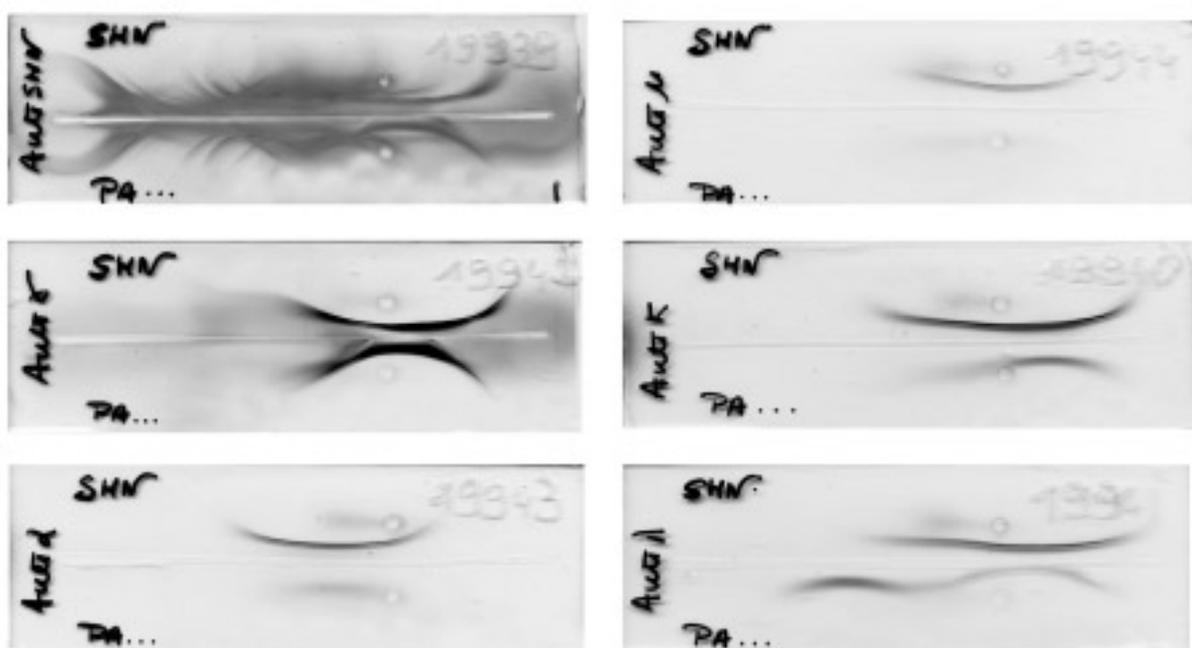


Planche 4 : Immunoglobuline monoclonale de type IgG Lambda, associée à une protéine de Bence Jones Lambda.

Avec un antisérum polyspécifique (antisérum anti-sérum humain normal obtenu chez un animal), on obtient jusqu'à 30 lignes de précipitation distinctes. La présence d'une immunoglobuline monoclonale déforme la ligne de précipitation des immunoglobulines normales de même classe vers le réservoir. L'utilisation conjointe de différents antisérums monospécifiques (classiquement, antisérums anti- γ , α , μ , κ , et λ) permet de caractériser l'isotype de l'immunoglobuline monoclonale : le repérage d'une ligne de précipitation déformée avec un antisérum anti-chaîne lourde (ex : antisérum anti- γ), associée à une ligne de précipitation déformée avec un antisérum anti-chaîne légère (ex : antisérum

anti- κ), au même endroit de migration électrophorétique, signe la présence d'une immunoglobuline monoclonale, IgG Kappa dans cet exemple (*planche 1*).

c) Difficultés de l'immunoélectrophorèse

La lecture et l'interprétation des lames requièrent du personnel formé et expérimenté.

• Paramètres « techniques » :

En cas de « technique maison », les puits de dépôt d'échantillon et les réservoirs d'antisérums sont découpés à l'emporte-pièce dans le gel. Une irrégularité de découpe peut entraîner la déformation artéfactuelle d'une ligne de précipitation. L'épaisseur de la gélose ou agarose doit être homogène et son adhérence à la lame (qui doit être dégraissée) parfaite.

Comme pour les autres techniques, les antisérums commerciaux doivent être soigneusement contrôlés.

• Facteurs liés aux sérums :

– La présence d'immunoglobuline monoclonale en grande quantité dans un sérum peut induire un phénomène de zone. Ce dernier se traduit par une absence de ligne de précipitation à l'endroit de migration électrophorétique de l'immunoglobuline monoclonale. En effet, l'excès d'antigène entraîne une dissociation des complexes antigène-anticorps et donc une redissolution des précipités. Il faut alors diluer le sérum pour corriger l'artéfact.

– Le repérage d'une ligne de précipitation déformée avec un antisérum anti-chaîne légère (ex : antisérum anti- λ), sans déformation des lignes de précipitation avec les antisérums anti-chaînes lourdes habituellement utilisés (antisérums anti- γ , α , μ), doit conduire à une recherche spécifique d'IgD et d'IgE avant de conclure. Il faut noter que 90 % des immunoglobulines monoclonales de classe IgD sont de type Lambda.

– Certaines IgA monoclonales de type Lambda réagissent mal ou pas avec les antisérums anti-chaînes légères, sans qu'on en comprenne bien la raison.

– La chaîne légère des IgM monoclonales n'est souvent pas directement typable. Il suffit, en général, de procéder à une dépolymérisation de l'IgM par un agent réducteur, tel que le β mercaptoéthanol, pour typer la chaîne légère.

– Un « cercle » de précipitation autour du puits de dépôt de sérum doit faire évoquer la présence de cryoglobuline ou d'IgM polymérisées.

– La présence de deux immunoglobulines monoclonales se traduit par des lignes de précipitation déformées à deux endroits différents. L'interprétation doit tenir compte de la différence de migration électrophorétique des deux molécules.

– La déformation d'une ligne de précipitation, liée à la présence d'immunoglobuline monoclonale, ne doit pas être confondue avec l'épaississement d'une ligne de précipitation, liée à une augmentation de la concentration des immunoglobulines polyclonales.

– En cas de sérum hypogammaglobulinémique, les lignes de précipitation des immunoglobulines normales sont raccourcies.

d) L'immunosélection

L'immunosélection est une technique dérivée de l'immunoélectrophorèse, qui permet le diagnostic de maladies des chaînes lourdes (voir chapitre correspondant) [4, 5].

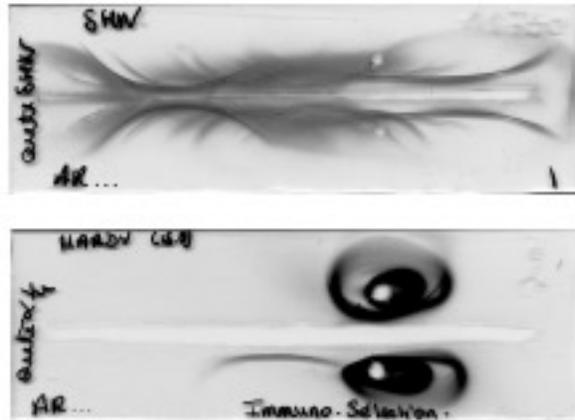


Planche 5 : Analyse par immunosélection d'un sérum de patient atteint de maladie des chaînes lourdes α .

Les immunoglobulines entières sont trappées au point de dépôt. La ligne de précipitation révélée par l'antisérum anti- α met en évidence la présence de chaînes lourdes α libres.

Le principe de l'immunosélection consiste à incorporer dans le gel des antisérums anti-chaînes légères en quantité importante. Les immunoglobulines entières sont ainsi trappées au point de dépôt. Seules les protéines dépourvues de chaînes légères migrent après application du champ électrique. La présence de chaînes lourdes libres (non liées à des chaînes légères) est révélée secondairement par un antisérum anti-chaînes lourdes choisi (*planche 5*). Dans la maladie des chaînes lourdes α , il faut noter que la ligne de précipitation révélant les chaînes lourdes libres est rarement déformée, bien que ces immunoglobulines soient monoclonales. L'existence de diverses formes polymériques, d'une hétérogénéité de glycosylation et d'une hétérogénéité des résidus aminoterminaux, due à une protéolyse limitée post synthétique, explique l'hétérogénéité de charge électrique souvent observée dans cette maladie. Cette hétérogénéité de charge électrique est à l'origine du caractère restreint mais habituellement non étroit du pic électrophorétique, voire de l'absence de tout pic détectable, ce qui conduit à la méconnaissance fréquente de l'anomalie.

III.2- L'immunofixation

L'immunofixation est la technique la plus utilisée par les laboratoires pour la recherche d'immunoglobuline monoclonale [6].

a) Principe

Après fractionnement électrophorétique des constituants du sérum, l'incubation des pistes électrophorétiques avec différents antisérums monospécifiques permet la précipitation *in situ* des immunoglobulines. Après lavage, les immunoglobulines précipitées sont révélées par un colorant.

b) Résultats et interprétation

La première piste de tout gel d'immunofixation est une piste témoin d'électrophorèse. Elle permet de repérer la présence d'une immunoglobuline monoclonale par la mise en évidence d'une bande étroite (pic), le plus souvent dans la zone des γ -globulines, mais parfois dans la zone des β -voire des α -globulines.

Les immunoglobulines polyclonales sont révélées sous forme d'un précipité diffus, plus ou moins large.

La présence d'une immunoglobuline monoclonale se traduit par une bande étroite révélée avec un antisérum anti-chaînes lourdes (anti- γ , α ou μ), associée à une bande étroite révélée avec un antisérum anti-chaînes légères (anti- κ ou λ). **Toutes deux sont précipitées au même niveau de migration électrophorétique que la bande étroite présente sur la piste témoin d'électrophorèse** (*planches A1 à A3*).

En cas de bande étroite révélée avec un antisérum anti-chaînes légères (anti- κ ou anti- λ), sans bande étroite avec les antisérums anti-chaînes lourdes classiques (anti- γ , α ou μ), il est nécessaire de refaire une immunofixation avant d'interpréter ce profil d'immuno-précipitation. En effet, deux antisérums complémentaires, à savoir anti- δ et anti- ϵ , doivent alors être utilisés. Si l'utilisation de ces deux antisérums anti- δ , et anti- ϵ est peu fréquente en pratique courante, elle ne doit cependant pas être oubliée. Au terme de ces deux étapes, on peut alors conclure soit à la présence d'immunoglobuline monoclonale de type IgD ou IgE (bande étroite avec l'antisérum anti- δ ou ϵ et bande étroite avec l'antisérum anti- κ ou λ), soit à la présence de protéine de Bence Jones (bande étroite uniquement avec l'antisérum anti-chaînes légères) (*planches B1 et B2*).

En cas de bande étroite ou restreinte révélée avec un antisérum anti-chaînes lourdes (le plus fréquemment anti- α), sans bande correspondante avec les antisérums anti-chaînes légères κ ou λ , il faut évoquer le diagnostic de maladie des chaînes lourdes si les données cliniques sont en faveur (voir chapitre correspondant). L'immunosélecton permet de confirmer ou non le diagnostic, l'absence de précipitation avec les antisérums anti-chaînes légères en immunofixation ou en immunoélectrophorèse n'étant pas un critère suffisant. En dehors de ce contexte clinique particulier, l'absence de bande étroite avec les antisérums anti-chaînes légères est parfois liée à la qualité même des antisérums ou du gel. Il faut savoir en changer avant de conclure.

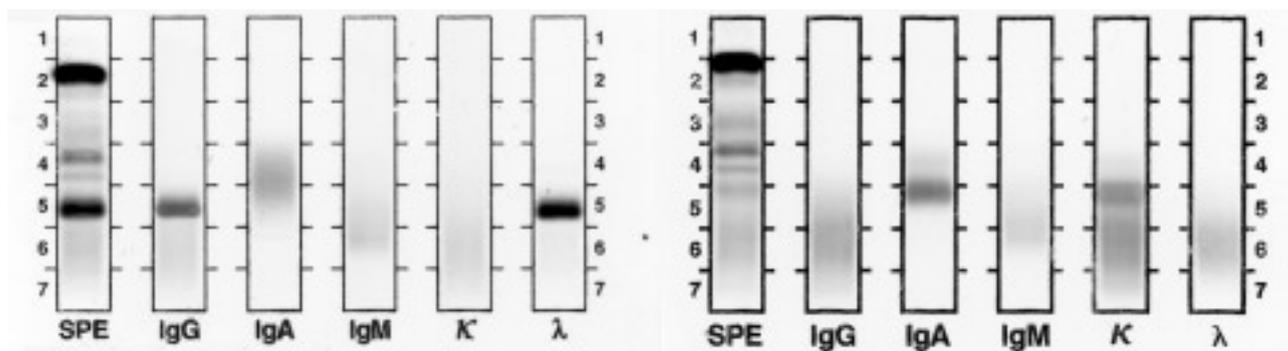
c) Difficultés de l'immunofixation

Bien que simple d'exécution et de lecture, l'immunofixation n'est cependant pas dénuée de pièges.

• Paramètres « techniques » :

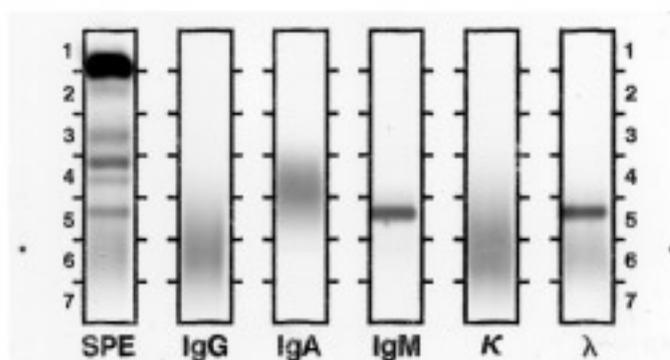
La préparation des échantillons est une étape technique essentielle, trop souvent négligée voire méconnue. La dilution du sérum à tester doit être calculée en fonction de la concentration protéique totale, ou mieux, en fonction des dosages des immunoglobulines polyclonales. La réaction de précipitation se produit pour un rapport antigène-anticorps donné, dans la zone d'équivalence. En excès d'antigène (sérum insuffisamment dilué par rapport au volume d'antisérum déposé), il se produit un phénomène de zone. Celui-ci se traduit par une bande éclaircie en son centre, le précipité ne se formant que sur les contours externes de la bande où le rapport antigène-anticorps est adéquat (*planche C*). Ce profil de précipitation ne doit pas être confondu avec la présence de deux bandes de précipitation distinctes. En excès d'anticorps (sérum trop dilué par rapport au volume d'antisérum déposé), il y a une absence de précipité d'où un résultat faussement négatif. **Connaissant la concentration protéique totale, la règle est de généralement diluer les sérums de façon à ce que l'immunoglobuline monoclonale soit à une concentration de 1 g/L.** Force est de constater que ce paramètre technique est méconnu de la plupart des utilisateurs. Il serait important que les

Planches A-E : Recherche d'immunoglobuline monoclonale par immunofixation.

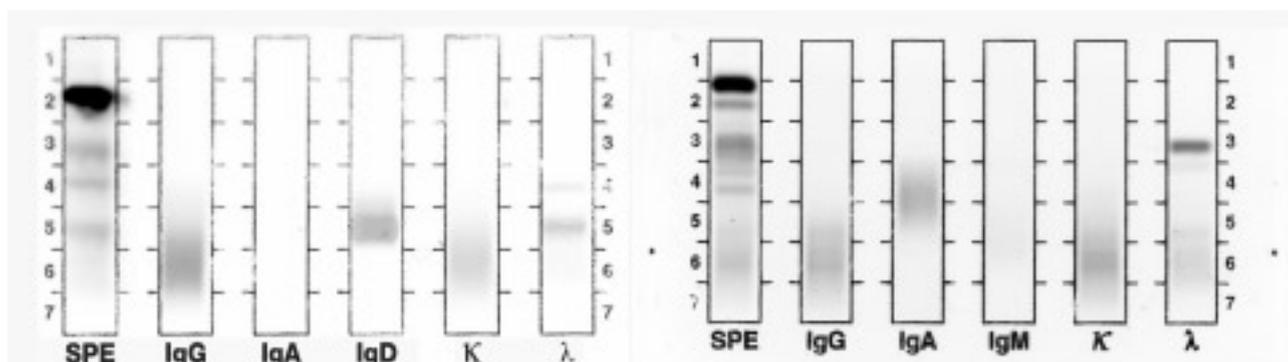
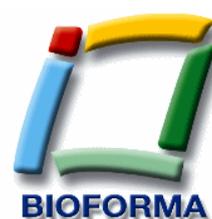


A 1 : Immunoglobuline monoclonale de type IgG Lambda.

A 2 : Immunoglobuline monoclonale de type IgA Kappa.

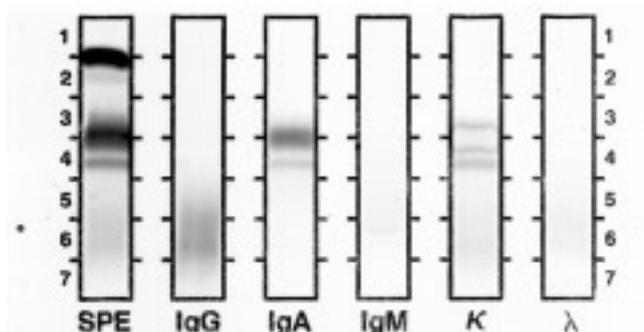


A 3 : Immunoglobuline monoclonale de type IgM Lambda.

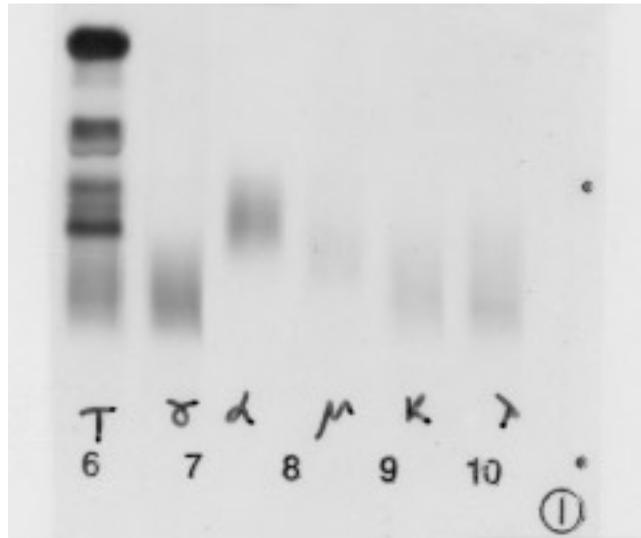


B 1 : Immunoglobuline monoclonale de type IgD Lambda, associée à une protéine de Bence Jones Lambda.

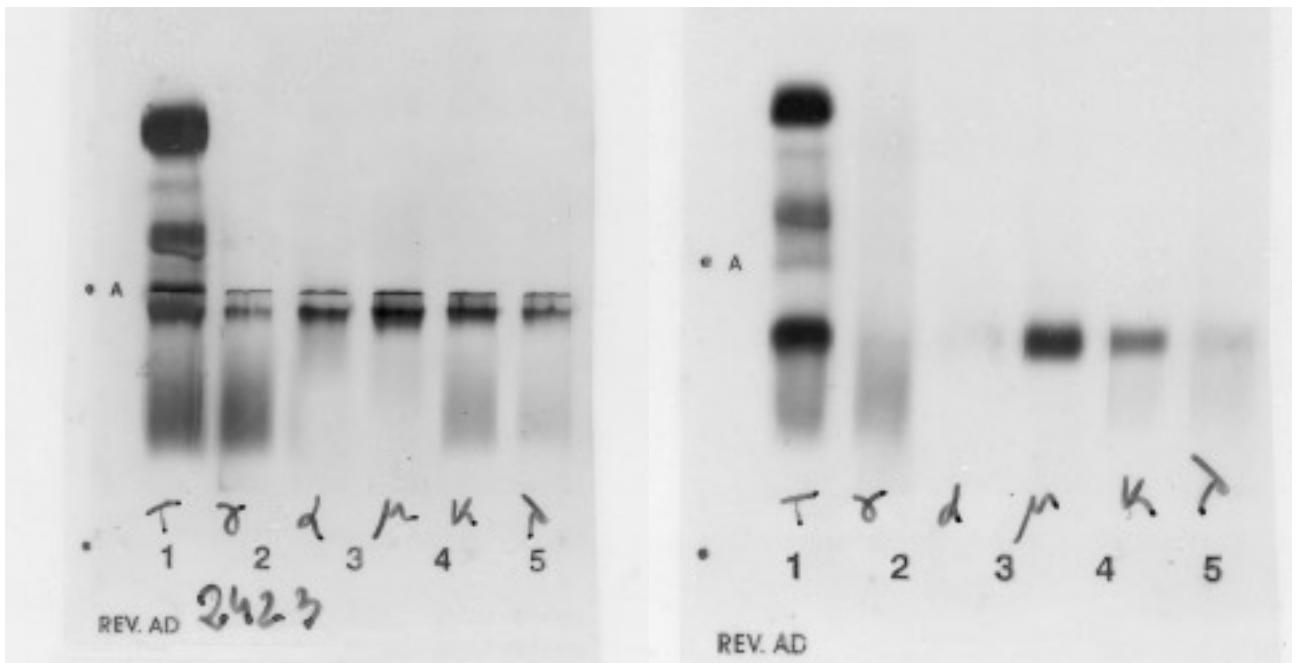
B 2 : Protéine de Bence Jones Lambda migrant dans la zone des α_2 -globulines.



C : Phénomène de zone avec l'antisérum anti-Kappa.



D : Profil d'immunofixation obtenu lors de la manipulation de plasma.



E1 : Artéfact lié à la présence de cryoglobuline.

E2 : Analyse du même sérum après traitement par β mercaptoéthanol et migration à 37 °C.

fabricants revoient les notices des différentes trouses d'immunofixation, afin que ce paramètre soit clairement expliqué et systématiquement pris en compte.

• Facteurs liés au prélèvement :

– La recherche d'immunoglobuline monoclonale doit être réalisée dans un échantillon de sérum. La présence de fibrinogène dans l'échantillon testé se traduit par l'existence d'une bande étroite entre les β et les γ -globulines sur la piste témoin d'électrophorèse, non révélée par les antisérums utilisés (*planche D*). Un traitement de l'échantillon par de la thrombine (thrombine 10 UI/mL final) permet d'éliminer la bande artéfactuelle.

– Les sérums lipidiques et les sérums hémolysés induisent le même type « d'interférence analytique » : bande étroite entre les β et les γ -globulines ou bande étroite au niveau des β globulines sur la piste témoin d'électrophorèse, non révélée par les antisérums utilisés. Pour les sérums hémolysés et les sérums lipidiques dus à un non respect du jeûne lipidique, un nouvel échantillon de sérum obtenu après prélèvement adéquat doit être demandé.

– La mise en évidence de bandes de précipitation au niveau de toutes les pistes d'un gel d'immunofixation doit faire évoquer la présence de cryoglobuline, d'immunoglobulines de classe IgM précipitant au dépôt, ou de complexes IgM-IgG (*planche E1*). En cas de cryoglobuline (voir chapitre correspondant), le sérum devra être placé à 37 °C avant d'être analysé dans des conditions techniques particulières : cuve d'électrophorèse placée dans une étuve à 37 °C pour permettre une migration électrophorétique correcte de la cryoglobuline, sans risque de précipitation dans le gel par diminution de l'amplitude thermique (*planche E2*). En l'absence de cryoglobuline, le sérum devra être traité par un agent réducteur avant d'être ré-analysé : β mercaptoéthanol (adjonction de 5 μ L de β mercaptoéthanol dans 100 μ L de sérum, laissé 3 min à température ambiante sous hotte chimique) ou chlorhydrate de cystéine (adjonction de 10 μ L de chlorhydrate de cystéine pH 7,8, laissé une nuit à température ambiante).

III.3- L'immunoempreinte

L'immunoempreinte est la technique la plus sensible pour détecter une immunoglobuline monoclonale [7, 8]. Elle révèle des immunoglobulines monoclonales à des concentrations aussi faibles que quelques μ g/mL. C'est aussi la technique la plus discriminative, grâce à la possibilité d'utiliser des gels plus résolutifs qu'en immunofixation.

a) Principe

Après fractionnement électrophorétique sur gel fin d'agarose, les protéines sériques sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par simple pression, puis révélées avec des antisérums de spécificité donnée, conjugués à une enzyme chromogénique. On peut aussi effectuer le transfert sur une membrane saturée par un antigène donné et révéler les immunoglobulines monoclonales ayant l'activité anticorps correspondante. Cette technique de transfert sur filtre affiné est extrêmement sensible.

b) Résultats et interprétation

La présence d'une immunoglobuline monoclonale se traduit par une bande étroite révélée avec un antisérum anti-chaînes lourdes et une bande étroite révélée avec un antisérum anti-chaînes légères (*photo 1*). Cette technique ne comporte pas de risque de résultat faussement négatif lié au phénomène de zone. Son principe permet l'utilisation d'anticorps non précipitants, donc d'anticorps monoclonaux.

III.4- L'électrophorèse capillaire de zone après immunosoustraction

Intermédiaire entre l'électrophorèse classique et la chromatographie en phase liquide, l'électrophorèse capillaire est une technique qui a récemment été utilisée pour la recherche d'immunoglobuline monoclonale [9, 10].

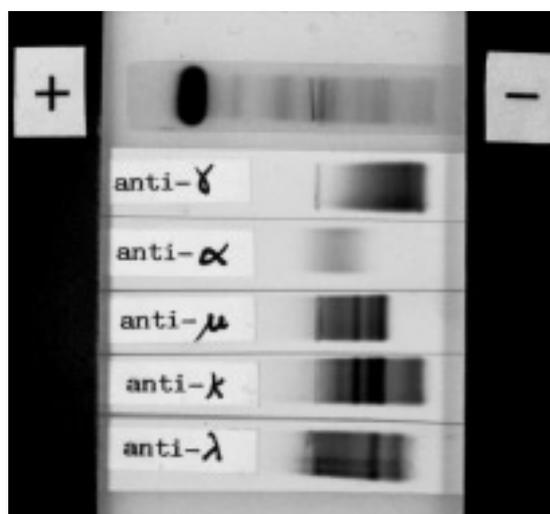


Photo 1 : Recherche d'immunoglobuline monoclonale par immunoempreinte.
L'immunoempreinte révèle la présence de multiples immunoglobulines monoclonales.

a) Principe

L'électrophorèse capillaire est une technique de séparation électrocinétique réalisée dans des tubes de faible diamètre. Dans l'électrophorèse capillaire de zone, aussi appelée électrophorèse capillaire en solution libre, le tube est rempli uniquement avec une solution tampon standard contrairement, par exemple, à l'électrophorèse capillaire en gel où le tube est rempli de gel de polyacrylamide. La recherche d'immunoglobuline monoclonale en électrophorèse capillaire se fait après immunosoustraction préalable. La première étape consiste à mettre en contact protéines et anticorps spécifiques fixés sur billes de sépharose. Chaque échantillon dilué est déposé dans cinq puits différents. Chacun de ces puits contient des billes couplées respectivement à un antiserum anti- γ , α , μ , κ ou λ . Un sixième puits, sans billes ajoutées, sert de référence. Les complexes antigène-anticorps précipitent au fond des puits par sédimentation (immunosoustraction). Les surnageants sont ensuite prélevés et injectés dans les capillaires où a lieu l'étape de séparation électrophorétique (électrophorèse capillaire de zone).

b) Résultats et interprétation

L'analyse des résultats se fait en comparant les six électrophorégrammes de l'échantillon testé. La présence d'une immunoglobuline monoclonale se traduit par l'absence ou la diminution d'un pic observé avec un antiserum anti-chaînes lourdes, et l'absence ou la diminution d'un pic observé avec un antiserum anti-chaînes légères, en superposition avec l'électrophorégramme de référence (*planche F*). Cette technique rend aussi compte de la présence de protéine de Bence Jones.

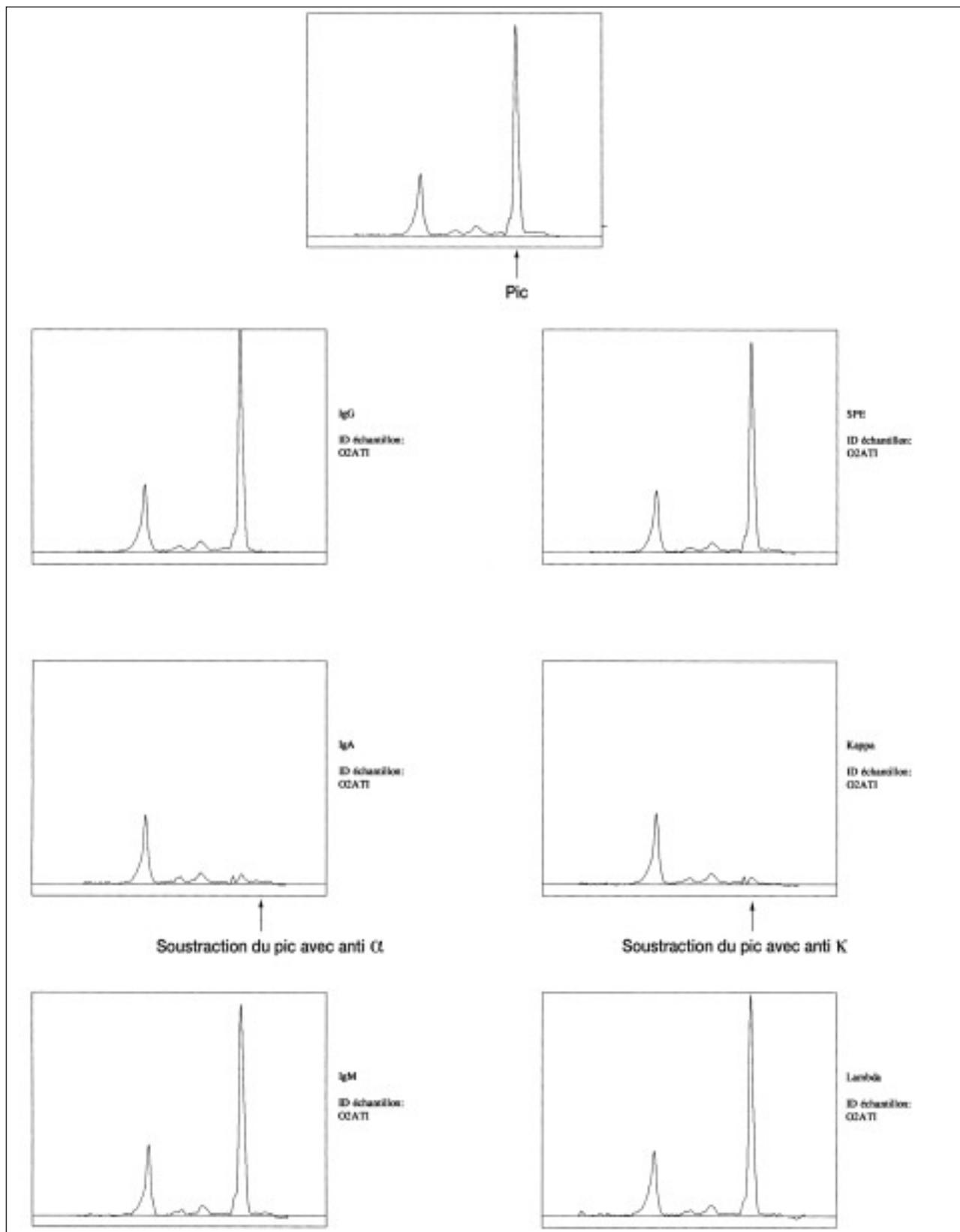


Planche F : Recherche d'immunoglobuline monoclonale par électrophorèse capillaire de zone après immunosoustraction.
 La disparition du pic étroit, observé sur l'électrophorégramme de référence au niveau des β -globulines, avec un antiserum anti- α et un antiserum anti- κ traduit la présence d'une IgA Kappa monoclonale.

■ IV. AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES DIFFÉRENTES MÉTHODES

L'immunoélectrophorèse reste la technique de référence pour la recherche d'immunoglobuline monoclonale, bien que largement remplacée par l'immunofixation dans les laboratoires de diagnostic. En milieu hospitalier, cette technique, le plus souvent « maison », apporte de nombreux renseignements pour un coût faible. Certaines immunoglobulines monoclonales de classe IgM, en faible quantité dans le sérum, sont parfois mieux détectées en immunoélectrophorèse qu'en immunofixation. Cependant, le délai de réponse relativement long et surtout, la nécessité d'un personnel formé et expérimenté expliquent l'abandon progressif de l'immunoélectrophorèse au profit de techniques plus faciles à réaliser. Néanmoins, il faut insister sur l'importance de maintenir cette technique « artisanale » dans quelques laboratoires spécialisés. L'immunosélecton, méthode de référence pour le diagnostic des maladies des chaînes lourdes α , dérive de l'immunoélectrophorèse. Ainsi, garder « le savoir faire » immunoélectrophorèse permet, en plus, de répondre aux demandes des cliniciens pour ce diagnostic particulier.

L'immunofixation est une technique rapide, simple d'exécution voire automatisable. La caractérisation d'immunoglobuline monoclonale est effectuée en moins de quatre heures. La résolution de cette méthode permet de mettre en évidence des immunoglobulines monoclonales en petite quantité dans le sérum, plus difficiles à repérer en immunoélectrophorèse. Par ailleurs, l'immunofixation offre l'avantage de pouvoir facilement caractériser plusieurs immunoglobulines monoclonales présentes dans un même sérum (profil parfois appelé à tort « profil oligoclonal ») (*planches G1 et G2*). Néanmoins, la facilité de lecture qu'elle offre peut devenir un inconvénient notable lorsque l'immunofixation est interprétée par des biologistes insuffisamment formés. La grande fréquence des anomalies minimales, parfaitement banales, détectées par les techniques sensibles, doit rendre l'interprétation soigneuse pour éviter les erreurs par excès. A l'inverse, il faut rappeler que des résultats faussement négatifs peuvent être induits au moment de la préparation des échantillons (étape de dilution des sérums, telle que décrite au paragraphe précédent). Ainsi, si le choix de l'immunofixation dans la majorité des laboratoires est tout à fait justifié, en tant que technique simple et sensible, il faut cependant insister sur l'importance de la qualité de la formation à apporter aux biologistes.

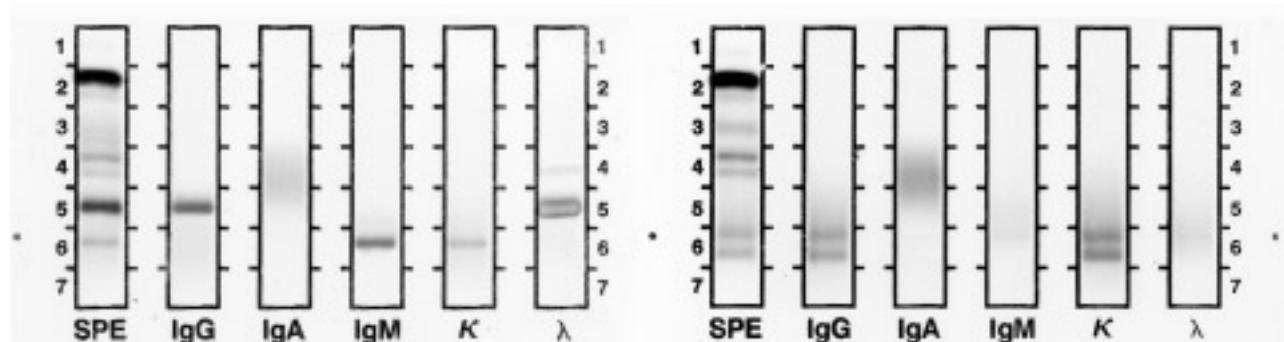


Planche G

G1 : Association d'une IgG Lambda monoclonale, d'une IgM Kappa monoclonale et d'une protéine de Bence Jones Lambda

G2 : Présence de deux immunoglobulines monoclonales de type IgG Kappa.

L'immunoempreinte est, de loin, la technique la plus sensible pour la recherche d'immunoglobuline monoclonale. Sa résolution permet de détecter des immunoglobulines monoclonales quantifiées à 20 µg/mL. En plus de son moindre coût, de la possibilité d'effectuer plusieurs typages successifs sur une même bande de nitrocellulose (réaction réversible), l'immunoempreinte a l'avantage d'être facile à interpréter. Comme l'immunofixation, cette technique permet de caractériser plusieurs immunoglobulines monoclonales présentes dans un même sérum. Cependant, il n'existe aucune trousse commerciale. Cela explique que l'immunoempreinte ne soit utilisée que dans très peu de laboratoires spécialisés.

L'électrophorèse capillaire de zone après immunosoustraction est la méthode la plus récemment introduite pour la recherche d'immunoglobuline monoclonale. L'automatisation de la technique va de la préparation des échantillons à partir des tubes primaires, à l'obtention des électrophorégrammes après analyse simultanée des six échantillons. L'interprétation des résultats reste du domaine du biologiste. Le principal inconvénient de cette méthode découle de son principe même. En effet, l'identification d'une immunoglobuline monoclonale n'est possible que si la présence de cette dernière se traduit par un pic étroit « individualisable » à l'électrophorèse, permettant « d'appliquer » une immunosoustraction qui fera disparaître le pic étroit. Aussi, toute immunoglobuline monoclonale migrant en dehors de la zone des γ -globulines et/ou en dehors d'une « vallée » peut être méconnue par cette méthode [11]. De même, la présence d'immunoglobuline monoclonale en faible quantité dans le sérum peut passer inaperçue. Ainsi, l'électrophorèse capillaire de zone après immunosoustraction est une technique de première intention qui nécessite d'avoir accès à l'immunofixation en complément d'exploration, pour certains patients.

■ V. POUR OU CONTRE ?

Le rapport Kappa/Lambda

Le rapport Kappa/Lambda est le rapport du dosage pondéral des chaînes légères, Kappa et Lambda, réalisé avec des antisérums spécifiques en néphélémétrie. Selon certains auteurs, ce rapport permettrait de dépister la présence d'une immunoglobuline monoclonale sérique [12-14]. Le rapport Kappa/Lambda ($1,29 < \kappa/\lambda$ « normal » $< 2,61$) augmenterait en cas d'immunoglobuline monoclonale avec chaîne légère Kappa ($\kappa/\lambda > 2,61$), ou au contraire, diminuerait en cas d'immunoglobuline monoclonale avec chaîne légère Lambda ($\kappa/\lambda < 1,29$) [13]. Cependant, plusieurs études ont montré les limites de cette « technique de dépistage ». La principale limite tient au manque de sensibilité de ce rapport, sa sensibilité étant comprise entre 58 % et 76 % [15, 16]. La présence d'immunoglobuline monoclonale à une concentration supérieure à 5 g/L serait détectée par un rapport Kappa/Lambda anormal dans 75 % des cas. La présence d'immunoglobuline monoclonale à un taux inférieur à 5 g/L serait détectée par un rapport Kappa/Lambda anormal dans 42 % des cas [15]. Par ailleurs, la spécificité du rapport Kappa/Lambda serait de l'ordre de 87 % à 93 % [15, 16]. Un rapport anormal, sans présence d'immunoglobuline monoclonale, a été rapporté chez divers patients, sans qu'un diagnostic particulier n'ait été individualisé. Ces résultats prouvent le manque de fiabilité d'un tel dosage dans le cadre d'un dépistage.

L'association de paramètres pour le dépistage d'immunoglobuline monoclonale

L'idée d'associer plusieurs paramètres pour établir un profil prédictif négatif de présence d'immunoglobuline monoclonale a été proposée par plusieurs auteurs [13, 16, 17]. Le but de ce profil prédictif négatif était de faire une économie sur le nombre d'immunofixation à réaliser. Les paramètres associés étaient les suivants : électrophorèse des protéines sériques, dosage pondéral des IgG, IgA, IgM et rapport Kappa/Lambda. La normalité de ces trois paramètres éliminait la présence d'immunoglobuline monoclonale. Cependant, selon Peronnet et coll., cette association de paramètres négatifs serait susceptible de « rater » la présence d'immunoglobuline monoclonale puisqu'elle a été prise en défaut chez 4 patients sur 370 [16]. Le message qu'il est raisonnable de retenir est de toujours utiliser une technique d'identification d'immunoglobuline monoclonale (immunoélectrophorèse, immunofixation, immunoempreinte), quels que soient les résultats des autres paramètres, pour la recherche d'une immunoglobuline monoclonale.

Les antisérums anti-chaînes légères libres

Les antisérums anti-chaînes légères libres sont des sérums d'animaux immunisés contre les chaînes légères humaines Kappa et Lambda, non associées à des chaînes lourdes. L'utilisation de tels antisérums a pour but d'aider au diagnostic de protéines de Bence Jones qui, par définition, sont des chaînes légères libres monoclonales. Chaque protéine de Bence Jones a nécessairement une structure physico-chimique qui lui est propre, et donc une migration électrophorétique qui lui est propre. Lorsqu'elle est associée à une immunoglobuline monoclonale entière, la protéine de Bence Jones est révélée, en immunoélectrophorèse ou en immunofixation, par une ligne de précipitation de migration électrophorétique différente de la ligne de précipitation révélant la chaîne légère associée à la chaîne lourde (immunoglobuline monoclonale), lorsqu'on utilise un antisérum anti-chaînes légères « classique ». Lorsqu'elle est isolée, c'est l'absence de mise en évidence de chaînes lourdes associées (γ , α , μ , δ ou ϵ) qui permet de faire le diagnostic de protéine de Bence Jones. Ainsi, le raisonnement à partir des différents profils de migration électrophorétique est, à lui seul, suffisant pour faire le diagnostic de protéine de Bence Jones associée à une immunoglobuline entière ou de protéine de Bence Jones isolée. L'utilisation d'antisérums anti-chaînes légères libres est loin d'être nécessaire, ni obligatoire. Les cas où la protéine de Bence Jones a une migration électrophorétique identique à celle de l'immunoglobuline monoclonale entière sont rares. Enfin, avant d'utiliser des antisérums anti-chaînes légères libres, il faut au préalable vérifier que ces antisérums sont bien spécifiques des chaînes légères libres et ne reconnaissent pas les chaînes légères liées. Cela implique de vérifier l'absence de ligne de précipitation lorsque l'antisérum anti-chaînes légères libres est mis en contact avec des IgG, des IgA ou des IgM sériques.

Des antisérums anti-chaînes légères libres, adaptés à la néphélométrie, viennent récemment d'être commercialisés. Ces réactifs permettraient de quantifier, en unités arbitraires, les protéines de Bence Jones sériques. L'intérêt de ces dosages serait d'améliorer la sensibilité des techniques actuellement utilisées pour la détection de protéine de Bence Jones, et d'avoir un paramètre de suivi pour ces patients [18]. Les évaluations concernant ces réactifs sont en cours.

■ VI. CONCLUSION

La recherche d'immunoglobuline monoclonale est un examen biologique qui ne peut être réalisé que dans un contexte clinique défini. Pour répondre à la nomenclature des actes de biologie médicale, cet examen doit être rendu avec des « commentaires », comme indiqué par l'acte N° 1571. A ce titre, on peut regretter que ce document ne propose pas d'emblée aux biologistes de réaliser systématiquement l'indispensable électrophorèse des protéines sériques, la recherche d'immunoglobuline monoclonale par immunoelectrophorèse, immunofixation ou autre technique, ainsi que le dosage pondéral des immunoglobulines polyclonales. En effet, l'interprétation d'une recherche d'immunoglobuline monoclonale doit nécessairement tenir compte du résultat de ces trois examens. Aussi serait-il souhaitable de regrouper ces trois examens sous une même analyse qui serait appelée « recherche d'immunoglobuline monoclonale ». Il est d'autant plus important d'insister sur la nécessité de toujours réaliser ces trois examens systématiquement, que les résultats du premier Contrôle National de Qualité « Immunoglobuline monoclonale » 2001 ont montré que certains biologistes avaient conclu à l'absence d'immunoglobuline monoclonale malgré l'existence d'un pic étroit à l'électrophorèse. Enfin, l'importance de l'étude des urines (recherche d'une protéinurie de Bence Jones) a été largement démontrée. Elle fera peut-être l'objet d'un cahier de formation à part, vu la complexité des maladies néphrologiques associées. L'ensemble des données prouve, si besoin il en était, que la qualité de la démarche diagnostique des biologistes est essentielle pour répondre correctement à la demande des cliniciens. La nécessité d'un dialogue clinico-biologique efficace prend toute son importance dans le contexte des immunoglobulines monoclonales.

BIBLIOGRAPHIE

- 1-KYLE R.A. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Baillieres Clin. Haematol.*, 1995 ; 8 : 761-781.
- 2-KYLE R.A., THERNEAU T.M., RAJKUMAR S.V., OFFORD J.R., LARSON D.R., PLEVAK M.F., MELTON III L.J. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.*, 2002 ; 346 : 564-569.
- 3-GRABAR P., WILLIAMS C.A. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Applications au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1953 ; 10 : 193-194.
- 4-RADL J. Light chain typing of immunoglobulins in small samples of biological materials. *Immunology*, 1970 ; 19 : 137-149.
- 5-DOE W.F., DANON F., SELIGMANN M. Immunodiagnosis of alpha chain disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 1979 ; 36 : 189-197.

- 6-ALPER C.A., JOHNSON A.M. Immunofixation electrophoresis : a technique for the study of protein polymorphism. *Vox Sang.*, 1969 ; 17 : 445-452.
- 7-TOWBIN H., STAEHELIN T., GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1979 ; 76 : 4350-4354.
- 8-AUCOUTURIER P., CAPELLA M., BRIAULT S., DANON F., INTRATOR L., PREUD'HOMME J.L. Caractérisation des immunoglobulines monoclonales dans les liquides biologiques par immunoempreinte sur nitrocellulose. *Rev. Institut Pasteur Lyon*, 1987 ; 20 : 147-153.
- 9-LANDERS J.P. Clinical capillary electrophoresis. *Clin. Chem.*, 1995 ; 41 : 495-509.
- 10-BIENVENU J., GRAZIANI M.S., ARPIN F., BERNON H., BLESSUM C., MARCHETTI C., RIGHETTI G., SOMENZINI M., VERGA G., AGUZZI F. Multicenter evaluation of the Paragon CZETM 2000 capillary zone electrophoresis system for serum protein electrophoresis and monoclonal component typing. *Clin. Chem.*, 1998 ; 44 : 599-605.
- 11-BOSSUYT X., BOGAERTS A., SCHIETTEKATTE G., BLANCKAERT N. Detection and classification of paraproteins by capillary immunofixation/subtraction. *Clin. Chem.*, 1998 ; 44 : 760-764.
- 12-LIEVENS M.M. Medical and technical usefulness of measurement of kappa and lambda immunoglobulin light chains in serum with an M-component. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1989 ; 27 : 519-523.
- 13-JONES R.G., AGUZZI F., BIENVENU J., GASPARRO C., BERGAMI M.R., BIANCHI P., PERINET A., PENN G., KELLER I., WHICHER J.T. Use of immunoglobulin heavy-chain and light-chain measurements in a multicenter trial to investigate monoclonal components : II. Classification by use of computer-based algorithms. *Clin. Chem.*, 1991 ; 37 : 1922-1926.
- 14-MYARA I., ASSO M., TENENHAUS D., MOATTI N. Usefulness of the kappa/lambda ratio for detecting a new monoclonal component in a patient with a monoclonal gammopathy. *Clin. Chem.*, 1994 ; 231 : 115-116.
- 15-JONES R.G., AGUZZI F., BIENVENU J., BIANCHI P., GASPARRO C., BERGAMI M.R., PERINET A., BERNON H., PENN G.M., KELLER I. et al. Use of immunoglobulin heavy-chain and light-chain measurements in a multicenter trial to investigate monoclonal components : I. Detection. *Clin. Chem.*, 1991 ; 37 : 1917-1921.
- 16-PERONNET F., DEBATTY D., VIROT J.S., ZURLINDEN A. Gammopathies monoclonales : performances comparées de l'électrophorèse, de l'immunofixation, du profil immunologique et du rapport kappa/lambda dans le dépistage des gammopathies monoclonales. *Feuill. Biol.*, 1999 ; 40 : 43-49.

- 17-CACOUB P., CAMPROUX A.C., THIOLIERES J.M., ASSOGBA U., HAUSFATER P., MALLET A., FOGLIETTI M.J., PIETTE J.C., BERNARD M. A new approach for rapid detection and typing of serum monoclonal components. Clin. Chim. Acta, 2000 ; 302 : 105-124.
- 18-DRAYSON M., TANG L.X., DREW R., MEAD G.P., CARR-SMITH H., BRADWELL A.R. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. Blood, 2001 ; 97 : 2900-2902.



DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES SÉRIQUES

J. BIENVENU

Le dosage des immunoglobulines sériques est un examen de premier plan dans l'exploration de l'immunité humorale. Il permet de faire le diagnostic des déficits immunitaires globaux ou partiels en immunoglobulines, et d'explorer les hypergammaglobulinémies. Le dosage des immunoglobulines doit nécessairement être associé à la réalisation d'une électrophorèse des protéines sériques. Cette dernière permet d'identifier la présence éventuelle d'une immunoglobuline monoclonale, dont la détection est rarement possible sur la seule base de la concentration des différentes classes d'immunoglobulines, et dont la présence peut être responsable d'interférences dans ce dosage.

Nous n'envisagerons dans ce chapitre que la détermination des trois classes principales d'immunoglobulines : IgG, IgA et IgM.

I. LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DOSAGE

Les immunoglobulines sont des macromolécules antigéniques qui peuvent former des agrégats de forte masse moléculaire après liaison avec des anticorps spécifiquement dirigés contre elles. Cette réaction antigène-anticorps se révèle par un phénomène d'immunoprécipitation. Etant donnée la concentration circulante élevée des immunoglobulines (de l'ordre de 1 à 10 g/L selon la classe), les techniques d'immunoprécipitation sont particulièrement adaptées à la quantification des immunoglobulines sériques.

I.1 - Le principe de l'immunoprécipitation

Une courbe typique d'immunoprécipitation, telle qu'initialement décrite en 1935 par Heidelberger et Kendall [1], est présentée dans la *figure 1*. Si l'on mélange des quantités croissantes d'un antigène soluble à une quantité constante d'anticorps spécifiquement dirigé contre celui-ci, la réaction initiale qui se déroule en excès d'anticorps aboutit à la formation de complexes immuns de petite taille, une grande partie des molécules anticorps restant à l'état libre. Le nombre de ces complexes immuns est proportionnel à la concentration en antigène. Cette liaison réversible dépend essentiellement des forces de Van der Waals et des liaisons hydrogène. En pratique, un immunosérum est composé d'une population très hétérogène d'anticorps qui reconnaissent chacun des épitopes différents à la surface de l'antigène. Pour les immunoglobulines, ces épitopes sont très nombreux et chaque réaction élémentaire épitope-anticorps possède sa constante d'affinité propre. La moyenne des constantes d'affinité de toutes ces réactions élémentaires correspond à l'avidité de l'immunosérum. L'avidité conditionne la vitesse de la réaction. Si la concentration en antigène continue à croître pour une concentration fixe d'anticorps, les complexes immuns vont former un réseau dense,

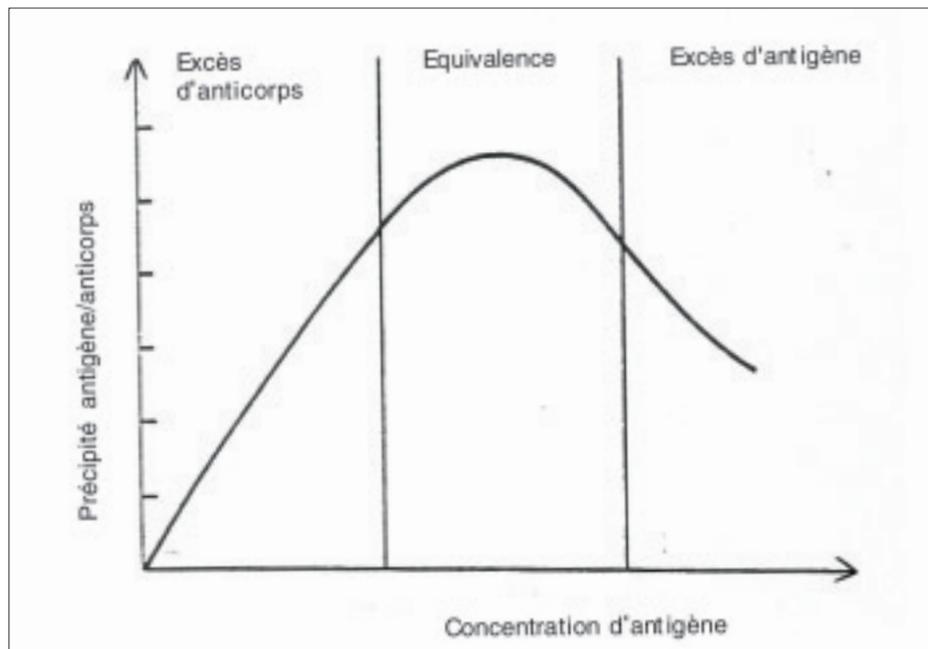


Figure 1

aboutissant à la constitution d'agrégats visibles qui précipitent. Il faut souligner que les immunsérums de type cheval, plus riches en groupements hydrophiles, maintiennent les complexes immuns plus longtemps en solution que les immunsérums de type lapin. Ce dernier type d'immunsérums produit chez le lapin, mais aussi chez la chèvre ou le mouton, est à utiliser en immunoprécipitation en milieu liquide, car il donne une limite de détection plus basse qu'avec les immunsérums de type cheval, en produisant un précipité quantifiable même pour une faible concentration d'antigène.

Si l'on continue à ajouter de l'antigène à la solution d'anticorps à concentration fixe, une zone d'équivalence est atteinte pour laquelle il n'y a plus d'anticorps libres. Puis, si l'addition d'antigène se poursuit, la courbe d'immunoprécipitation va passer en zone d'excès d'antigène, où les complexes sont solubilisés par les antigènes libres ajoutés. L'observation de la figure 1 montre clairement qu'un même signal peut être fourni par des complexes immuns correspondant à deux concentrations d'antigène très différentes : l'une située en zone d'excès d'anticorps, l'autre en zone d'excès d'antigène. **Ce phénomène d'excès d'antigène représente un « piège » majeur de l'immunoprécipitation en milieu liquide.** Le dosage des immunoglobulines sériques est particulièrement exposé à ce problème, car leur concentration peut être multipliée par un facteur très important (parfois supérieur à 20 par rapport à la normale), notamment lorsqu'il existe une immunoglobuline monoclonale. Ceci justifie la réalisation d'une électrophorèse pour vérifier son absence. Il est donc important que les appareillages ou réactifs développés pour le dosage des immunoglobulines puissent donner un signal d'alerte, en cas de passage dans la zone d'excès d'antigène. Les mesures doivent effectivement être réalisées en excès d'anticorps.

I.2- Les différentes techniques utilisant l'immunoprécipitation

L'immunoprécipitation peut être réalisée en milieu gélifié ou en milieu liquide.

1.2.1 - L'immunoprécipitation en milieu gélifié

– L'immunodiffusion radiale :

Cette méthode introduite en 1965 par Mancini et al. [2] a constitué une avancée majeure dans l'étude de protéines, car elle a permis pour la première fois la quantification des protéines par immunochimie. A partir d'un puits où on a déposé quelques μL d'échantillon, la diffusion de l'antigène dans un gel contenant un anticorps spécifique entraîne la précipitation, visible à l'œil nu, du complexe antigène-anticorps. Le diamètre du cercle de précipitation augmente progressivement avec la diffusion de l'antigène pour se stabiliser lorsque le point d'équivalence est atteint. En pratique, le carré du diamètre de l'anneau, mesuré à l'équivalence, est proportionnel à la concentration d'antigène. Le dosage est réalisé par comparaison avec une droite d'étalonnage, établie en trois points avec des concentrations connues d'antigène.

L'immunodiffusion radiale est de mise en œuvre simple. Elle ne nécessite pas d'appareillage particulier. Les inconvénients majeurs de la méthode sont représentés par son caractère manuel et sa lenteur de réalisation. Le résultat n'est obtenu qu'après 48 heures, et parfois même 72 heures pour les grosses molécules antigéniques comme les IgM qui diffusent mal dans les mailles du gel. Pour le dosage des immunoglobulines sériques, les IgA et les IgM sont dosées directement dans le sérum « pur », alors que l'échantillon sera dilué pour le dosage des IgG. Le nombre de laboratoires français utilisant l'immunodiffusion radiale pour le dosage des immunoglobulines a considérablement diminué. Il n'était que de 6,5 % lors du dernier Contrôle de Qualité National de 1995.

– L'électroimmunodiffusion :

L'électroimmunodiffusion ou méthode des rockets de Laurell [3] utilise le même principe d'immunoprécipitation en gel que l'immunodiffusion radiale mais, sous l'effet d'un champ électrique lors d'une étape d'électrophorèse, la diffusion de l'antigène est orientée vers l'anode. L'immunoprécipité obtenu en 3 à 4 heures prend donc la forme d'une « rocket », dont la hauteur est proportionnelle à la concentration d'antigène. Cette technique nécessite que l'antigène soit mobile à pH 8,6, pH pour lequel les anticorps inclus dans la gélose ont la migration la plus faible. Une agarose à faible courant d'électro-endosmose est utilisée pour éviter la formation de « rockets » en position cathodique (IgG et IgM), ce qui se traduit par la formation d'une double ligne de précipitation de part et d'autre du puits, avec aspect en cigare. Les IgA, quant à elles, donnent un pic anodique. Une mobilité exclusivement anodique peut être conférée à toutes les classes d'immunoglobulines à pH 8,6 par des traitements utilisant une formylation ou une carbamylation. L'électroimmunodiffusion n'est pas utilisée en France pour doser les immunoglobulines.

1.2.2 - L'immunoprécipitation en milieu liquide

Le précipité, formé dans une solution par les complexes immuns, diffuse et absorbe la lumière. L'immunonéphélométrie mesure la lumière diffusée alors que l'immunoturbidimétrie analyse l'intensité de la lumière transmise dans le prolongement du rayon incident.

– L'immunonéphélométrie :

La réaction antigène-anticorps se déroule en excès d'anticorps et dans ces conditions, la quantité de lumière diffusée augmente avec la concentration d'antigène.

L'immunonéphélométrie est surtout applicable aux solutions de complexes antigène-anticorps diluées pour lesquelles la réflexion et l'auto-absorption sont minimales ; cette condition est relativement aisée à respecter car elle peut être obtenue par dilution de l'échantillon. L'intensité de la lumière diffusée étant souvent faible, il faut avoir recours à des sources de lumière de forte intensité et à des photodétecteurs sensibles. En dehors du risque d'excès d'antigène évoqué précédemment, un problème important de l'immunonéphélométrie est lié à la diffusion non immunologique de la lumière par des particules en suspension ou des substances lipidiques. Une filtration ou une délipidation améliore généralement les résultats. L'immunonéphélométrie est la méthode la plus utilisée en France pour doser les immunoglobulines, avec 48,5 % d'utilisateurs lors du dernier Contrôle National de Qualité [4]. Certains appareillages ont été spécifiquement développés pour le dosage des protéines (*tableau I*). Ils diffèrent entre eux principalement par l'angle de mesure et la méthode de traitement du signal. Ainsi, l'augmentation de la lumière diffusée peut être quantifiée soit en mesurant la différence entre l'intensité du signal obtenu immédiatement après l'addition d'anticorps (10 secondes environ) et après un temps fixe (mesure en 2 points), soit par mesure continue pendant une durée donnée (mesure en cinétique). Les résultats cinétiques sont moins soumis à l'influence des troubles non spécifiques.

Tableau I : Principales méthodes utilisées pour le dosage des immunoglobulines sériques

Méthode	Réactif	Appareillage
Néphélométrie	Beckman Coulter (The) Binding Site Biotrol Dade Behring	ICS/Array, Image Minineph Turbox BN 100, BNII, BN Pro Spec
Turbidimétrie	Bayer Beckman Coulter Dade Behring Olympus Roche Diagnostics BMD, Dako, Fumouze, Immuno, Konelab, Labbo...	Advia 1650 Gammex CX et Synchron Gamme Dimension ARS, ARx, RxL, Xpand, Turbitimer Olympus AU 2700, AU 5400 Integra 400, 700, 800 Gammex Hitachi et Modular Adaptation sur de nombreux appareils de Biochimie
Immunodiffusion Radiale	Dade Behring	NOR - Partigen

– L'immunoturbidimétrie :

Cette méthode mesure la lumière absorbée par les complexes antigène-anticorps. Elle nécessite des concentrations plus élevées de particules en suspension. La loi de Beer-Lambert s'applique à l'immunoturbidimétrie. Une grande proportion de la lumière incidente est transmise, ce qui se traduit par un signal très fort, avec une faible diminution liée à l'absorption. Les mesures du signal ne sont donc souvent que de quelques dizaines de milliunités d'absorbance. La très grande sensibilité des spectrophotomètres actuellement commercialisés a permis d'améliorer la précision et la limite de détection. Cette technique est également très répandue (42,5 % des laboratoires français l'utilisent), car elle est utilisable sur la plupart des analyseurs de biochimie (*tableau I*). Sur ces analyseurs

non spécialisés, il conviendra de vérifier comment est contrôlée l'apparition d'un excès d'antigène, et si l'adaptation des réactifs est validée par le fabricant de l'appareillage. Certains turbidimètres ont également été spécifiquement développés pour le dosage des protéines. Ils permettent de détecter l'excès d'antigène par la mesure simultanée de la vitesse maximale (V_{max}) d'apparition du précipité, et le temps maximum (t_{max}) d'apparition de ce précipité, une seule concentration d'antigène pouvant être reliée à une valeur de V_{max} et de t_{max} données. Il est à noter que les méthodes immunoturbidimétriques sont soumises à des interférences lors de l'analyse d'échantillons présentant une forte absorbance, telle que celle de sérums très ictériques, hémolysés et bien sûr hyperlipémiques.

L'immunoprécipitation en milieu liquide peut être amplifiée par l'utilisation d'accélérateurs constitués de polymères non ioniques tels que le dextran, la polyvinyl pyrrolidone ou le polyéthylène glycol (PEG). C'est surtout le PEG de masse moléculaire 6 000 daltons (PEG 6000) qui est utilisé. Ce polymère agit par un phénomène d'exclusion stérique. Ceci entraîne une augmentation de la concentration des molécules protéiques dans le solvant en les rendant moins solubles et facilite alors la formation du complexe antigène-anticorps avec obtention plus rapide d'un plateau. Tous les réactifs commercialisés pour l'immunonéphélométrie ou l'immunoturbidimétrie renferment des polymères qui permettent d'augmenter la vitesse des réactions et d'améliorer la limite de détection. La concentration optimale pour le PEG 6000 est comprise entre 20 et 40 g/L (*figure 2*), le dosage des immunoglobulines de classe IgA étant plus dépendant de la concentration en PEG que celui des IgG [5]. Néanmoins, il faut signaler que l'addition de PEG dans le milieu réactionnel peut entraîner des réactions non spécifiques se traduisant par des « blancs » élevés. Les techniques immunonéphélométriques et immunoturbidimétriques sont aujourd'hui adoptées par la presque totalité des laboratoires pour le dosage des immunoglobulines, car elles répondent aux exigences de spécificité, sensibilité, rapidité et d'automatisation sur des appareillages très répandus.

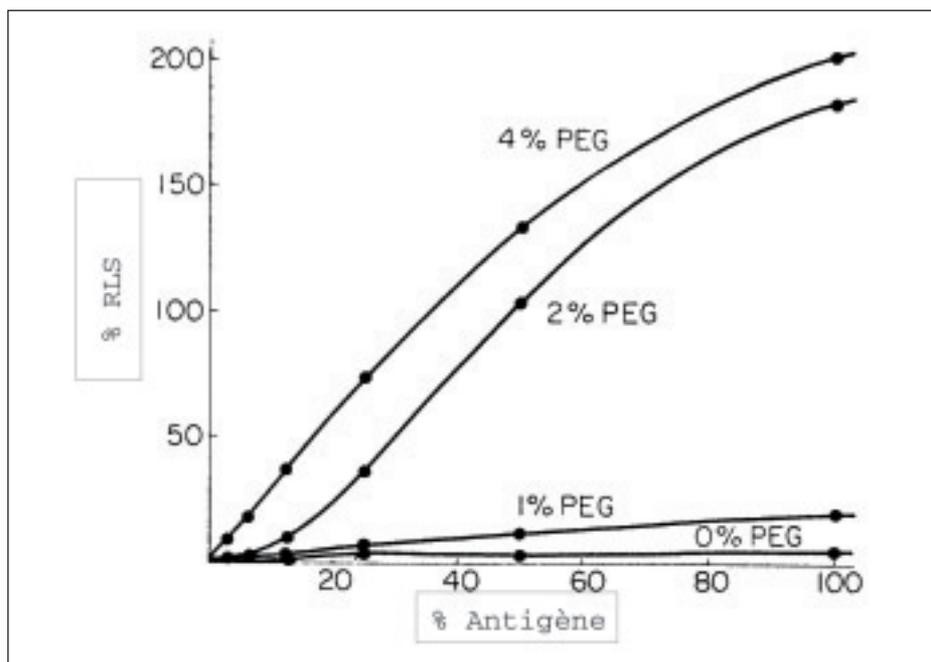


Figure 2

■ II. CRITÈRES CONDITIONNANT LA QUALITÉ DES MÉTHODES DE DOSAGE

II.1 - Phase préanalytique

Le sérum sera préféré au plasma pour le dosage des immunoglobulines, car il est moins turbide. Cependant, le plasma est utilisable ; il sera recueilli sur héparine de préférence.

Les sérums lactescents devront faire l'objet d'un soin particulier au niveau des « blancs » échantillon et éventuellement être soumis à un traitement clarifiant préalable.

La conservation d'un sérum décanté est d'au moins 4 jours à + 4 °C. Il faudra bien entendu contrôler l'absence de cryoglobuline si le prélèvement est réfrigéré avant l'analyse. Pour des délais de conservation plus importants, une congélation à - 20 °C est recommandée, et ceci dans d'excellentes conditions jusqu'à 3 mois. Il faut éviter les cycles de congélation et de décongélation. Il est bon de prévoir un aliquotage préalable.

II.2 - Justesse

La définition de la justesse (ou exactitude) d'un dosage immunochimique des protéines plasmatiques est particulièrement difficile. En effet, il n'existe pas de matériau de référence dont la composition soit suffisamment documentée pour servir de référence à des substances aussi complexes que les protéines. Aussi, la justesse d'une méthode est habituellement exprimée en terme de différence relative par rapport à un échantillon de référence renfermant une quantité d'antigène définie arbitrairement. Cette question sera discutée quand nous aborderons les aspects relatifs au Contrôle de Qualité.

La spécificité de l'immunsérum intervient également de manière très importante dans la reconnaissance des différents épitopes de l'antigène. Ces facteurs de variabilité prennent une dimension toute particulière quand il s'agit de doser les immunoglobulines sériques. Ces molécules présentent une grande diversité qui se situe à trois niveaux : l'isotypie (classes et sous-classes d'immunoglobulines), l'allotypie, l'idiotypie propre à chaque immunoglobuline (plusieurs millions de déterminants antigéniques). De plus, l'existence de monomères, de polymères ou de fragments d'immunoglobulines peuvent conduire à un comportement différent de ces entités moléculaires dans les diverses méthodes immunochimiques de dosage, telles que les méthodes en milieu gélifié ou les méthodes en milieu liquide.

Dans le cas d'**hypergammaglobulinémies polyclonales**, le spectre de déterminants antigéniques est généralement comparable à celui d'un sérum normal, les variations relatives portant essentiellement sur les sous-classes d'IgG. Les immunsérums commerciaux ne sont habituellement pas sensibles à ces variations de sous-classes. Dans les techniques d'immunoprécipitation en milieu gélifié, les résultats de dosage des immunoglobulines peuvent être sous-estimés ou, au contraire, sur-estimés. Une sous-estimation des valeurs peut être observée en présence de polymères d'immunoglobulines et/ou d'immun-complexes d'IgM et d'IgG, tels que les facteurs rhumatoïdes. Ce phénomène est lié à une diffusion malaisée de ces molécules. Inversement, une sur-estimation des valeurs peut être observée en présence d'IgM 7S (masse moléculaire de 900 kDa). Ces IgM 7S, associées aux IgM 19S pentamériques, peuvent être présentes dans certaines maladies auto-immunes. L'existence de plusieurs espèces moléculaires (polymères, fragments d'immunoglobulines,

facteur rhumatoïde) peut se traduire par des aspects en double anneau de diffusion (image en cocarde) en immunodiffusion radiale. Dans les techniques d'immunoprécipitation en milieu liquide, les résultats de dosage des immunoglobulines peuvent être sur-estimés en présence d'immunocomplexes ou d'augmentation importante des IgM polyclonales. Ce phénomène est lié à des précipitations non spécifiques, dues aux polymères non ioniques renfermés dans les différents tampons réactionnels.

Le dosage d'une **immunoglobuline monoclonale** est important pour le diagnostic et le suivi de pathologies tumorales touchant les lymphocytes B. Dans le myélome, l'immunoglobuline monoclonale représente un véritable marqueur tumoral dont la concentration est un témoin de l'évolution du processus malin et de l'efficacité de son traitement. Malheureusement, les méthodes immunochimiques posent d'importants problèmes de justesse si on veut quantifier un composant monoclonal. Cela se traduit par des résultats très discordants d'une technique à une autre. Par ailleurs, pour une technique donnée, une variabilité est également observée lors des changements de lots d'immunsérum. Ces difficultés sont liées à la nature même du composant monoclonal qui constitue une population homogène, puisque constituée d'une immunoglobuline unique. En pratique, les résultats obtenus sont surestimés et le risque de passer dans la zone d'excès d'antigène est beaucoup plus grand que pour le dosage d'immunoglobulines polyclonales (*figure 3*). Il est donc essentiel de disposer de techniques permettant de détecter efficacement un excès d'antigène ; en cas d'excès d'antigène, l'addition supplémentaire d'anticorps entraînera un rebond du signal, alors que l'ajout d'une certaine quantité de sérum du patient ne produira pas de nouvelle précipitation. Tous ces éléments expliquent pourquoi **il faut systématiquement réaliser une électrophorèse des protéines sériques parallèlement au dosage des immunoglobulines. Par ailleurs, la méthode la plus exacte de dosage d'une immunoglobuline monoclonale est représentée par la densitométrie du pic observé à l'électrophorèse**. En effet, la liaison des colorants aux immunoglobulines est très comparable pour un composant monoclonal ou polyclonal. Cette méthode n'est

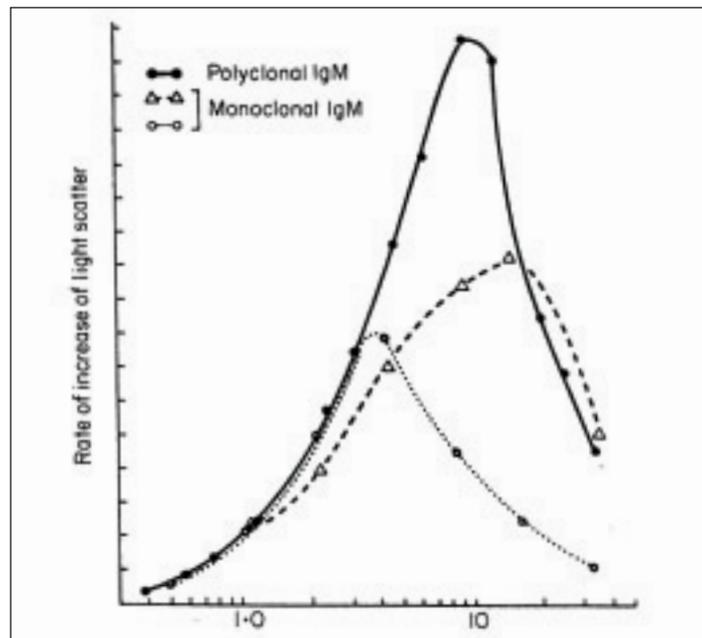


Figure 3

bien sûr utilisable que lorsque le pic monoclonal est suffisamment important et bien individualisé à l'électrophorèse, ce qui correspond aux cas où le dosage est nécessaire.

II.3 - Précision

La précision des méthodes d'immunoprécipitation en gel d'immunodiffusion radiale ou d'électroimmunodiffusion souffre du caractère manuel de leur réalisation. En pratique courante, le coefficient de variation (CV) intersérie est de 8 à 10 % pour l'immunodiffusion radiale ; il est un peu meilleur, de l'ordre de 5 %, pour l'électroimmunodiffusion, probablement du fait d'une plus grande facilité de lecture de hauteur d'un précipité que de diamètre de diffusion. Grâce à l'automatisation, les méthodes immunonéphélométriques et immunoturbidimétriques ont des CV inférieurs à 5 %.

II.4 - Limite de détection

La limite de détection dépend beaucoup du titre et de l'avidité des anticorps constituant l'immunsérum. Généralement, les techniques d'immunoprécipitation en milieu gélifié ou liquide permettent de détecter environ 1 mg/L d'immunoglobulines dans un échantillon de sérum, ce qui est parfaitement adapté aux variations physiopathologiques de ces protéines. Il n'est donc pas nécessaire d'augmenter la sensibilité de ces techniques par l'utilisation de latex, comme pratiqué dans certaines applications de l'immunonéphélométrie. La sensibilité de l'immunoprécipitation en milieu liquide est très dépendante du bruit de fond qui est lié à la turbidité de l'échantillon ou à la présence de complexes immuns. Ce bruit de fond est amplifié par la présence de PEG dans le milieu réactionnel. La limite de détection de l'immunonéphélométrie est légèrement plus faible que celle de l'immunoturbidimétrie.

II.5 - Qualité des immunsérums

Les immunsérums utilisés pour doser les immunoglobulines doivent être polyclonaux pour permettre la reconnaissance de l'extrême diversité des épitopes présents à leur surface [6]. Il faut rappeler que les anticorps monoclonaux sont peu ou faiblement précipitants.

Les critères requis pour les immunsérums employés en immunodiffusion radiale ou électroimmunodiffusion sont moins sévères. Du fait de la longueur des temps d'incubation, le titre et l'avidité de ces immunsérums peuvent être relativement faibles. Un manque de spécificité se traduira par l'obtention de plusieurs anneaux ou pics de précipitation, facilement identifiables. Il a été proposé d'utiliser un mélange d'immunsérum spécifique d'IgG et d'immunsérum spécifique d'IgA pour doser simultanément les IgG et les IgA. Néanmoins, il est préférable d'utiliser des immunsérums à titre élevé, de forte avidité et spécifiques d'une seule classe d'immunoglobulines pour améliorer les résultats.

En immunoprécipitation en milieu liquide, les immunsérums doivent posséder un titre et une avidité élevés pour permettre la réalisation de dosages en cinétique, ou avec des temps d'incubation courts. L'utilisation « exclusive » d'immunsérums spécifiques de déterminants antigéniques portés par les immunoglobulines est une nécessité absolue, car la formation de complexes immuns faisant intervenir des anticorps dirigés contre un antigène différent des immunoglobulines à doser sera prise en compte dans la mesure du signal final.

II.6 - Interférences et causes d'erreurs liées à la présence d'une immunoglobuline monoclonale

En dehors des problèmes de justesse et d'excès d'antigène mentionnés plus haut pour les méthodes immunochimiques, une immunoglobuline monoclonale présente en quantité importante peut entraîner des causes d'erreur dans le dosage des immunoglobulines polyclonales rémanentes [7]. Ce phénomène se manifeste surtout en milieu liquide. Il est très variable d'un analyseur à un autre. Il est lié à la précipitation non spécifique de l'immunoglobuline monoclonale, facilitée par les polymères présents dans le milieu réactionnel. En général, les valeurs des immunoglobulines polyclonales sont surestimées, mais elles peuvent parfois être sous-estimées du fait de la génération d'un trouble initial non spécifique trop important masquant par la suite la réaction d'immunoprécipitation spécifique. Souvent, une mauvaise reproductibilité des résultats due à une instabilité de la cinétique réactionnelle est notée. Ce type d'erreur est surtout rencontré avec les IgM en forte concentration et polymérisées. Là encore, la réalisation d'une électrophorèse permet au biologiste de vérifier l'absence de résultats incohérents.

L'interférence de l'immunoglobuline monoclonale ne s'observe pas uniquement sur le dosage immunochimique des immunoglobulines polyclonales. Une immunoglobuline monoclonale peut être responsable d'interférences dans des dosages réalisés au cours de situations cliniques non évocatrices a priori d'une dysglobulinémie monoclonale. Ces interférences ont été décrites pour le dosage immunonéphélométrique et/ou turbidimétrique de l'haptoglobine [7], de la transferrine [8], du C4 [9] et de la CRP [10]. Ce dernier type d'interférence est celui qui a été le plus étudié. Il s'observait surtout avec la méthode N-latex CRP (Dade Behring) en présence d'IgM monoclonales, essentiellement à chaîne légère kappa. Depuis 1996, la Société Dade Behring a amélioré le réactif N-latex CRP, en fixant sur le latex un anticorps monoclonal de souris à la place d'un anticorps polyclonal de lapin anti-CRP, et en enlevant les accélérateurs dans le milieu réactionnel. Cette modification semble avoir supprimé ces réactions non spécifiques lors du dosage de la CRP, mais il faut néanmoins rester vigilant. Les IgM monoclonales présentant une activité facteur rhumatoïde sont souvent responsables d'augmentation artificielle des résultats de protéines sériques dosées par immunoprécipitation en milieu liquide [11].

Il faut bien entendu rappeler que les immunoglobulines monoclonales peuvent donner lieu à des interférences dans certaines méthodes biochimiques, en particulier lors du dosage de phosphore inorganique ou du fer sérique par méthode directe.

■ III. CONTRÔLE DE QUALITÉ ET STANDARDISATION DU DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES SÉRIQUES

III.1 - Préparations de référence internationales pour les immunoglobulines sériques

Il existe un seul matériau de référence primaire pour les immunoglobulines, le « WHO International reference preparation for serum immunoglobulins IgG, IgA and IgM (67/86) » (*tableau II*), préparé par Rowe et al. en 1967 [12]. Il fut attribué arbitrairement une activité

Tableau II : Les préparations de référence internationales pour les immunoglobulines sériques

		IgG	IgA	IgM
Matériau de référence primaire				
WHO Immunoglobulin Standard	(67/86)			
	Unités/Ampoule	100	100	100
	Unités/mL	94,4	94,4	94,4
	Masse, mg/unité	80,4	14,2	8,47
Matériaux de référence secondaire				
67/95	Unités/ampoule	101	101	102
	Unités/mL	95,3	95,3	96,2
67/97	Unités/ampoule	102	101	102
	Unités/mL	96,2	95,6	96,2
67/99	Unités/ampoule	102	102	102
	Unités/mL	96,2	96,2	96,2
WHO 6HSP	Unités/mL	114,2	114,2	141,6
US National	Unités/mL	130,3	131,2	161,4
Reference préparation	Masse, mg/unité	86,6	16,4	8,67

Tableau III : Valeurs certifiées pour les immunoglobulines dans la préparation CRM 470

Immunoglobuline	g/L	Imprécision CV %
IgG	9,68	1,58
IgA	1,96	2,78
IgM	0,797	4,89

de 100 unités par ampoule à chacune des trois classes d'immunoglobulines renfermées dans cette préparation qui se présente sous forme lyophilisée. Toutes les autres préparations internationales sont des matériaux de référence secondaires (*tableau III*), telles que les préparations lyophilisées 67/95, 67/97, 67/98, 67/99 préparées postérieurement, à partir du reste du pool ayant servi à fabriquer le matériau primaire (67/86). Le « first WHO International standard for six human serum proteins (WHO 6 HSP) » et le « first United States National Reference Preparation (USNRP lot 12-0575C) » sont tous les deux préparés à partir d'un même pool de sérum, mais renfermant respectivement 1,3 mL et 1,5 mL de sérum lyophilisé. Leur contenu en unités (par pesée) ou en concentration massique (par méthode immunochimique par rapport à des protéines purifiées) a été déterminé par rapport à la préparation primaire 67/86.

III.2 - Premières expériences de Contrôle de Qualité International pour les immunoglobulines

Une expérience de Contrôle de Qualité Externe, organisée dans cinq pays européens (Autriche, France, Hongrie, Italie et Royaume Uni), a montré une grande divergence entre

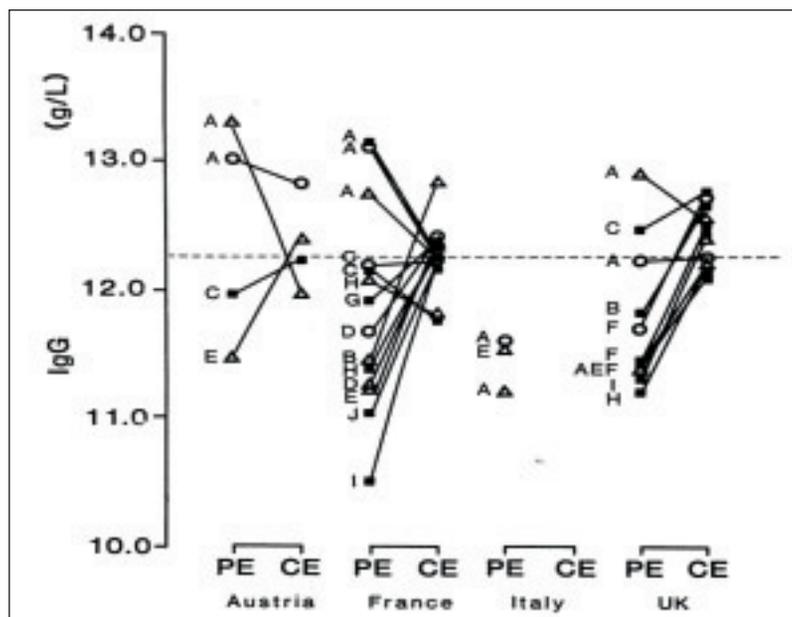


Figure 4

techniques dans les résultats pour les immunoglobulines dosées dans deux sérums différents [13]. Cette grande variabilité entre les techniques diminuait considérablement lorsqu'il était demandé aux différents participants d'utiliser un étalon commun, comme illustré par l'exemple des IgG (figure 4). Ainsi, une grande partie du défaut de justesse des différentes techniques apparaît surtout lié à la variabilité des standards fournis par les fabricants. Ces mauvais résultats semblent paradoxaux puisque, comme nous l'avons mentionné précédemment, des préparations de référence internationales pour les immunoglobulines sont disponibles et, qu'en théorie, les fabricants étalonnent leurs standards commerciaux par rapport à celles-ci. En réalité, cette situation peu satisfaisante a plusieurs explications :

- Certains de ces standards internationaux sont de préparation ancienne, avec souvent plus de 30 ans d'existence.
- Ces préparations lyophilisées sont troubles après reconstitution, ce qui les rend inadaptées aux techniques actuellement les plus utilisées, telles que l'immunonéphélométrie et l'immunoturbidimétrie.
- Différents lots ont été préparés à partir d'un même pool, ce qui peut expliquer une certaine dérive des résultats, en fonction des procédés de préparation et des méthodes d'étalonnage.
- Les protocoles de transfert des valeurs des préparations de référence aux calibrants commerciaux ne sont pas standardisés.
- La communauté scientifique internationale n'a pas clairement précisé le ou les préparations de référence qui devaient être utilisées.
- Enfin, il est souvent difficile de se procurer les standards internationaux du fait de leur rareté.

Tous ces différents éléments ont conduit « l'International Federation of Clinical Chemistry » (IFCC), par l'intermédiaire de son « Committee for plasma protein standardization », à initier un travail coopératif visant à préparer un nouveau matériau de référence : le CRM 470.

III.3 - Le matériau de référence CRM 470

Le CRM 470 est un matériau de référence secondaire certifié pour les 14 protéines les plus couramment dosées, dont les trois immunoglobulines IgG, IgA et IgM [14]. Ce projet financé par le Bureau Communautaire de Référence (BCR) de Bruxelles a permis de préparer, à partir de 364 donateurs de sang, 40 000 ampoules de 1 mL sous forme lyophilisée. La collecte des échantillons de sérum, effectuée dans cinq centres européens, a été réalisée dans des conditions permettant de maintenir les protéines dans l'état le plus natif possible en évitant, en particulier, l'activation des protéases. La préparation finale est stabilisée à l'aide de benzamidine à 1 mmol/L, d'aprotinine et d'azide de sodium à 15 mmol/L. L'absence d'immunoglobuline monoclonale, de facteur rhumatoïde, a été vérifiée chez chaque donneur. Les échantillons d'aspect turbide, ictérique ou hémolysé, ont été éliminés. Les sérums devaient être négatifs pour la détection de l'antigène HBs, des anticorps anti-HIV 1 + 2, HTLV1 et VHC.

Le CRM 470 a été certifié par le Bureau Communautaire de Référence en 1993. Il est disponible auprès de cet organisme qui en assure la distribution. Le CRM 470 a été également approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) et le College of American Pathologists qui assure la diffusion aux Etats-Unis de la préparation sous le nom de RPPHS 5. Toutes les conditions semblent donc réunies pour une large acceptation de cette préparation de référence secondaire à matrice sérique en Europe, aux Etats-Unis, mais aussi en Asie, puisque le Japon vient de l'adopter. Le CRM 470 est destiné à la détermination des valeurs cibles pour les matériaux tertiaires (étalons et contrôles des fabricants industriels), et non à une utilisation directe au niveau des laboratoires de biologie clinique. Le protocole de transfert des valeurs d'une préparation de référence à une préparation secondaire ou tertiaire, qui vient d'être publié [15], doit permettre d'améliorer l'homogénéité des étalons entre fabricants. Les valeurs certifiées pour les immunoglobulines dans le CRM 470 sont présentées dans le tableau III.

III.4 - Améliorations apportées par le CRM 470 dans la standardisation du dosage des immunoglobulines

L'apport du CRM 470 dans la standardisation du dosage immunochimique des immunoglobulines (et des 11 autres protéines pour lesquelles il est également certifié) a pu être évalué dans le cadre du Contrôle de Qualité National des protéines, organisé en mai 1995. En effet, lors de ce contrôle (c'est-à-dire deux ans après la certification du CRM 470), environ 60 % des 1 870 laboratoires français participants avaient adopté la nouvelle standardisation par rapport au CRM 470. Une opportunité unique était offerte de pouvoir comparer, avant l'adoption généralisée de cette standardisation, les performances des méthodes standardisées par rapport aux méthodes non standardisées, en terme de précision et de justesse, le nombre d'utilisateurs de méthodes non standardisées étant encore suffisant pour avoir une étude statistique correcte [16].

Le *tableau IV* montre l'amélioration considérable apportée en terme de précision sur le dosage des trois classes d'immunoglobulines. Pour les IgG et les IgA, les CV tronqués intertechniques, de l'ordre de 10 à 11 % avant standardisation, s'abaissent à 7,5 % environ après standardisation. La diminution est beaucoup plus marquée encore pour les IgM dont le CV passe de 20,8 % à 11,7 % ! En ce qui concerne la justesse, la dispersion

Tableau IV : Comparaison de la précision et de la justesse des méthodes standardisées et non standardisées appliquées au dosage des immunoglobulines
(n = nombre d'utilisateurs, CVtr = Coefficient de variation tronqué)

		Méthodes standardisées	Méthodes non standardisées
IgG	n	856	673
	CVtr %	7,78	11,36
	Moyenne g/L	10,12	10,64
	Valeurs extrêmes g/L	9,50-12,48	9,04-12,65
IgA	n	848	691
	CVtr %	7,34	10,49
	Moyenne g/L	2,19	2,37
	Valeurs extrêmes g/L	2,03-2,54	2,19-2,70
IgM	n	841	708
	CVtr %	11,7	20,8
	Moyenne g/L	0,79	0,97
	Valeurs extrêmes g/L	0,67-1,01	0,72-1,33

des résultats est moindre pour les IgG et surtout les IgM après standardisation. Il est intéressant de souligner que les deux techniques immunonéphélométriques les plus utilisées, BNA de Behring et Array-ICS de Beckman, donnent des résultats très voisins, après calibration des étalons respectifs des deux fabricants par rapport au CRM 470. Les écarts entre les résultats fournis par les deux fabricants qui étaient de 16,3 % pour les IgG, 13,5 % pour les IgA et 47 % pour les IgM avant standardisation se réduisent respectivement à 4,5 %, 0,4 % et 6,4 % après standardisation. Des données identiques ont été obtenues aux Etats-Unis par le College of American Pathologists, en comparant les résultats d'immunoglobulines mesurées par les techniques Behring et Beckman lors d'une expérience de Contrôle de Qualité [17].

Il faut cependant insister sur le fait que l'étalon ne représente qu'un seul élément (bien que fondamental) dans la standardisation d'une technique immunochimique comme l'immunoprécipitation en milieu liquide, en particulier. En effet, la spécificité de l'immunsérum, la composition du milieu réactionnel (présence d'accélérateurs de précipitation), les différences de matrice entre échantillons et étalon du fabricant, ainsi que le mode de lecture (cinétique ou temps fixé, angle de lecture) représentent autant de facteurs susceptibles d'expliquer des divergences entre résultats. Dans ce contexte, il reste encore des progrès à faire dans la standardisation des immunoglobulines, et plus spécialement des IgM, en matière de précision (CV intertechniques encore supérieurs à 10 % après standardisation par le CRM 470) et de justesse.

■ IV. VALEURS DE RÉFÉRENCE DES IMMUNOGLOBULINES

Les changements apportés par le CRM 470 dans la standardisation du dosage des immunoglobulines amène tout naturellement à rediscuter les valeurs de référence des

immunoglobulines. En effet, les valeurs des étalons des fabricants étant modifiées après calibration par rapport au CRM 470, la précision et la justesse des méthodes étant également améliorées, il apparaît aujourd'hui possible d'aborder la définition précise des valeurs de référence en fonction de l'âge, du sexe et de l'origine ethnique/géographique d'un sujet sain. C'est cette tâche que s'est fixée le « Committee for Plasma Protein Standardization » de l'IFCC. Ce projet ambitieux nécessitera de nombreuses années avant d'être achevé. Aussi, plusieurs sociétés savantes et compagnies industrielles ont décidé d'utiliser, pour l'adulte, des valeurs de référence intérim et de consensus, définies à partir de différentes études réalisées dans le monde [18]. Ces valeurs sont aujourd'hui employées par la très grande majorité des compagnies industrielles, indépendamment du système ou de l'instrument utilisé, et figurent dans leur notice technique.

Les nouvelles valeurs de référence, chez l'adulte, proposées pour les immunoglobulines sont présentées dans le *tableau V*. Des différences significatives avec les valeurs utilisées jusqu'alors sont à noter pour les IgM, et à un degré moindre pour les IgA.

A la naissance, le nouveau-né synthétise une faible quantité d'anticorps. Les IgG dosées dans son sérum sont les IgG d'origine maternelle (environ 7 à 16 g/L), seule classe d'immunoglobulines capables de traverser la barrière placentaire. La concentration des IgG diminue rapidement chez le nourrisson (demi-vie = 21 jours), pour atteindre un minimum de 2,5 à 5 g/L à 3 mois. A cet âge, la synthèse des IgM est plus rapide que celle des IgA, avec des concentrations respectives de 0,15 à 1 g/L pour les IgM et de 0,01 à 0,45 g/L pour les IgA. A 1 an, les concentrations circulantes d'IgG sont de l'ordre de 5 à 9 g/L, celles des IgA étant comprises entre 0,15 et 1,10 g/L et celles des IgM entre 0,4 et 2 g/L. Les valeurs de l'adulte sont obtenues à 9 mois environ pour les IgM, 6 ans pour les IgG et 14 ans pour les IgA.

Les niveaux sériques d'IgG, d'IgA et d'IgM et leur augmentation jusqu'aux valeurs de l'adulte dépendent des différentes stimulations antigéniques et de facteurs génétiques. L'augmentation des concentrations des immunoglobulines chez l'enfant n'est pas linéaire. Des pics sont observés, en particulier, entre 1 et 2 ans, puis entre 6 et 10 ans, témoins de ces périodes de stimulations antigéniques. Sous les tropiques, les moyennes d'IgG et d'IgM sont environ deux fois plus élevées que chez les habitants des zones tempérées. Cette différence est attribuée à la fréquence élevée d'infections sous les tropiques. Les IgA sont moins soumises à ce type de variations car leur synthèse est essentiellement réalisée dans le tractus gastro-intestinal où la stimulation par les antigènes bactériens est toujours présente.

Tableau V : Valeurs de référence intérim des immunoglobulines sériques établies sur la base de l'utilisation du CRM 470 (valeurs utilisables pour des adultes et des adolescents de race caucasienne)

Immunoglobuline	Valeurs de référence (g/L)
IgG	7 - 16
IgA	0,7 - 4,0
IgM	0,4 - 2,3

■ V. VARIATIONS PATHOLOGIQUES DES CONCENTRATIONS D'IMMUNOGLOBULINES

V.1 - Hypogammaglobulinémies

Les hypogammaglobulinémies sont soit primitives, soit secondaires à une autre pathologie.

V.1.1 - Déficits primitifs

- Déficits de toutes les classes d'immunoglobulines
- Agammaglobulinémie liée à l'X ou maladie de BRUTON.

Le sérum ne renferme aucune des cinq classes d'immunoglobulines du fait de l'absence de lymphocytes B dans le tissu lymphoïde et le sang circulant. Le déficit est lié à différentes mutations du gène XLA qui code pour une protéine kinase (Btk).

- Hypogammaglobulinémie transitoire de l'enfant.

Ce déficit correspond à une exagération anormale de l'hypogammaglobulinémie physiologique du nourrisson du fait d'un retard de synthèse des immunoglobulines.

- Hypogammaglobulinémie commune d'expression variable.

Non liée au sexe, elle se déclare en général entre 20 et 30 ans par des infections à germes pyogènes. Les trois classes d'immunoglobulines sont abaissées dans le sérum (IgG < 5 g/L, IgA et IgM < 0,5 g/L). Les lymphocytes B sont présents en nombre variable, avec des déficits fonctionnels soit intrinsèques, soit liés à une anomalie des lymphocytes T.

- Hypogammaglobulinémies liées à une anomalie des lymphocytes T ou à un déficit immunitaire combiné.

Du fait d'une anomalie de la coopération cellulaire B et T, la production des immunoglobulines est touchée. Si les concentrations des immunoglobulines sont subnormales dans le syndrome de Di George, une hypogammaglobulinémie globale est observée dans les déficits immunitaires combinés sévères, tels que les déficits enzymatiques en adénosine désaminase ou en purine nucléoside phosphorylase.

- Déficits sélectifs d'une classe ou sous-classe d'immunoglobulines
- Déficit sélectif en IgA.

C'est le plus fréquent des déficits immunitaires chez les Caucasiens, avec une fréquence de 1 sur 1 000 environ. Souvent asymptomatique, ce déficit se traduit par une concentration circulante d'IgA inférieure à 0,05 g/L, contrastant avec une fréquente augmentation des IgM et des IgG liée aux infections récidivantes. Ce déficit peut être associé à un déficit en sous-classes IgG2 et IgG4.

- Déficits en sous-classes d'IgG.

Les plus typiques sont le déficit en IgG3 et le déficit en IgG2 et IgG4 (souvent associé au déficit sélectif en IgA).

- Hypogammaglobulinémie IgG et IgA avec hyper IgM.

Dans ce syndrome dit « hyper IgM », les patients synthétisent des quantités élevées d'IgM polyclonales souvent à activité autoanticorps, mais sont dépourvus d'IgG et d'IgA. La

forme liée à l'X de ce syndrome est due à une mutation du CD40 ligand (ou CD154) qui est indispensable à la commutation isotypique des immunoglobulines, ce qui explique le blocage de la synthèse au stade IgM.

V.1.2- Déficits secondaires ou acquis

Ce sont de loin les plus fréquents. Des hypogammaglobulinémies sont observées dans les pathologies suivantes :

- Cancers, leucémie lymphoïde chronique, myélome multiple comme déjà évoqué à plusieurs reprises dans cet ouvrage.
- Carence protéique et dénutrition grave : Kwashiorkor.
- Pertes excessives d'immunoglobulines : syndrome néphrotique (déficit plus marqué sur les IgG), entéropathies exsudatives, brûlures cutanées étendues.
- Certaines maladies virales (CMV, EBV, rougeole...).
- Stress et dépression.
- Causes iatrogènes : radiothérapie, chimiothérapie, immunosuppresseurs et corticoïdes, antiépileptiques (déficit acquis en IgA)...

V.2 - Hypergammaglobulinémies

V.2.1 - Hypergammaglobulinémies polyclonales

Elles s'observent essentiellement au cours des maladies infectieuses et inflammatoires. Lors des infections, la réponse humorale varie en fonction du stade évolutif, de la nature du germe et de ses antigènes, en particulier selon leur caractère thymo-dépendant ou thymo-indépendant. Les IgM sont les premières immunoglobulines à être synthétisées au cours d'une infection bactérienne primaire. Suit la synthèse des IgG. En période d'état, une hypersynthèse des trois classes d'immunoglobulines est généralement observée. L'augmentation rapide des IgG est une caractéristique des réponses secondaires.

Certaines pathologies s'accompagnent d'une augmentation polyclonale prédominante d'une seule classe d'immunoglobulines. Ainsi, l'augmentation polyclonale des IgG est de règle dans le lupus systémique, le syndrome de Gougerot-Sjögren, la polyarthrite rhumatoïde (souvent associée à une augmentation des IgA), la sarcoïdose, certaines infections parasitaires telles que la leishmaniose, le paludisme ou la filariose. L'augmentation polyclonale des IgA est classiquement observée dans les atteintes hépatiques (cirrhose éthylique, cholestase), dans les maladies touchant les muqueuses digestives (maladie de Crohn) ou respiratoires (tuberculose pulmonaire, bronchopneumopathies chroniques, certains cancers ORL) et dans les spondylarthropathies. Enfin, l'augmentation polyclonale des IgM est une caractéristique de la cirrhose biliaire primitive, de certaines infections parasitaires (trypanosomiase, toxoplasmose congénitale), et lorsqu'il existe un blocage de la commutation isotypique IgM/IgG (syndrome hyper IgM déjà mentionné).

V.2.2 - Hypergammaglobulinémies monoclonales

Ces aspects ont été largement développés précédemment lorsqu'ont été évoqués les différents syndromes immunoprolifératifs tels que le myélome multiple, la macroglobulinémie

de Waldenström, la maladie des chaînes lourdes ou la leucémie lymphoïde chronique, sans oublier les gammopathies monoclonales de signification indéterminée.

■ VI. CONCLUSION

Le dosage des immunoglobulines sériques représente une demande d'analyses fréquente au laboratoire de biologie clinique, car cet examen constitue un test d'exploration de base de l'immunité humorale et de ses anomalies quantitatives. Ce dosage doit être réalisé dans des conditions analytiques parfaitement validées car, comme nous l'avons évoqué, il peut être soumis à des pièges liés à un phénomène d'excès d'antigène ou à des interférences. Ces aspects sont importants à souligner dans une période où la « consolidation » des laboratoires conduit de plus en plus à la réalisation du dosage des immunoglobulines sur des analyseurs polyvalents, dans des laboratoires de biochimie où la connaissance des problèmes analytiques ou physiopathologiques relatifs aux immunoglobulines n'est pas toujours parfaite. En effet, il faut pouvoir disposer à proximité d'une véritable « paillasse protéines » où pourront être réalisés l'électrophorèse des protéines ou des examens complémentaires, permettant de confirmer les anomalies quantitatives et/ou de détecter des modifications qualitatives qui ne peuvent être révélées par le seul dosage immunochimique des immunoglobulines. C'est pour cela qu'il serait important d'obtenir une révision des actes de nomenclatures de biologie médicale, prévoyant la réalisation systématique d'une électrophorèse des protéines sériques en cas de demande de dosage des immunoglobulines. L'organisation régulière d'un Contrôle de Qualité apparaît aussi fondamentale pour améliorer le rendu des résultats. Il est regrettable que, dans le cadre du Contrôle de Qualité National, l'envoi de sérums de contrôle pour les immunoglobulines soit si peu fréquent. L'expérience réalisée très récemment en décembre 2002, faisant partie d'une étude internationale, va permettre d'apprécier les effets de la standardisation par le CRM 470 sur le dosage des immunoglobulines. L'envoi de sérums de contrôle contenant des immunoglobulines monoclonales est également souhaité pour comparer le comportement des différentes méthodes immunochimiques dans ces situations si particulières.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- HEIDELBERGER M., KENDALL F.E., SOO HOO C.M. Quantitative studies of the precipitin reaction. Antibody production in rabbits injected with azoprotein. *J. Exp. Med.*, 1933 ; 58 :137-152.
- 2- MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F. Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 1965 ; 2 : 235-254.
- 3- LAURELL C.B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.*, 1966 ; 15 : 45-52.

- 4- BIENVENU J., VASSAULT A., DUMONT G. Dosage immunochimique des protéines sériques. *Annales du Contrôle National de Qualité. Agence du Médicament*. Nov. 1996 ; 6 : 15-21.
- 5- WHICHER J.T., BLOW C. Formulation of optimal conditions for an immunonephelometric assay. *Ann. Clin. Biochem.*, 1980 ; 17 : 170-177.
- 6- WHICHER J.T., WARREN C., CHAMBERS R. Immunochemical assays for immunoglobulins. *Ann. Clin. Biochem.*, 1984 ; 21 : 78-91.
- 7- PONTET F., LATER R., MANCEAUX J.C., PRESSAC M., BOIGNE J.M. Dosages sériques d'IgG, IgA, IgM, transferrine et haptoglobine. III - Résultats obtenus en présence d'immunoglobulines monoclonales. *Ann. Biol. Clin.*, 1995 ; 53 : 283-291.
- 8- BONIOL C., TOURNILHAC O., KUDER P., GUYON M., DASTUGUE B., MOTTA C., SAPIN V. Perturbation de la détermination immunoturbidimétrique de la transferrine due à la présence d'une IgM monoclonale. *Ann. Biol. Clin.*, 2002 ; 60 : 481-484.
- 9- PARENT X. Dosage de la fraction C4 du complément sur Array 360 : attention aux IgM monoclonales ! *Ann. Biol. Clin.*, 1998 ; 56 : 209-210.
- 10- LAMMERS M. Interference with nephelometric assay of C-Reactive protein by monoclonal immunoglobulin. *Clin. Chem.*, 1998 ; 44 : 1584-1585.
- 11- TSUDA H., TAKATA T., NAGAFUCHI S., ETOH F., KURIHARA M., HATTORI S., MORI M., OKOCHI K. Falsely increased nephelometric results caused by a monoclonal rheumatoid factor. *Clin. Chem.*, 1990 ; 36 : 1263-1264.
- 12- ROWE D.S., GRAB B., ANDERSON S.G. An international reference preparation for human serum immunoglobulins G, A and M : content of immunoglobulins by weight. *Bull. World Health Org.*, 1972 ; 46 : 67-79.
- 13- BULLOCK D.G., DUMONT G., VASSAULT A., AGUZZI F., CHAMBERS R.E., MILFORD WARD A., WHICHER J.T., BIENVENU J. Immunochemical assays of serum proteins : a european external quality assessment survey and the effects of calibration procedures on interlaboratory agreement. *Clin. Chim. Acta.*, 1990 ; 187 : 21-36.
- 14- BIENVENU J., LATER R., PONTET F. Le matériau de référence (CRM 470) pour les protéines sériques : préparation, caractéristiques et conditions d'utilisation. *Ann. Biol. Clin.*, 1995 ; 53 : 499-505.
- 15- BLIRUP-JENSEN S., MYRON JOHNSON A., LARSEN M. Protein standardization IV : value transfer procedure for the assignment of serum protein values from a reference preparation to a target material. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2001 ; 39 : 1110-1122.
- 16- BIENVENU J., DOCHE C., LATER R., MANCEAUX J.C., PONTET F., PRESSAC M., VASSAULT A., DUMONT G. Améliorations apportées par le matériau de référence CRM 470 dans la standardisation du dosage des protéines sériques. *Ann. Biol. Clin.*, 1997 ; 55 : 37-40.

- 17- LEDUE T.B., MYRON JOHNSON A., COHEN L.A., RITCHIE R.F. Evaluation of proficiency survey results for serum immunoglobulins following the introduction of a new international reference material for human serum proteins. Clin. Chem., 1998 ; 44 : 878-879.
- 18- DATI F., SCHUMANN G., THOMAS L., AGUZZI F, BAUDNER S., BIENVENU J., BLAABJERG O., BLIRUP-JENSEN S., CARLSTRÖM A., HYLTOFT-PETERSEN P., MYRON JOHNSON A., MILFORD-WARD A., RITCHIE R.F., SVENDSEN P.J., WHICHER J. Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP reference material (CRM 470). Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1996 ; 34 :517-520.



CRYOGLOBULINES : MÉTHODE DE DÉTECTION ET INTERPRÉTATION

L. INTRATOR, B.N. PHAM

I. INTRODUCTION

Les cryoglobulines sont des immunoglobulines sériques qui précipitent à une température inférieure à + 37 °C et qui se re-solubilisent à chaud. L'analyse immunochimique des cryoglobulines a permis d'en caractériser les différents constituants et de définir trois types de cryoglobulines [1].

- Les cryoglobulines de type I sont composées d'une immunoglobuline monoclonale le plus souvent de classe IgM, moins fréquemment IgG, et exceptionnellement IgA ou protéine de Bence Jones.
- Les cryoglobulines de type II sont composées d'une immunoglobuline monoclonale et d'immunoglobulines polyclonales. L'immunoglobuline monoclonale est, dans la majorité des cas, une IgM ayant une activité anticorps anti-IgG polyclonales, c'est-à-dire une activité facteur rhumatoïde. Plus rarement, l'immunoglobuline monoclonale est une IgG ou IgA anti-IgG polyclonales.
- Les cryoglobulines de type III sont composées de plusieurs classes d'immunoglobulines polyclonales. Le plus souvent, ce sont des IgM et IgG, moins fréquemment des IgM, IgG et IgA. Ces cryoglobulines de type III sont rarement composées uniquement d'IgM polyclonales.

La fréquence relative de chaque type de cryoglobuline diffère selon les auteurs. Elle va de 5 % à 38 % pour les cryoglobulines de type I, de 14 % à 72 % pour les cryoglobulines de type II et de 23 % à 54 % pour les cryoglobulines de type III [1-4]. De tels écarts peuvent s'expliquer par des méthodes d'analyse différentes et/ou des biais de recrutement des patients. La classification immunochimique des cryoglobulines a néanmoins un intérêt clinique certain. Les cryoglobulines de type I et II s'observent au cours des maladies comportant une immunoglobuline monoclonale, notamment myélome et macroglobulinémie de Waldenström. Les cryoglobulines de type II et III sont associées aux maladies infectieuses et inflammatoires, et aux affections auto-immunes.

Deux autres paramètres caractérisent les cryoglobulines : leur concentration ainsi que leur température de précipitation. La concentration des cryoglobulines peut être élevée dans les cryoglobulines de type I, de 1 à 30 g/L et plus. Les cryoglobulines mixtes de type II ont généralement des concentrations comprises entre 0,5 g et 5 g/L. Les cryoglobulines mixtes de type III ont des concentrations beaucoup plus faibles, de l'ordre de 0,01 à 1 g/L [1]. La température de précipitation des cryoglobulines peut quant à elle varier de + 4 °C à + 36 °C. Cela explique que certains examens biologiques puissent être perturbés s'ils ne sont pas réalisés à + 37 °C.

■ II. MISE EN ÉVIDENCE DES CRYOGLOBULINES

Leur recherche exige des précautions particulières de prélèvement et de manipulation.

II.1 - Modalités de prélèvement

Dix millilitres de sang sont prélevés sur tube sec sans gel activateur, chez un patient en jeûne lipidique.

Le prélèvement et le traitement du sang doivent être effectués à une température le plus proche possible de + 37 °C. Si les circonstances le permettent, le prélèvement peut être effectué dans une chambre à + 37 °C où toutes les manipulations sont réalisées. En pratique courante, on préchauffe le tube de prélèvement à + 37 °C. On place le tube immédiatement dans un bain-marie ou une étuve à + 37 °C jusqu'à rétraction du caillot (2 heures au moins, 24 heures au plus). Si le prélèvement n'est pas effectué au laboratoire, le tube de sang sera transporté dans une boîte isotherme ou un thermos contenant de l'eau tiède à + 37 °C.

II.2 - Obtention du sérum

Le prélèvement est centrifugé à + 37 °C, pendant 10 min à 3 000 t/min, dans des plots préchauffés à + 37 °C. Le sérum est décanté immédiatement dans un tube en verre long et étroit (tube de Félix, Société Sevi, ZI La Haie Passart, Brie Comte Robert), pour bien visualiser la présence d'un précipité. Il est nécessaire d'ajouter un agent antiseptique pour conserver le sérum : 1 goutte d'azoture de sodium à 1%. Le tube est bouché et placé dans un réfrigérateur à + 4 °C, pendant au moins 8 jours et même jusqu'à 1 mois. Ce délai permet parfois de mettre en évidence des cryoglobulines en très faible quantité.

II.3 - Résultats : lecture du sérum

La présence d'une cryoglobuline est caractérisée par l'apparition d'un précipité ou d'un gel facilement visible à l'œil nu. Différents aspects sont possibles : petits grains, flocons, mie de pain, cristaux, sédimentant plus ou moins rapidement. Par retournement du tube, le précipité se disperse en « volutes de fumée ». Parfois, le sérum est simplement trouble. Plus rarement, l'aspect est celui d'un gel au fond du tube ou d'un gel occupant tout le volume du sérum (cryogel) (*photo 1*).

Dans la majorité des cas, le précipité ou le gel disparaît après réchauffement du sérum à + 37 °C. Cependant, certaines cryoglobulines nécessitent une température supérieure à + 37 °C pour se re-solubiliser (+ 40 °C-+ 45 °C).

Les cryoglobulines en quantité importante, en particulier celles de type I, apparaissent rapidement, en 48 heures ou moins. Les cryoglobulines peu abondantes de type III peuvent apparaître après 3 semaines de conservation à + 4 °C.

La température de précipitation des cryoglobulines est très variable, de + 10 °C à + 36 °C. Il est rare de devoir la déterminer. Si nécessaire, on la détermine en solubilisant la cryoglobuline à + 37 °C dans un bain-marie et en abaissant la température de l'eau du bain-marie de - 2 °C en - 2 °C, jusqu'à l'apparition d'un trouble, qui redisparaît à + 37 °C.

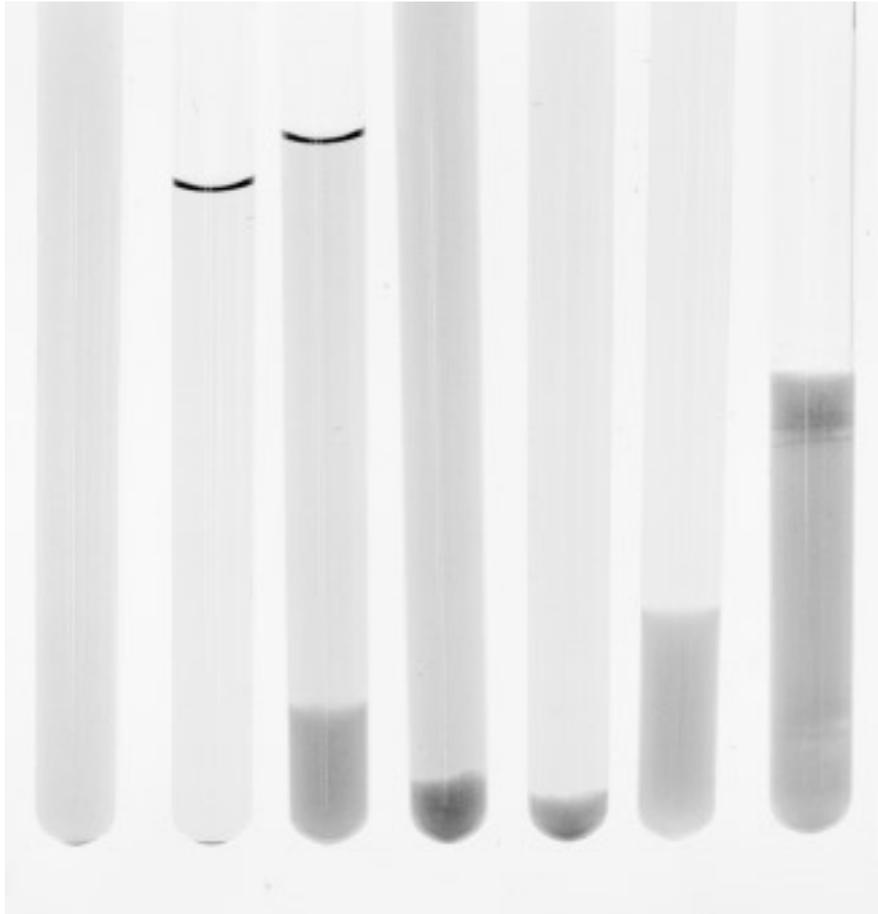


Photo 1 : Différents aspects d'une cryoglobulinémie.

On considère que la recherche de cryoglobulines est négative en l'absence de précipité ou de gel dans le tube conservé à + 4 °C pendant 8 jours, voire 1 mois.

II.4- Causes d'erreurs

La présence de lipides donne un aspect trouble au sérum. Il faut vérifier que le patient était en jeûne lipidique lors du prélèvement (*photo 2*).

Une contamination bactérienne peut se produire pendant la conservation du sérum à + 4 °C, en l'absence d'ajout d'antiseptique. L'aspect est alors celui d'un fin précipité qui ne disparaît pas à + 37 °C.

La présence de fibrinogène est une autre cause d'erreur, le fibrinogène pouvant être pris à tort pour de la cryoglobuline. Le « précipité » ne solubilise pas à + 37 °C. Pour éviter cela, il faut s'assurer que le prélèvement a bien été réalisé dans un tube sans anticoagulant. Par ailleurs, il faut s'assurer que le patient n'est pas sous traitement anticoagulant, la présence d'héparine *in vivo* empêchant une bonne coagulation *in vitro*.

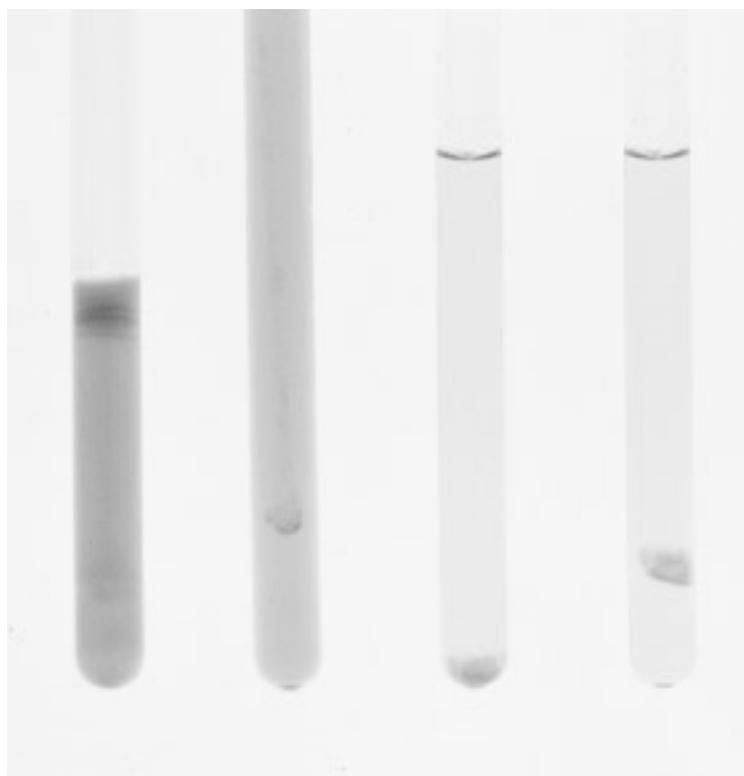


Photo 2 : Aspects ne devant pas être confondus avec la présence de cryoglobuline.

II.5- Difficultés d'interprétation

Certains précipités ne se re-solubilisent pas à + 37 °C mais à une température supérieure (+ 40 °C - + 45 °C), sans que l'on en connaisse la raison.

En cas de résultat négatif et si le contexte clinique est fortement évocateur de présence d'une cryoglobuline, il faut répéter cette recherche à plusieurs jours d'intervalle. En effet, le phénomène de cryoprécipitation peut être intermittent. En l'absence de précipité après huit jours, il faut conserver le sérum à froid, pendant au moins une autre semaine.

■ III. QUANTIFICATION DE LA CRYOGLOBULINE

Il existe plusieurs méthodes de quantification des cryoglobulines.

III.1 - Détermination du cryocrite

On solubilise la cryoglobuline en mettant le sérum à + 37 °C et on remplit un tube à macrohématocrite (westergreen) jusqu'au trait correspondant à 100 %. Le tube est bouché avec un parafilm. On laisse précipiter la cryoglobuline pendant 8 jours à + 4 °C. Le tube est ensuite centrifugé pendant 30 minutes à 3 000 t/min. On mesure le volume occupé par la cryoglobuline dans le sérum en lisant la hauteur du précipité. On exprime le résultat en pourcentage du sérum total (*photo 3*). Dans le cas particulier des cryoglobulines ne se

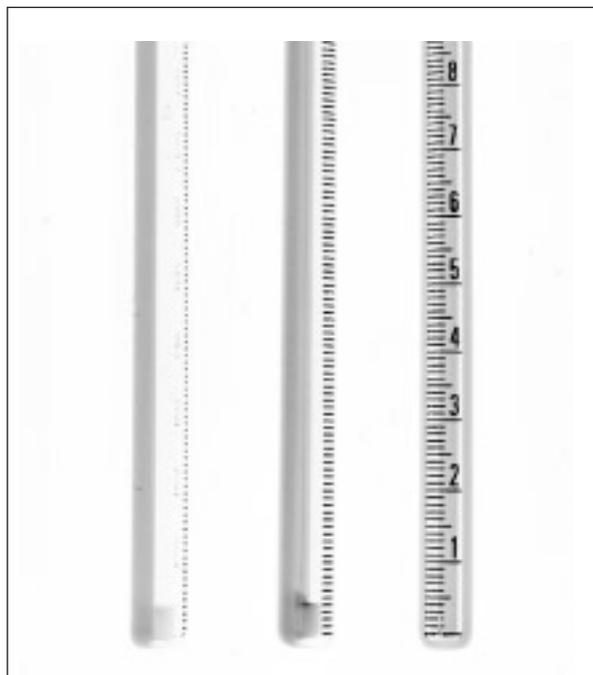


Photo 3 : Quantification d'une cryoglobuline par cryocrite.

re-solubilisant pas à + 37 °C, le patient doit être reprélevé dans de bonnes conditions, et le sérum mis directement dans un tube à macrohématocrite.

Les concentrations peuvent varier de 1 % à 30 % et plus pour les cryoglobulines de type I, de 1 % à 5 % pour les cryoglobulines de type II, et entre 0,5 % et 1 % dans les cryoglobulines de type III.

III.2 - Dosage des protéines

On dose les protéines du sérum total avant et après soustraction de la cryoglobuline. Cette méthode est évidemment très imprécise pour les concentrations faibles et doit être écartée.

III.3 - Dosage des protéines du cryoprécipité

Après avoir isolé et purifié la cryoglobuline (cf. paragraphe : caractérisation immuno-chimique des cryoglobulines) à partir d'une quantité donnée de sérum, on dose directement les protéines du cryoprécipité. Le résultat est exprimé en g/L. Deux méthodes peuvent être utilisées : le dosage colorimétrique [5], et le dosage par mesure de l'absorbance à 280 nm des noyaux aromatiques [1].

III.3.1 - Dosage colorimétrique

On dose les protéines du cryoprécipité par la technique colorimétrique du biuret. Les réactifs utilisés et le cryoprécipité doivent être chauffés à + 37 °C avant dosage. La gamme étalon utilisée est une solution d'albumine bovine.

III.3.2- Dosage par mesure de l'absorbance à 280 nm des noyaux aromatiques

Le cryoprécipité purifié est dilué à + 37 °C dans un volume minimum de sérum physiologique. On lit l'absorbance à 280 nm dans des cuves en quartz. La gamme étalon utilisée est une solution de gammaglobulines humaines.

Pour ces deux techniques, la concentration de la cryoglobuline C en g/L est :

$$C = \frac{c \times v}{V}$$

c = concentration de la cryoglobuline dans le précipité purifié en g/L.

v = volume de dilution du cryoprécipité en ml.

V = volume du sérum total utilisé en ml.

III.3.3 - Avantages et inconvénients

Il n'existe pas de méthode idéale de quantification des cryoglobulines. La détermination du cryocrite bien qu'imprécise est une technique rapide, fiable et facilement réalisable en pratique courante. Cependant, le comportement des cryoglobulines au cours de la centrifugation varie d'un cas à l'autre. De plus, cette technique de dosage est peu précise pour les cryoglobulines de faible concentration et ne permet pas leur suivi. Par contre, en cas de cryoglobulinémie importante, cette méthode permet d'apprécier des variations évidentes si le malade est sous traitement.

Le dosage des protéines totales du cryoprécipité, après isolement et purification de la cryoglobuline est long et imparfait également. Il y a nécessairement perte de protéines au cours de la purification. Par ailleurs, le choix de la protéine étalon (albumine bovine ou gammaglobulines humaines purifiées) ne reflète pas toujours la composition protéique de la cryoglobuline étudiée.

■ IV. CARACTÉRISATION IMMUNOCHIMIQUE DES CRYOGLOBULINES

Trois méthodes peuvent être utilisées pour la caractérisation immunochimique des cryoglobulines. Quelle que soit la méthode choisie, il faut au préalable isoler et purifier la cryoglobuline.

IV.1 - Isolement et purification

Les conditions de prélèvement sont celles décrites précédemment pour la recherche de cryoglobulines. La quantité de sang prélevé est fonction de la quantité de cryoprécipité observée (à titre indicatif, 2 à 4 tubes secs de 7 ml).

Le sérum est décanté dans des tubes coniques, ce qui facilite l'isolement et les lavages. On ajoute de l'azoture de sodium (0,1 % final). Les tubes sont conservés bouchés à + 4 °C pendant 8 jours, puis centrifugés à + 4 °C pendant 30 min à 3 000 tr/min. Le surnageant est éliminé. Le précipité est lavé 3 fois à + 4 °C dans 0,1 à 0,2 ml de sérum physiologique, pour éliminer les autres protéines sériques. Les centrifugations sont effectuées dans une centrifugeuse réfrigérée à + 4 °C. Un cryoprécipité bien purifié contient moins de 5 % d'albumine. Une électrophorèse du cryoprécipité effectuée à + 37 °C permet ce contrôle.

IV.2 - Caractérisation immunochimique

Le cryoprécipité est redissout à + 37 °C dans un minimum de volume de sérum physiologique. Les différents composants de la cryoglobuline sont identifiés soit par immunoelectrophorèse, immunofixation ou immunoempreinte.

Les cuves de migration doivent être mises dans une étuve à + 37 °C. Pour caractériser une cryoglobuline, il faut nécessairement utiliser les antisérums suivants : antisérum humain normal, anti-chaînes lourdes (γ , α , μ) et anti-chaînes légères (κ et λ). S'il existe une précipitation de la cryoglobuline au point de dépôt, un prétraitement de la cryoglobuline par le β mercaptoéthanol, qui dépolymérise les IgM globulines, est nécessaire.

L'immunoélectrophorèse est une technique longue et son interprétation difficile. L'immunoempreinte est une technique très sensible mais son utilisation dans un laboratoire non spécialisé n'est pas conseillée. L'immunofixation est la technique la plus utilisée. Sa facilité d'interprétation justifie son emploi en pratique courante.

IV.3 - Résultats

La caractérisation immunochimique des cryoglobulines permet de distinguer trois types de cryoglobulines selon la classification de Brouet et coll. (*tableau I*).

Cette classification a été déterminée après analyse des cryoglobulines par immunoélectrophorèse en 1974. Elle est toujours largement utilisée à ce jour. Cependant, l'utilisation de l'immunoempreinte, technique plus sensible, a permis de proposer une autre classification. Cette dernière tient compte de cryoglobulines mixtes composées d'immunoglobulines oligoclonales. Ce type de cryoglobulines (cryoglobulines « oligoclonales »), qui ne rentre pas dans la classification précédente de Brouet, pourrait représenter un quatrième type de cryoglobulines [6]. L'intérêt clinique de ce quatrième type de cryoglobulines reste à déterminer.

Tableau I : classification des cryoglobulines

Type	Composition immunochimique*	Concentration
Type I : Cryoglobulines monoclonales	IgM ou IgG ou IgA Protéine de Bence Jones (rare)	Le plus souvent > 5 g/L Cryocrite > 1 %
Type II : Cryoglobulines mixtes avec un Composant monoclonal	Surtout IgM + IgG (très souvent IgM anti-IgG) Rarement : IgG + IgG ; IgA + IgG	Le plus souvent 1 à 5 g/L 1 % < cryocrite < 5 %
Type III : Cryoglobulines mixtes polyclonales	Surtout IgM + IgG (très souvent IgM anti-IgG) Rarement : IgA + IgM + IgG ou IgM	Généralement < 1 g/L Cryocrite < 1 %

* Le composant monoclonal est en **gras**.

■ V. PHYSIOPATHOLOGIE

V.1- Mécanismes de la cryoprécipitation

Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer les mécanismes de cryoprécipitation. Dans les cas de cryoglobulines monoclonales de type I, le mécanisme est peu clair. On a

décrit des interactions non spécifiques entre les fragments Fc des immunoglobulines, ayant pour conséquence une auto-agrégation réversible à chaud [7]. Il a été montré également des anomalies de structure : anomalies de glycosylation [8, 9], modification de structure de la partie variable des chaînes lourdes et légères [10] etc... Mais aucun argument formel n'a permis d'affirmer que les cryoglobulines monoclonales de type I étaient des molécules de structure anormale.

Par contre, le mécanisme de cryoprécipitation des cryoglobulines mixtes de type IgM-IgG est mieux connu. Il est lié à la formation de complexes immuns. L'analyse de cryoglobulines mixtes après purification a permis de montrer le rôle central des IgM dans ce phénomène. Le plus souvent, les IgM monoclonales des cryoglobulines de type II ou les IgM polyclonales des cryoglobulines de type III ont une activité anti-IgG [11, 12]. Il semblerait que cette activité soit dirigée préférentiellement contre certaines sous-classes d'IgG (IgG1 et IgG3) [13]. Par ailleurs, il a été montré que l'activité anti-IgG pouvait être dirigée soit contre le fragment Fc des IgG (activité facteur rhumatoïde) [11, 12], soit contre le fragment F(ab')₂ des IgG [14]. On a isolé les différents constituants (IgM et IgG) de ces complexes immuns cryoprécipitants. Séparément, chaque constituant (IgM d'un côté, IgG de l'autre) ne cryoprécipite plus lorsqu'il est mis à + 4 °C. La cryoprécipitation réapparaît quand on les mélange [1]. L'activité anticorps est portée par les IgM. En effet, les IgM isolées et mélangées avec des IgG humaines normales reprécipitent, alors que les IgG isolées ne précipitent pas avec des IgM normales [1, 15]. D'autres facteurs physico-chimiques indépendants des immunoglobulines pourraient intervenir dans le phénomène de cryoprécipitation : pH, force ionique du milieu, etc... [1, 16]. L'existence de tels facteurs pourrait expliquer pourquoi les facteurs rhumatoïdes polyclonaux, présents chez les sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde, ne cryoprécipitent que rarement.

Dans les cryoglobulines mixtes, il existe d'autres constituants que les immunoglobulines : fraction C1q du complément [17], fibronectine [18], β lipoprotéine [17] dans les cryoglobulines de type III ; agent infectieux dans les cryoglobulines de type II et III [19-21]. Ces constituants non immunoglobuliniques pourraient intervenir dans la cryoprécipitation sans que leur rôle soit univoque. L'hypothèse du rôle d'un agent infectieux dans la cryoprécipitation a été évoquée avec l'exemple de l'hépatite C. Premièrement, on trouve une concentration du virus de l'hépatite C (VHC) 1 000 fois supérieure dans le cryoprécipité par rapport à sa concentration sérique [21]. Deuxièmement, plusieurs études ont montré que le cryoprécipité était composé d'anticorps dirigé contre le virus (IgG anti-VHC) et de particules virales [21-23]. Troisièmement, dans les cryoglobulines de type II, l'IgM monoclonale responsable de l'activité facteur rhumatoïde a un idiotype particulier (WA Xid), ce qui serait en faveur d'une activité anticorps sélectionnée par l'antigène viral (sélection clonale) [21, 23].

Néanmoins, les mécanismes de cryoprécipitation peuvent être différents chez des patients infectés par un même virus. Ainsi, il a été démontré que la composition immuno-chimique de cryoglobulines isolées chez des patients atteints d'hépatite B pouvait être de deux types [24]. Chez certains patients, la cryoglobuline était composée d'IgM et d'IgG dirigées contre le virus. Chez d'autres, la cryoglobuline était composée d'IgG dirigées contre le virus et d'IgM ayant une activité facteur rhumatoïde. De même, il a été montré que la présence de particules virales n'était pas nécessaire à la cryoprécipitation chez les patients atteints d'hépatite C, alors qu'elles avaient été isolées dans les cryoprécipités chez d'autres patients [15, 21].

V.2 - Mécanismes des lésions

Selon leur type immunochimique, les cryoglobulines sont responsables de symptômes cliniques différents.

Les cryoglobulines comportant un constituant monoclonal (type I ou type II) peuvent précipiter dans les vaisseaux, sans que le froid soit le seul facteur de précipitation. Cette précipitation intravasculaire entraîne une ischémie. Cette ischémie peut se traduire cliniquement par une acrocyanose, une nécrose voire la gangrène. Deux facteurs sont importants dans ces accidents cliniques : la concentration de l'immunoglobuline monoclonale et sa température de précipitation. Une concentration élevée et une température de précipitation voisine de + 37 °C peuvent entraîner des lésions importantes au niveau des vaisseaux superficiels après exposition au froid. Cependant, il n'y a pas toujours de parallélisme entre la température de précipitation de la cryoglobuline et l'importance des signes cliniques [25]. L'hyperviscosité sanguine est un autre facteur de risque lésionnel. L'hyperviscosité sanguine peut être à l'origine de dépôt d'immunoglobulines dans les glomérules rénaux, bien que le rein soit un organe protégé du froid [26]. Plus rarement, elle peut entraîner des troubles neuro-sensoriels et des hémorragies muqueuses. Cette hyperviscosité sanguine peut être secondaire soit au caractère cryoprécipitant de l'immunoglobuline monoclonale, soit à la concentration élevée de l'immunoglobuline monoclonale sans que le caractère cryoprécipitant ne soit en cause. Enfin, il est important de souligner que la moitié des cryoglobulines de type I n'entraîne aucun symptôme clinique sans que l'on en connaisse la raison.

Les cryoglobulines mixtes sont souvent associées à des manifestations cliniques telles que décrites au cours de maladies à complexes immuns circulants. Les symptômes cliniques sont essentiellement ceux d'une vascularite et une glomérulonéphrite [25]. Histologiquement, on retrouve, au sein des lésions vasculaires cutanées et rénales, des dépôts d'immunoglobulines et de complément mis en évidence par immunofluorescence [27-30]. D'autre part, on retrouve fréquemment les fractions C1q et C4 du complément dans les cryoprécipités. C'est pourquoi, une diminution de la fraction C4, associée à une concentration normale de la fraction C3 du complément dans le sérum d'un patient, doit faire rechercher la présence de cryoglobulines. Néanmoins, 15 % des cryoglobulines mixtes sont asymptomatiques. Leur concentration est généralement très faible. Ces cryoglobulines mixtes sont proches des cryoglobulines décrites lors d'immunisation expérimentale chez un animal normal [31]. On les observe également au cours de maladies infectieuses humaines. Ainsi, la présence de cryoglobulines pourrait être assimilée à l'existence de complexes immuns circulants.

■ VI. MANIFESTATIONS CLINIQUES ASSOCIÉES AUX CRYOGLOBULINES

VI.1 - Manifestations cutanées

Les manifestations cutanées sont fréquentes et révélatrices dans deux tiers des cas [1]. On distingue deux types de manifestations : celles liées aux cryoglobulines mixtes et celles liées aux cryoglobulines monoclonales. Dans le cas des cryoglobulines mixtes, il s'agit

Avec l'aimable autorisation du Pr J.C. ROUJEAU



Photo 4 : Purpura vasculaire révélateur d'une cryoglobulinémie mixte.



Cryoglobulinémie monoclonale :

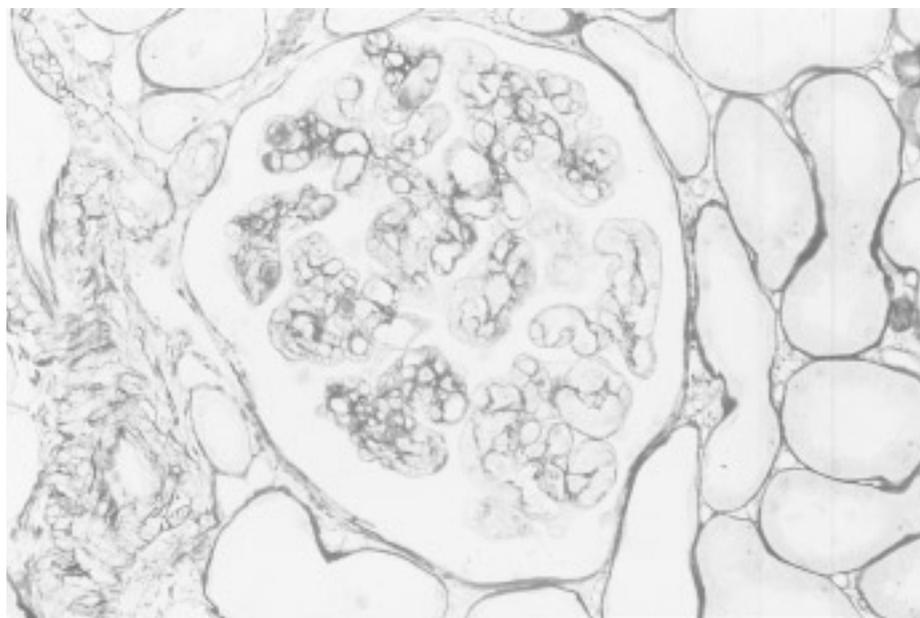
Photo 5 : Aspect pré-nécrotique du lobe de l'oreille.

Photo 6 : Nécrose cutanée des jambes.

essentiellement d'un purpura vasculaire prédominant aux membres inférieurs (*photo 4*). Ce purpura peut s'étendre à l'abdomen et parfois aux membres supérieurs. Il évolue par poussées et peut s'accompagner d'un érythème et de nodules dermiques. Il est fréquemment déclenché par l'orthostatisme, et seulement par le froid dans un tiers des cas. Par contre, le livédo réticulaire et l'urticaire systémique sont toujours induits par le froid. Lorsqu'il existe, le syndrome de Raynaud lié aux cryoglobulines mixtes est généralement modéré. Dans le cas des cryoglobulines monoclonales, le rôle du froid dans les manifestations cutanées est, par contre, évident quand la concentration de la cryoglobuline monoclonale est élevée ($> 5 \text{ g/L}$). Le tableau clinique est différent. Le syndrome de Raynaud peut être sévère. Plus rarement, des nécroses cutanées peuvent se voir au niveau des régions exposées au froid : le nez, les oreilles et les extrémités des membres (*photos 5 et 6*).

VI.2 - Manifestations rénales

L'atteinte rénale est fréquente dans les cryoglobulines mixtes, alors qu'elle est rare dans les cryoglobulines de type I [1, 32]. Elle peut être révélatrice. Le plus souvent, elle est tardive. Il s'agit d'une atteinte glomérulaire qui peut être modérée avec protéinurie et hématurie. Dans 20 % des cas, il existe un syndrome néphrotique. L'hypertension artérielle est présente dans 85 % des cas. L'atteinte rénale peut être sévère dans les cryoglobulines de type II. Sur le plan anatomo-pathologique, on observe des dépôts endomembraneux, une prolifération endothéliale d'intensité variable et des thrombi dans les capillaires glomérulaires (*photo 7*) [33]. L'examen de ces dépôts en immunofluorescence montre la présence d'immunoglobulines identiques à celles composant la cryoglobuline (*photo 8*). Ces immunoglobulines sont associées aux fractions C1q, C4 et C3 du complément. On peut observer dans 30 % des cas une infiltration monocytaire et lymphocytaire dans l'interstitium. Un aspect typique de rein de cryoglobuline s'observe parfois en l'absence de cryoglobuline détectable dans le sérum.



Avec l'aimable autorisation du Dr D. DESVAUX

Photo 7 : Biopsie rénale d'une cryoglobulinémie mixte : lésions de glomérulonéphrite membranoproliférative avec présence de microthrombi intercapillaires ; coloration argentique ($\times 25$).

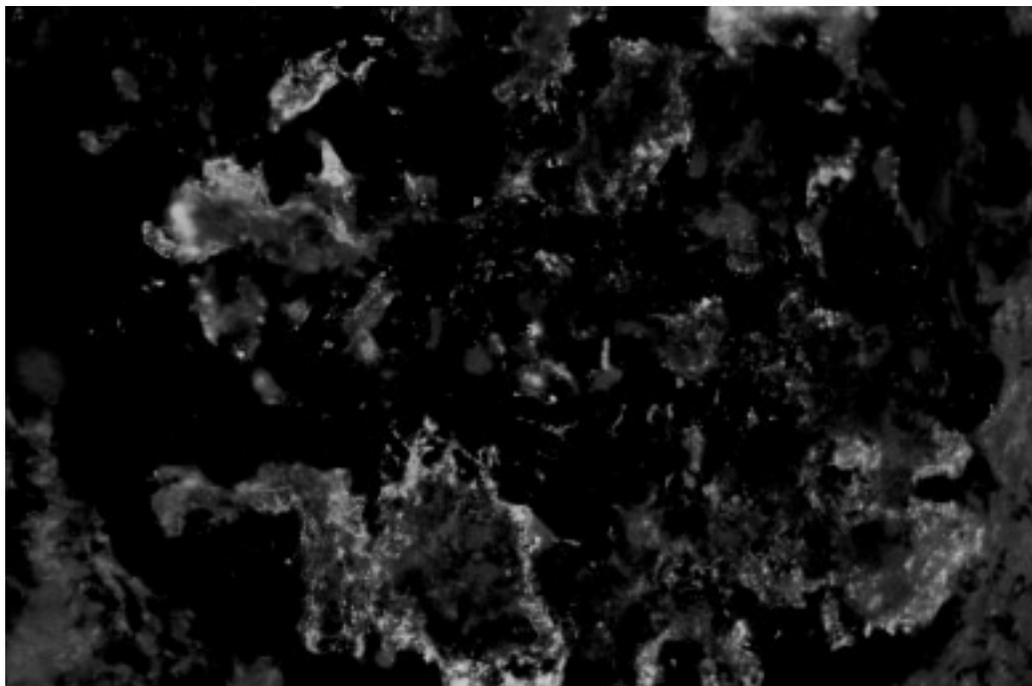


Photo 8 : Cryoglobulinémie monoclonale IgM Kappa. Aspect en immunofluorescence de la biopsie rénale : présence de volumineux dépôts sous-endothélieux.

VI.3 - Manifestations neurologiques

L'atteinte neurologique est rarement un symptôme révélateur de la présence de cryoglobuline. Cette atteinte s'installe progressivement. C'est habituellement une polynévrite sensitivo-motrice, touchant les membres inférieurs. Elle peut être aggravée après exposition au froid. Selon les séries publiées, la fréquence de cette neuropathie périphérique varie de 20 à 90 % [1, 34, 35]. La fréquence de 90 % tient compte des symptômes neurologiques, mais également des données électro-physiologiques et des biopsies nerveuses. L'atteinte de système nerveux central est rare.

VI.4 - Autres manifestations cliniques

Les manifestations articulaires sont fréquentes au cours des cryoglobulines mixtes. Ce sont essentiellement des arthralgies des mains et des genoux. L'atteinte articulaire peut parfois prendre l'allure d'une arthrite inflammatoire, avec arthralgies axiales et périphériques, bilatérales et symétriques. La ponction articulaire permet alors de faire le diagnostic d'arthrite micro-cristalline, liée à la présence d'une cryoglobuline particulière, puisque sous forme de cristaux.

On peut observer des douleurs abdominales (vasculite intestinale), une hépatomégalie avec une augmentation modérée des transaminases et des phosphatases alcalines.

■ VII. MALADIES ASSOCIÉES AUX CRYOGLOBULINES

Il existe une corrélation entre le type immunochimique de la cryoglobuline et les affections associées (*tableau II*). Les cryoglobulines de type I et II (composant monoclonal) sont souvent associées aux hémopathies lymphoïdes. Les cryoglobulines de type II et III sont détectées au cours des maladies infectieuses et des affections auto-immunes. Les symptômes liés à la présence d'une cryoglobuline peuvent précéder parfois de plusieurs années l'apparition d'une hémopathie lymphoïde ou d'une maladie auto-immune. Au cours de l'évolution d'une cryoglobuline, il faut donc savoir répéter les explorations biologiques pour rechercher son étiologie.

VII.1- Les hémopathies lymphoïdes

Selon les séries, entre 5 à 10 % des immunoglobulines monoclonales des patients atteints de myélome et de maladie de Waldenström cryoprécipitent [1, 36]. Au cours du myélome, la cryoglobuline est presque toujours de type I. Dans la maladie de Waldenström, la moitié des cryoglobulines sont de type I, l'autre moitié de type II (IgM monoclonale anti-IgG polyclonales). Dans la moitié des observations rapportées, la cryoglobuline est symptomatique. D'autres hémopathies lymphoïdes s'accompagnent avec une moins grande fréquence d'une cryoglobuline de type I ou II : leucémie lymphoïde chronique, lymphome non hodgkinien et lymphadénopathie angio-immunoblastique [25]. Dans la maladie chronique des agglutinines froides, l'immunoglobuline monoclonale IgM Kappa à activité anti-érythrocytaire (anti-I) peut être cryoprécipitante [37].

Tableau II : Affections associées

Affections	Type de la cryoglobuline
1) Hémopathies lymphoïdes <ul style="list-style-type: none"> – Myélome (10 % des Ig monoclonales cryoprécipitent) – Macroglobulinémie de Waldenström (10 % des IgM monoclonales cryoprécipitent) – Leucémie lymphoïde chronique 	I, rarement II I et II II et III
2) Maladies infectieuses <ul style="list-style-type: none"> – Virales : mononucléose infectieuse, infection à cytomégalovirus, hépatite C, hépatite B – Bactériennes : maladie d'Osler, lèpre, syphilis – Parasitaires : trypanosomiase, paludisme 	II et III
3) Maladies auto-immunes <ul style="list-style-type: none"> – Lupus érythémateux disséminé – Syndrome de Gougerot-Sjögren – Polyarthrite rhumatoïde 	II et III

VII.2 - Maladies virales

La présence de cryoglobulines mixtes a été rapportée dans de nombreuses affections virales : mononucléose infectieuse, infections à cytomégalovirus, syndrome d'immuno-déficience acquise, hépatite B et C. Mais c'est avec l'hépatite C que l'association est la plus forte. La prévalence d'une cryoglobulinémie au cours d'une infection par le VHC varie entre 40 et 80 % selon les séries publiées [21, 22, 38, 39]. Il n'a pas été établi de corrélation entre la présence d'une cryoglobuline et un génotype particulier du VHC. Ces cryoglobulinémies sont symptomatiques chez environ 10 % des patients. Les cryoglobulines mixtes associées au VHC peuvent être traitées si nécessaire par traitement antiviral (Interféron α et Ribavirine). C'est pourquoi, la découverte d'une cryoglobulinémie mixte chez un patient implique la recherche d'une infection par le VHC.

VII.3 - Maladies bactériennes et parasitaires

La présence d'une cryoglobuline est fréquente au cours des infections bactériennes et parasitaires [40]. Ces cryoglobulines sont habituellement transitoires. Elles sont de type II ou III. Leur concentration est faible ($< 0,1$ g/L). Ces cryoglobulines mixtes sont des complexes immuns circulants dans lesquels l'agent infectieux n'est pas mis en évidence avec certitude. De nombreuses maladies infectieuses bactériennes sont associées à la présence d'une cryoglobuline : endocardite subaiguë, fièvre Q, syphilis, lèpre, néphropathie post-streptococcique, maladie de Lyme. De même, la présence d'une cryoglobuline est associée à certaines maladies parasitaires : maladie de Kala-Azar, paludisme, toxoplasmose, échinococcose, schistosomiase.

VII.4 - Maladies auto-immunes

Les cryoglobulines mixtes sont fréquentes au cours des maladies auto-immunes et leur recherche représente une technique peu sensible, mais donc très significative, de recherche de complexes immuns circulants [1]. Leur présence peut parfois précéder de nombreuses années l'apparition d'une maladie auto-immune clinique. Leur concentration est faible ($< 0,5$ g/L). Ces cryoglobulines sont souvent de type III. Au cours du lupus érythémateux disséminé, la présence d'une cryoglobulinémie varie selon les séries [41, 42]. Cette cryoglobulinémie est habituellement associée à une hypocomplémentémie et une atteinte rénale. On retrouve d'ailleurs, les immunoglobulines de la cryoglobuline et des fractions du complément dans les glomérules rénaux. La cryoglobuline peut précéder l'atteinte rénale. Sa présence doit en faire craindre la survenue et modifier le traitement. La recherche de cryoglobulines est donc un élément majeur du suivi de l'évolution du lupus. Au cours du syndrome de Gougerot-Sjögren, la cryoglobulinémie est souvent de type II associée à une néphropathie glomérulaire. La présence de cryoglobulines est fréquente au cours des polymyosites, et plus rare au cours de la polyarthrite rhumatoïde et de la périarthrite noueuse.

■ VIII. CRYOGLOBULINES ESSENTIELLES OU IDIOPATHIQUES

La présence d'une cryoglobuline mixte asymptomatique à une concentration $< 0,01$ g/L est de 2 à 3 % chez les sujets âgés de plus de 60 ans.

Les cryoglobulines sont dites « essentielles » lorsque les examens cliniques et biologiques n'ont pas mis en évidence d'affections associées. La fréquence de ces cryoglobulines idiopathiques a fortement diminué depuis la découverte du VHC. En effet, chez 70 % des patients ayant une cryoglobulinémie essentielle, on a mis en évidence la présence du virus de l'hépatite C [39].

Les cryoglobulines mixtes symptomatiques surviennent le plus souvent chez les femmes d'environ 50 ans. Elles s'accompagnent en règle d'un purpura vasculaire. L'évolution de la maladie est bénigne mais le pronostic dépend de l'existence de lésions rénales.

■ IX. ANOMALIES BIOLOGIQUES LIÉES À LA PRÉSENCE DE CRYOGLOBULINES

Les interférences liées à la présence de cryoglobulines

La présence d'une cryoglobuline peut perturber les résultats de certaines analyses biologiques, en particulier, si la température de précipitation de la cryoglobuline est supérieure à la température ambiante du laboratoire où sont effectués les analyses.

On peut observer une vitesse de sédimentation normale à la température du laboratoire, mais élevée si l'examen est effectué à $+ 37$ °C.

Une fausse hyperleucocytose et une fausse hyperplaquettose peuvent se voir, si la numération des éléments du sang est réalisée avec un appareil automatique à une température de $+ 20$ °C. En effet, les particules cryoprécipitantes sont confondues par l'appareil avec les leucocytes et les plaquettes. Pour éviter ces anomalies, il suffit de laisser le tube de sang 30 min à $+ 37$ °C avant d'effectuer l'hémogramme.

La présence d'une cryoglobuline peut être responsable d'une fausse hypoprotidémie et/ou d'une fausse hypogammaglobulinémie sur le protéinogramme. Il est alors nécessaire de réaliser l'électrophorèse des protéines dans une cuve de migration placée à $+ 37$ °C. De même, des variations inexplicables des résultats de protidémie doivent conduire à la recherche de cryoglobulines.

La présence d'une immunoglobuline monoclonale cryoprécipitante peut être méconnue si le prélèvement de sang et la décantation du sérum n'ont pas été réalisés à $+ 37$ °C.

De même, la présence d'une cryoglobuline peut perturber la recherche d'autoanticorps. Cette recherche doit être pratiquée sur un sérum réchauffé à $+ 37$ °C.

Exceptionnellement, une immunoglobuline monoclonale cryoprécipitante dont la température de précipitation est voisine de $+ 37$ °C peut former des précipités dans la seringue de prélèvement sanguin.

Le dosage du Complément

Dans les cryoglobulines mixtes, on observe fréquemment une diminution de l'activité hémolytique du complément total (CH50). Cette baisse du CH50 est associée à une diminution des fractions C1q, C2 et C4. La concentration de la fraction C3 est généralement normale.

Le facteur rhumatoïde

La recherche de facteur rhumatoïde est habituellement positive dans les cryoglobulines mixtes. Cette activité facteur rhumatoïde est plutôt détectée par le test au latex que par la réaction de Waaler-Rose.

■ X. CONCLUSION

La recherche d'une cryoglobuline doit être réalisée devant des signes cliniques évocateurs, et certaines anomalies biologiques. Sa mise en évidence nécessite un prélèvement rigoureux. La caractérisation immunochimique de cette cryoglobuline permet de rechercher une étiologie. En cas de cryoglobuline de type I, on recherchera une hémopathie lymphoïde. Une cryoglobuline de type II doit faire rechercher en premier lieu une infection par le virus de l'hépatite C, sinon une hémopathie lymphoïde ou une maladie auto-immune. En cas de cryoglobuline de type III, on recherchera une maladie infectieuse (en particulier une hépatite due au virus C) et/ou une maladie auto-immune.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- BROUET J.C., CLAUVEL J.P., DANON F., KLEIN M., SELIGMANN M. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am. J. Med.*, 1974 ; 57 : 775-788.
- 2- GOREVIC P.D., KASSAB H.J., LEVO Y., KOHN R., MELTZER M., PROSE P., FRANKLIN E.C. Mixed cryoglobulinemia : clinical aspects and long-term follow up of 40 patients. *Am. J. Med.*, 1980 ; 69 : 287-308.
- 3- INVERNIZZI F., GALLI M., SERINO G., MONTI G., MERONI P.L., GRANATIERI C., ZANUSSI C. Secondary and essential cryoglobulinemias. Frequency, nosological classification, and long-term follow-up. *Acta Haematol.*, 1983 ; 70 : 73-82.
- 4- TARANTINO A. et al. Prognostic factors in essential mixed cryoglobulinemia nephropathy. In C. Ponticelli, L. Minetti, G D'Amico (eds) : *Antiglobulins, Cryoglobulins, and Glomerulonephritis*. Boston : Martinus Nijhoff, 1985 ; pp. 219-225.
- 5- MUSSET L., DIEMERT M.-C., TAIBI F., THI HUONG DU L., CACOUB P., LEGER J.-M., BOISSY G., GAILLARD O., GALLI J. Characterization of cryoglobulins by immunoblotting. *Clin. Chem.*, 1992 ; 38 : 798-802.

- 6- MUSSET L., DUARTE F., GAILLARD O., DU L.T., BILALA J., GALLI J., PREUD'HOMME J.L. Immunochemical characterization of monoclonal IgG containing mixed cryoglobulins. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1994 ; 70 : 166-170.
- 7- GYOTOKU Y., ABDELMOULA M., SPERTINI F., IZUI S., LAMBERT P.H. Cryoglobulinemia induced by monoclonal immunoglobulin G rheumatoid factor derived from autoimmune MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *J. Immunol.*, 1987 ; 138 : 3785-3792.
- 8- TOMANA M., SCHROHENLOHER R.E., KOOPMAN W.J., ALARCON G.S., PAUL W.A. Abnormal glycosylation of serum IgG from patients with chronic inflammatory diseases. *Arthritis Rheum.*, 1988 ; 31 : 333-338.
- 9- MIDDAGH C.R., LITMAN G.W. Atypical glycosylation of an IgG monoclonal cryoimmunoglobulin. *J. Biol. Chem.*, 1987 ; 262 : 3671-3673.
- 10- GERBER-JENSON B., KAZIN A., KCHOC J.M., SCHEFFEL C., ERICKSON B.W., LITMAN G.W. Molecular basis for the temperature-dependent insolubility of cryoglobulins. X. The amino acid sequence of the heavy chain variable region of McE. *J. Immunol.*, 1981 ; 126 : 1212-1216.
- 11- METZGER H. Characterization of a human macroglobulin. V. A Waldenström macroglobulin with antibody activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1967 ; 57 : 1490.
- 12- STONE M.J. Studies on monoclonal antibodies. I. The specificity and binding properties of a Waldenström macroglobulin with anti- γ G activity. *J. Lab. Clin. Med.*, 1973 ; 81 : 393.
- 13- CREAM J.J., VIRELLA G., HOWARD H. IgG H chain subclasses in mixed cryoglobulins. *Immunology*, 1972 ; 23 : 405.
- 14- GELTNER D., FRANKLIN E.C., FRANGIONE B. Antiidiotypic activity in the IgM fractions of mixed cryoglobulins. *J. Immunol.*, 1980 ; 125 : 1530.
- 15- SCHOTT P., POLZIEN F., MULLER-ISSBERNER A., RAMADORI G., HARTMANN H. *In vitro* reactivity of cryoglobulin IgM and IgG in hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia. *J. Hepatol.*, 1998 ; 28 : 17-26.
- 16- MELTZER M., FRANKLIN E.C. Cryoglobulinemia. A study of twenty-nine patients : IgG and IgM cryoglobulins and factors affecting cryoprecipitability. *Am. J. Med.*, 1966 ; 40 : 828.
- 17- HANAUER L.B., CHRISTIAN C.L. Studies of cryoproteins and systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.*, 1967 ; 46 : 400-408.
- 18- BEAULIEU A.D., VALET J.P., STREVEY J. The influence of fibronectin on cryoprecipitate formation in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 1981 ; 24 : 1383.
- 19- GOWER R.G., SAUSKER W.F., KOHLER P.F., THORNE G.E., McINTOSH R.M. Small vessel vasculitis caused by hepatitis B virus immune complexes. Small vessel vasculitis and HBsAG. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1978 ; 62 : 222-228.

- 20- WANDS J.R., PERROTO J.L., ISSELBACHER K.J. Circulating immune complexes and complement sequence activation in infectious mononucleosis. *Am. J. Med.*, 1976 ; 60 : 269.
- 21- AGNELLO V., CHUNG R.T., KAPLAN L.M. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N. Engl. J. Med.*, 1992 ; 327 : 1490-1495.
- 22- MISIANI R., BELLAVITA P., FENILI D., BORELLI G., MARCHESI D., MASSAZZA M., VENDRAMIN G., COMOTTI B., TANZI E., SCUDELLER G., ZANETTI A. Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Ann. Intern. Med.*, 1992 ; 117 : 573-577.
- 23- SANSONNO D., IACOBELLI A.R., CORNACCHIULO V., LAULETTA G., DISTASI M.A., GATTI P., DAMMACCO F. Immunochemical and biomolecular studies of circulating immune complexes isolated from patients with acute and chronic hepatitis C virus infection. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1996 ; 26 : 465-475.
- 24- LEVO Y., GOREVIC P.D., KASSAB H.J., ZUCKER-FRANKLIN D., FRANKLIN E.C. Association between hepatitis B virus and essential mixed cryoglobulinemia. *N. Engl. J. Med.*, 1977 ; 296 : 1501-1504.
- 25- BROUET J.C. Cryoglobulinémies. Livre « Maladies et syndromes systémiques », Marcel Francis Khan (ed), Editions Médecine Science Flammarion, 2000, Chap. 40.
- 26- LOCKWOOD C.M. Lymphoma, cryoglobulinemia and renal disease. *Kidney Int.*, 1979 ; 16 : 522.
- 27- SAMS W.M., CLAMAN H.N., KOHLER P.F., McINTOSH R.M., SMALL P., MAS M.F. Human necrotizing vasculitis : immunoglobulins and complement in vessel walls of cutaneous lesions and normal skin. *J. Invest. Dermatol.*, 1975 ; 64 : 441-445.
- 28- BRAVERMAN I.M., YEN A. Demonstration of immune complexes in spontaneous and histamine-induced lesions and in normal skin of patients with leukocytoclastic angiitis. *J. Invest. Derm.*, 1975 ; 64 : 105.
- 29- MAGGIORE Q., BARTOLEMEO F., L'ABBATE A., MISEFARI V., MARTORANO C., CACCAMO A., DI BELGIOJOSO G.B., TARANTINO A., COLASANTI G. Glomerular localization of circulating antiglobulin activity in essential mixed cryoglobulinemia with glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 1982 ; 21 : 387-394.
- 30- VERROUST P., MOREL-MAROGER L., PREUD'HOMME J.L. Renal lesions in dysproteinemias. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1982 ; 5 : 333.
- 31- SHIBATA T., BERNEY T., SPERTINI F., IZUI S. Rheumatoid factors in mice bearing the *lpr* or *gld* mutation. Selective production of rheumatoid factor cryoglobulins in MRL/MPJ-*lpr/lpr* mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 1992 ; 87 : 190-195.

- 32- D'AMICO G., COLASANTI G., FERRARIO F. et coll. L'atteinte rénale dans la cryoglobulinémie mixte essentielle : un type particulier de néphropathie à médiation immunitaire. In : Actualités néphrologiques, Flammarion, Médecine-Sciences, Paris, 1987.
- 33- FEINER H.D. Relationship of tissue deposits of cryoglobulin to clinical features of mixed cryoglobulinemia. *Hum. Pathol.*, 1983 ; 14 : 710.
- 34- FERRI C., LA CIVITA L., CIRAFISI C., SICILIANO G., LONGOMBARDO G., BOMBARDIERI S., ROSSI B. Peripheral neuropathy in mixed cryoglobulinemia : clinical and electrophysiologic investigations. *J. Rheumatol.*, 1992 ; 19 : 889-895.
- 35- GEMIGNANI F., PAVESI G., FIOCCHI A., MANGANELLI P., FERRACCIOLI G., MARBINI A. Peripheral neuropathy in essential mixed cryoglobulinemia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1992 ; 55 : 116-120.
- 36- GREY H.M., KOHLER P.F., TERRY W.D., FRANKLIN E.C. Human monoclonal gamma G-cryoglobulins with anti-gamma-globulin activity. *J. Clin. Invest.*, 1968 ; 47 : 1875-1884.
- 37- TSAI C.M., ZOPF D.A., YU R.K., WISTAR R., GINSBURG V. A Waldenström macroglobulin that is both a cold agglutinin and a cryoglobulin because it binds N-acetylneuraminosyl residues. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1977 ; 74 : 4591-4594.
- 38- CACOUB P., LUNEL-FABIANI F., MUSSET L., PERRIN M., FRANGEUL L., LEGER J.M., HURAUX J.M., PIETTE J.C., GODEAU P. Mixte cryoglobulinemia and hepatitis C virus. *Am. J. Med.*, 1994 ; 96 : 124-132.
- 39- FERRI C., GRECO F., LONGOMBARDO G., PALLA P., MORETTI A., MARZO A., MAZZONI A., PASERO G., BOMBARDIERI S., HIGHFIELD P., CORBISHLEY T. Association between hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemia. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 1991 ; 9 : 621-624.
- 40- GOREVIC P.D., KASSAB H.J., LEVO Y., KOHN R., MELTZER M., PROSE P., FRANKLIN E.C. Mixed cryoglobulinemia : clinical aspects and long-term follow-up of 40 patients. *Am. J. Med.*, 1980 ; 69 : 287-308.
- 41- AGNELLO V., KOFFLER D., KUNKEL H.G. Immune complex systems in the nephritis of systemic lupus erythematosus. *Kidney Int.*, 1973 ; 3 : 90-99.
- 42- WINFIELD J.B., KOFFLER D., KUNKEL H.G. Specific concentration of polynucleotide immune complexes in the cryoprecipitates of patients with SLE. *J. Clin. Invest.*, 1975 ; 56 : 563-570.

MALADIES DES CHÂÎNES LOURDES

J.L. PREUD'HOMME

Connues depuis près de 40 ans [1], les maladies des chaînes lourdes sont des syndromes immunoprolifératifs monoclonaux caractérisés par la présence d'une immunoglobuline monoclonale très particulière, car doublement anormale par sa chaîne lourde tronquée et l'absence de chaînes légères. Cette double lésion moléculaire a posé le très intéressant problème de son mécanisme, maintenant largement résolu bien que des incertitudes persistent. Les maladies des chaînes lourdes ont aussi un intérêt particulier aux plans clinique et oncologique.

■ I - GÉNÉRALITÉS

Les maladies des chaînes lourdes sont connues pour les trois principales classes d'immunoglobulines et les maladies des chaînes lourdes γ [2], α [3] et μ [4] ont été successivement décrites. Leur fréquence est probablement sous-estimée en raison notamment d'un diagnostic biologique parfois difficile. Les aspects cliniques ont été l'objet de nombreux articles de revue [5-13] et nous ne les évoquerons que brièvement.

Le tableau clinique de la maladie des chaînes lourdes γ est variable, ressemblant dans près de la moitié des cas à celui de la macroglobulinémie, avec des adénopathies, une splénomégalie, classiquement un œdème de la luette, signe rare mais évocateur, et une infiltration médullaire lymphoplasmocytaire polymorphe. Il peut également s'agir d'autres variétés de proliférations lymphocytaires B, tableau de leucémie lymphoïde chronique (avec parfois prolifération biclonale, le clone produisant la protéine pathologique étant distinct du clone leucémique), diverses formes histologiques de lymphome, maladie de Hodgkin. Comme dans les autres types d'immunoglobulines monoclonales, des observations dans lesquelles aucune prolifération maligne n'était décelable ont été rapportées dans les maladies des chaînes lourdes. Les maladies des chaînes lourdes γ sont particulières par la fréquence des manifestations autoimmunes (environ 1 malade sur 4). Polyarthrite rhumatoïde, anémie hémolytique, purpura thrombopénique, syndrome de Gougerot-Sjögren, myasthénie, vasculite ou thyroïdite peuvent même précéder l'apparition d'une prolifération décelable.

La maladie des chaînes lourdes μ est le plus souvent associée à une leucémie lymphoïde chronique avec présence de plasmocytes médullaires contenant des vacuoles intracytoplasmiques (et produisant la chaîne lourde délétée). Il peut aussi s'agir de lymphome, parfois d'aucune prolifération décelable.

La maladie des chaînes lourdes α est la plus fréquente des maladies des chaînes lourdes. Sa forme habituelle, digestive, survient en général chez des sujets jeunes (10 à 30 ans), avec une répartition géographique frappante (pourtour méditerranéen, Extrême-Orient,

Amérique Centrale et du Sud), soit des régions où les infections entériques sont fréquentes. La symptomatologie est assez univoque, avec en général un grave syndrome de malabsorption et une diarrhée chronique. Radiologiquement, on note une hypertrophie des plis muqueux diffuse reflétant l'infiltration diffuse de l'intestin grêle (et des ganglions mésentériques), particulièrement au niveau du duodénum et du jéjunum, parfois aussi (ou rarement isolément) de l'estomac, du côlon et du rectum, par les cellules produisant la protéine de la maladie des chaînes lourdes. Au premier stade de la maladie, cette prolifération monoclonale est habituellement lymphoplasmocytaire, parfois plasmocytaire ou lymphocytaire. Le chorion est massivement infiltré par cette prolifération avec atrophie villositaire et raréfaction des cryptes. Il existe, dès ce stade, des anomalies cytogénétiques, notamment des translocations affectant le cluster des gènes de chaînes lourdes en 14q32 [14]. Fait très remarquable, cette phase est susceptible de rémission complète par un simple traitement antibiotique, ce qui suggère le rôle pathogénique d'un germe intestinal non identifié. Spontanément, l'évolution se fait vers un stade intermédiaire, caractérisé par l'envahissement de la sous-muqueuse et l'apparition de plasmocytes atypiques ou de grandes cellules immunoblastiques. Le stade tardif réalise un lymphome, en général, à grandes cellules B immunoblastiques dérivées du clone initial. Une telle évolution vers un lymphome très agressif peut également s'observer dans les maladies des chaînes lourdes γ et μ . Cette symptomatologie, avec ses données épidémiologiques particulières, est très analogue à celle décrite sous le nom de lymphome méditerranéen ou IPSID (pour immunoproliférative small intestinal disease), contexte dans lequel la protéine pathologique sérique est loin d'être constante. Il peut alors néanmoins s'agir de maladie des chaînes lourdes α authentique (protéine de la maladie des chaînes lourdes détectable que dans un liquide digestif, ou formes non-excrétantes de la maladie des chaînes lourdes α dans lesquelles la protéine est décelable seulement au niveau de l'infiltrat cellulaire) [15, 16]. Dans beaucoup d'autres observations de lymphome méditerranéen, il n'y a pas de maladie des chaînes lourdes et la prolifération est polyclonale. Dans les rares cas d'IPSID survenant chez des malades européens, la prolifération peut être T ou B, monoclonale ou non, même lorsqu'elle est homogène au plan immunologique (absence de monoclonalité malgré des chaînes légères d'un seul type) [17, 18]. De façon exceptionnelle, la maladie des chaînes lourdes α affecte un autre territoire du système des IgA sécrétoires, avec une infiltration lymphoplasmocytaire diffuse des bronches et/ou des ganglions médiastinaux. Cette forme respiratoire s'observe dans un contexte géographique différent de celui de la forme digestive. Il faut noter que la correspondance entre le tableau clinique et la classe de maladie des chaînes lourdes n'est pas absolue, comme l'illustre un cas d'IPSID avec maladie des chaînes lourdes γ .

La confusion étant fréquente, il faut souligner qu'il n'y a aucun rapport entre les maladies des chaînes lourdes et la maladie de dépôts de chaînes lourdes (HCDD pour heavy chain deposition disease) [19]. La HCDD est une forme de maladie de Randall, caractérisée par des dépôts tissulaires, en particulier rénaux, de chaînes lourdes monoclonales sans dépôts de chaînes légères. De tels dépôts ne s'observent pas dans les maladies des chaînes lourdes, où on a seulement rapporté des cas exceptionnels d'amylose, dans lesquels la substance amyloïde n'a pas été caractérisée. Dans la HCDD, la chaîne lourde est également tronquée (délétion du premier domaine constant (CH) ou des domaines CH1, CH2 et de la région charnière), mais la région variable (V) est entière, ce qui n'est en règle pas le cas

dans les maladies des chaînes lourdes (voir ci-dessous). Elle est d'ailleurs le siège de mutations très particulières, probablement impliquées dans la formation des dépôts, comme celles des régions V des chaînes légères dans les dépôts de chaînes légères monoclonales [19-21]. Une publication a rapporté l'existence d'une protéine, décrite comme provenant d'un malade atteint de maladie des chaînes lourdes, mais complètement différente des autres, et ressemblant à une protéine de HCDD (région V complète avec des mutations dans les régions hypervariables, délétion de CH1) [22]. Le manque de détails cliniques dans cette publication ne permet pas de savoir s'il s'agit d'une maladie des chaînes lourdes ou d'une HCDD, non décrite à l'époque. Notons toutefois que, paradoxalement, une complication rénale liée aux chaînes légères peut s'observer dans la maladie des chaînes lourdes μ . Dans environ la moitié des cas, une chaîne légère monoclonale est produite, avec importante protéinurie de Bence-Jones et nous avons observé un cas de néphropathie à cylindres (« rein myélomateux ») dans ce contexte [23].

■ II - LES PROTÉINES DES MALADIES DES CHAÎNES LOURDES

Les protéines des maladies des chaînes lourdes sont particulières par l'absence de chaînes légères associées (sauf par des liaisons non-covalentes dans certains cas de maladie des chaînes lourdes μ) et par leurs délétions. Leur charge électrique est souvent hétérogène en raison de la présence de diverses formes polymériques (à l'exception de quelques rares protéines de maladie des chaînes lourdes γ que l'on trouve dans le sérum, et éventuellement les urines, sous forme de dimères et en cas d'insuffisance rénale [23]), et possiblement d'une hétérogénéité de glycosylation, avec présence de résidus osidiques qui n'existent normalement pas dans les immunoglobulines (les protéines de maladie des chaînes lourdes sont souvent fortement glycosylées). Elles sont pourtant bien monoclonales (identité de séquence en acides aminés de la protéine d'un malade donné, appartenance à une seule sous-classe de chaînes lourdes). Etant donné le nombre élevé de cas connus (des centaines), il est très significatif que toutes les protéines de maladie des chaînes lourdes α sont de sous-classe $\alpha 1$, ce qui pourrait être en rapport avec une stimulation par le même antigène (bactérien ?). La distribution en sous-classes des protéines de maladie des chaînes lourdes γ ne reflète pas celles des plasmocytes normaux, avec une surreprésentation de l'isotype $\gamma 3$.

Les protéines des maladies des chaînes lourdes sont courtes (les références sur les anomalies de structure des protéines et des gènes des maladies des chaînes lourdes peuvent être trouvées dans les articles de revue précédemment cités et dans ceux [24-26] qui leur sont spécifiquement consacrés). La possibilité de la synthèse d'une chaîne lourde entière, susceptible d'être dégradée ensuite, a été très rapidement écartée par les études de biosynthèse [27] et la démonstration de l'existence d'ARN messagers courts. Toutefois, une protéolyse limitée de la région N-terminale peut conduire à une protéine sérique légèrement plus courte que la protéine intracellulaire, avec parfois une hétérogénéité de la séquence N-terminale. On sait d'ailleurs que des chaînes lourdes entières libres (en l'absence de chaînes légères) ne peuvent pas être excrétées par les cellules. En effet, elles interagissent avec la BiP, une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique où elles sont retenues et

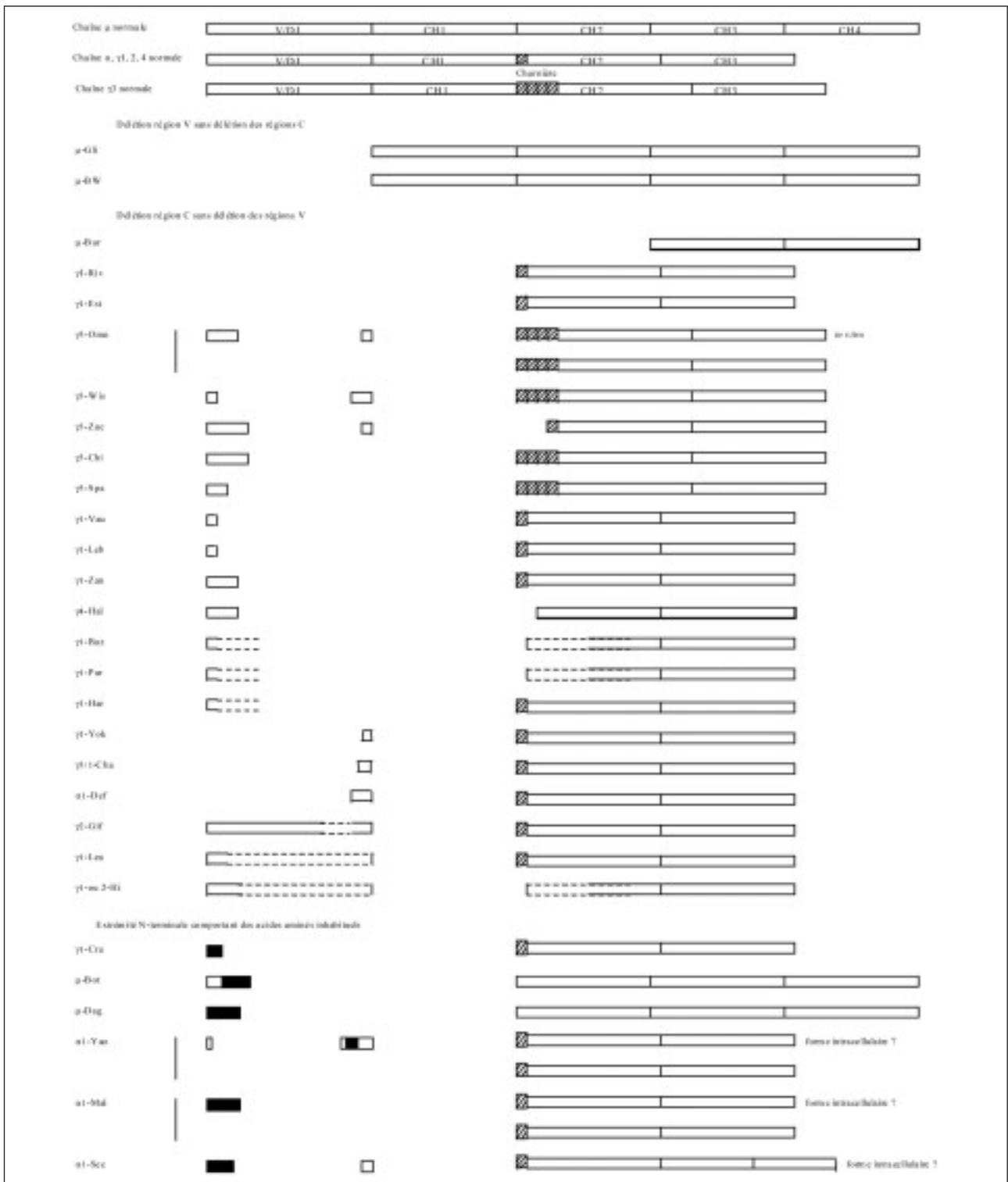


Figure 1 :

Structure des protéines de maladie des chaînes lourdes. Les structures schématisées sont celles de la protéine sérique, à l'exception de séquences de la protéine native cellulaire déterminées par des études de biosynthèse (in vitro) ou déduites de celles des ARN messagers (forme intracellulaire ?). Les rectangles hachurés en diagonale représentent les séquences correspondant à l'exon ou aux exons de la région charnière. Les pointillés représentent des séquences incomplètement déterminées. Les rectangles noirs représentent les séquences correspondant à des séquences inconnues par ailleurs.

dégradées. Le site de liaison à la BiP, principalement localisé au niveau du domaine CH1, est masqué par la chaîne légère lorsque celle-ci est associée à la chaîne lourde. Il n'y a en règle pas de synthèse de chaînes légères décelable dans les maladies des chaînes lourdes, bien qu'un gène de chaînes légères, κ plus souvent que λ , soit réarrangé. Les exceptions sont de rares cas de maladies des chaînes lourdes γ et α , où une chaîne légère apparemment non excrétée est présente au niveau cellulaire, notamment au niveau de l'immunoglobuline de membrane (habituellement constituée seulement de la chaîne lourde, parfois associée à une chaîne δ , également courte) [28], et les cas déjà mentionnés de maladies des chaînes lourdes μ avec protéine de Bence-Jones urinaire. Ces données impliquent l'absence habituelle du domaine CH1, ce qui est effectivement le cas.

Les protéines des maladies des chaînes lourdes ont une région C-terminale normale, et comportent une ou deux délétions affectant la région V, généralement le domaine CH1, et parfois le domaine CH2. Les limites de la délétion varient d'un cas à l'autre, et la séquence normale reprend au début d'une séquence codée par un exon, domaine constant ou région charnière (*figure 1*). Les délétions sont souvent internes et beaucoup de protéines commencent par un court segment V N-terminal. C'est encore plus souvent le cas lorsqu'on considère la séquence de la protéine intracellulaire connue ou déduite de celle de l'ARN messager, en raison de la possibilité de protéolyse N-terminale post-synthétique limitée. Il en résulte que la totalité de la région V peut être absente de la protéine sérique, mais qu'elle peut aussi comporter souvent un ou deux segments normaux. En cas de délétion interne de la région V, les résidus correspondants à la jonction VDJ sont constamment absents. Dans certains cas, la région V inclut ou est remplacée par des séquences anormales sans homologie avec des séquences connues chez l'homme.

Dans le cas très particulier des protéines de maladie des chaînes lourdes μ comportant une délétion de la totalité de la région V mais avec un domaine CH1 normal, il existe une synthèse de chaînes légères de taille normale, qui s'associent par des liaisons non-covalentes à la chaîne lourde intracellulaire (empêchant ainsi son interaction avec la BiP et permettant son excrétion de la cellule), et aussi à la chaîne lourde sérique (*photo 5*) [29].

■ III - GÈNES DES MALADIES DES CHAÎNES LOURDES

Les régions VDJ des gènes des maladies des chaînes lourdes comportent de nombreuses mutations dans les régions codantes et non-codantes. La situation du cas connu de maladie des chaînes lourdes μ , avec délétion limitée à la région V, est simple. La délétion d'une paire de bases dans la région V entraîne un décalage du cadre de lecture, générant des codons stop. Une délétion (comportant l'insertion d'une séquence inconnue) affecte le site d'épissage 3' de VDJ, et l'ensemble de la région VDJ est délétée au cours de l'épissage des ARN prémessagers, par épissage direct de l'exon leader (L) à l'exon CH1. Dans les autres cas, les anomalies sont complexes, variables d'un malade à l'autre, mais assez analogues (*tableau 1*). L'exon VDJ est le plus souvent en partie délété, rarement entièrement. La délétion respecte la partie 5' de V et l'extrémité 3' du segment J réarrangé. La région flanquante en 3' de J est souvent l'objet de mutations et/ou délétions. Une partie de la région switch (S) est enlevée par une ou deux délétions qui s'étendent dans l'intron, situé entre S

Tableau 1 : Gènes de maladies des chaînes lourdes

Région variable			Région switch – CH1		Reste de la région constante	
	intron L-V*	exon VDJ	flanc 3' de VDJ	5' de S	3' de S	
μ-BW	normal	délétion d'1 pb** dans V générant des codons stop	délétion de 138 pb en 3' de J4 et insertion de 51 pb (délétion du site d'épissage 3' de VDJ)	non séquencé	CH1 normal	normal
γ3-Omm	normal	délétion de 320 pb à la jonction V-J4	mutations, délétions et duplication de 37 bp dans l'intron J4-J5	normal ?	importante délétion de la région S et du CH1, réduit à son extrémité 3'	normal
γ1-Riv	délétion de 80 pb avec une insertion de 56 pb, déléant le site d'épissage en 5' de V	délétion de 280 pb avec insertion de 88 pb à la jonction V-J6	mutation du site d'épissage en 3' de J6, mutations et délétions dans l'intron suivant J6	délétion de 400 pb précédent S _μ	importante délétion de la région S et du CH1, réduit à son extrémité 3'	normal
α1-Yao	normal	délétion de 350 pb à la jonction V-J5	délétion de 330 pb avec insertion de 62 pb dans l'intron J5-J6	délétion de 10 pb	importante délétion de la région S et du CH1, réduit à son extrémité 3'	normal
α1-Mal	délétion complète de l'exon VDJ et de ses flancs 3' et 5' avec une insertion de 360 pb, suivie de mutations et de 2 autres courtes insertions			délétion de 70 pb avec une insertion de 509 pb, suivie d'une seconde délétion de 1,1 kb** devant S _μ	importante délétion de la région S à l'intron CH1-CH2	normal
α1-Sec	délétion de 17 pb en 5' de V, affectant le site d'épissage 5' de V	délétion de 330 pb avec insertion de 289 pb à la jonction V-J5	non séquencé	délétion de 1,3 kb avec insertion de 57 pb	importante délétion de la région S à l'intron CH1-CH2	délétion de 309 pb en 3' de CH3 affectant le site de polyadénylation de la chaîne sécrétée

* segments : L : leader (peptide signal) ; V : variable ; D : diversité ; J : jonction ; S : switch ; CH : exon constant de la chaîne lourde.

** pb : paire de bases ; kb : kilobase.

et CH1, et dans l'exon CH1 qui est délété en partie (laissant intact son extrêmité 3'), ou entièrement. L'insertion de séquences d'ADN inconnues, comportant souvent des répétitions directes ou inversées, apparaît constante et localisée au niveau de régions affectées par des mutations ou délétions.

Ces anomalies modifient les sites d'épissage. Il en résulte que des séquences, présentes au niveau génomique, peuvent être excisées au cours de la maturation des ARN messagers, comme la fin de l'exon CH1, certaines insertions de séquences inconnues même lorsqu'elles font partie d'exons (*figure 2*). De plus, des séquences inconnues, présentes dans les transcrits murs, peuvent être absentes de la protéine sérique pour les raisons de protéolyse déjà mentionnées.

Une observation a un intérêt particulier. Il s'agissait d'un cas de maladie des chaînes lourdes α non-excrétante. Outre les anomalies usuelles, le gène correspondant comportait une délétion de la région flanquante en 3' du dernier exon CH qui enlevait le site de polyadé-

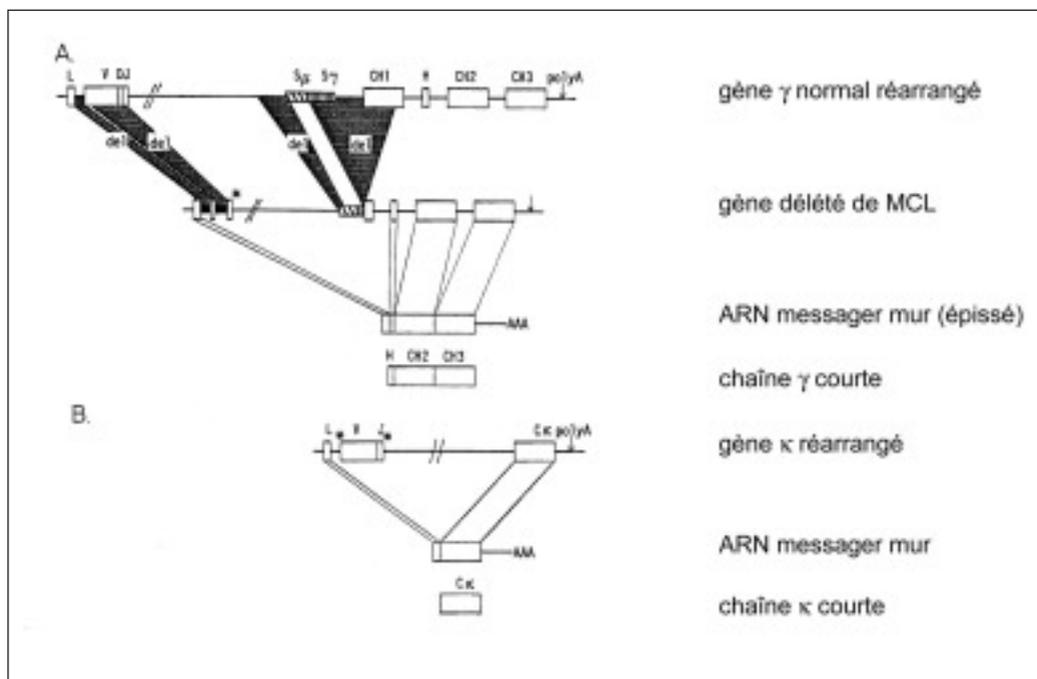


Figure 2 :

Représentation schématique des anomalies des gènes γ (A) et κ (B) exprimés dans un cas de maladie des chaînes lourdes γ (Riv) et de leur épissage. Les transcrits primaires ne sont pas figurés, et seuls apparaissent les ARN messagers matures, après épissage. Noter que, dans ce cas, les séquences anormales (rectangles noirs) insérées au niveau de deux délétions sont excisées au moment de l'épissage des ARN pré-messagers et sont absentes du messenger mature. C'est aussi le cas du petit exon résiduel correspondant à l'extrémité 3' de CH1 (la délétion du site accepteur d'épissage normalement situé à l'extrémité 5' de CH1 conduit à l'utilisation du site accepteur de l'exon de la région charnière (H pour hinge). Les délétions par rapport au gène normal (del) sont représentées par les surfaces ombrées. En ce qui concerne le gène κ productif, les anomalies des sites d'épissage de l'exon VJ réarrangé entraînent un épissage direct du peptide signal sur l'exon constant Ck. Il en résulte un ARN messenger fonctionnel codant la région Ck, comme dans un autre cas de maladie des chaînes lourdes γ (32) et le cas séquencé de maladie des chaînes lourdes α non-excrétante (16, 17). Des anomalies de la traduction expliquent probablement le défaut de production de ce fragment (32).

nylation de la chaîne lourde secrétée, ce qui conduisait à une production exclusive de la forme membranaire [30].

Le gène de chaînes légères réarrangé a été étudié dans deux cas de maladie des chaînes lourdes γ [31, 32]. De façon frappante, les anomalies rappellent celles des gènes de chaînes lourdes. Il existait des mutations dans l'exon VJ (et une délétion, et deux insertions dans la région flanquante 3' de J dans un cas) dont certaines altéraient les sites d'épissage. L'ARN messenger mur était réduit au transcrit de l'exon C (*figure 2*). Un déficit de la traduction de ce fragment C explique l'absence de chaînes légères décelables dans ces cas. Dans l'ensemble, le fait que les anomalies des gènes des chaînes lourdes et légères soient analogues et focalisées au niveau de régions où ont normalement lieu des réarrangements (jonctions VDJ ou VJ, régions S) et dans les régions voisines, suggèrent qu'elles sont générées au cours des réarrangements qui accompagnent la maturation des gènes d'immunoglobulines. Néanmoins, le mécanisme exact et l'origine des séquences inconnues restent mystérieux.

■ IV - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Le diagnostic biologique des maladies des chaînes lourdes repose sur l'analyse immuno-chimique du sérum et éventuellement de l'urine, parfois sur l'étude en immunofluorescence de la prolifération cellulaire. Dans quelques cas de maladie des chaînes lourdes α , la protéine pathologique n'était pas décelable dans le sérum, mais l'était dans le liquide jéjunal ou gastrique. Le diagnostic s'appuie sur la démonstration d'une chaîne lourde dépourvue de chaînes légères, confirmée par celle de la taille anormalement courte de la chaîne lourde. Les protéines de maladie des chaînes lourdes sont souvent mal détectables sur l'électrophorèse des protéines sériques. La présence d'un pic est très rare (surtout pour la maladie des chaînes lourdes γ), en raison de l'habituelle hétérogénéité de charge des protéines pathologiques. C'est donc une tache hétérogène qui s'observe habituellement, à condition que la concentration sérique de la protéine soit suffisante, ce qui est loin d'être toujours le cas. En effet, chez certains malades, elle reste de l'ordre de 1 ou quelques mg/mL. De plus, la migration des protéines de maladie des chaînes lourdes peut être très inhabituelle pour une immunoglobuline, par exemple en α_1 ou α_2 -globulines (*photo 1*) (notamment beaucoup de protéines de maladie des chaînes lourdes μ), ce qui ne facilite évidemment pas leur détection électrophorétique.

L'analyse immunoélectrophorétique ou l'immunofixation constitue donc une étape diagnostique essentielle. Ces techniques permettent la mise en évidence d'une immunoglobuline révélée par un antisérum anti-chaîne lourde et pas par les antisérums anti-kappa et anti-lambda. Comme déjà souligné, la ligne de précipitation de la protéine anormale est souvent hétérogène (*photo 2*), s'étendant, par exemple, de l'albumine à la région γ lente pour des protéines de maladie des chaînes lourdes α abondantes. En immunoélectrophorèse, un signe évocateur est l'existence d'un éperon des immunoglobulines normales résiduelles de l'isotype correspondant à la protéine de la maladie des chaînes lourdes. En effet, les antisérums anti-immunoglobulines polyvalents ou monospécifiques d'une chaîne lourde peuvent contenir des anticorps réagissant avec des épitopes portés par la ou les

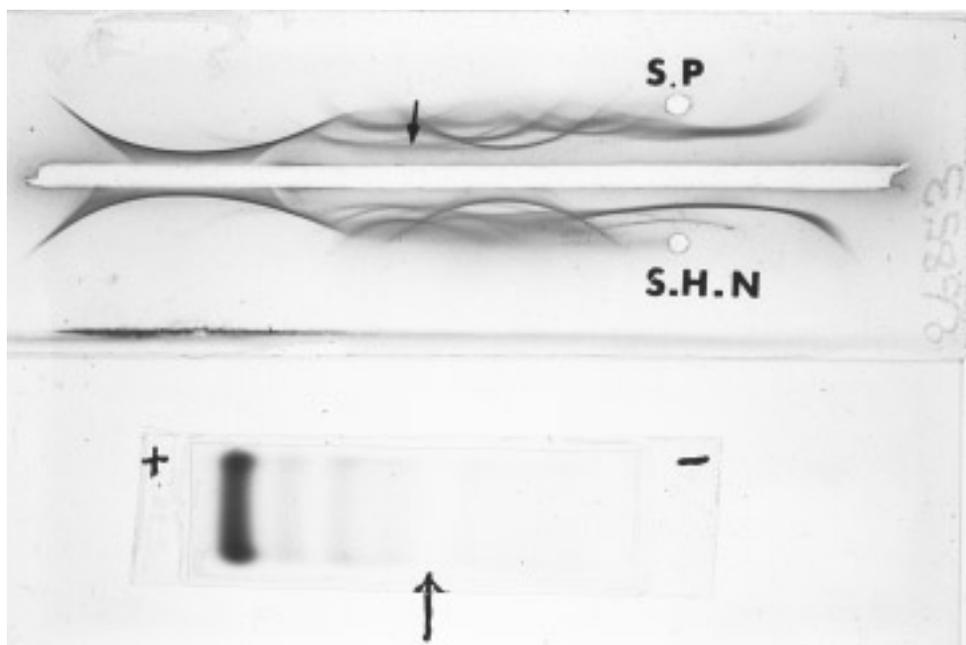


Photo 1 :

Immunoélectrophorèse en agarose dans un cas de maladie des chaînes lourdes α (SP pour sérum pathologique). La protéine anormale (flèche), bien reconnue par un antisérum anti- α (non montré), n'est pas identifiable sur une immunoélectrophorèse révélée par un antisérum anti-protéines du sérum humain normal, qui montre essentiellement une nette diminution de l'albumine et des immunoglobulines normales. L'électrophorèse était normale.

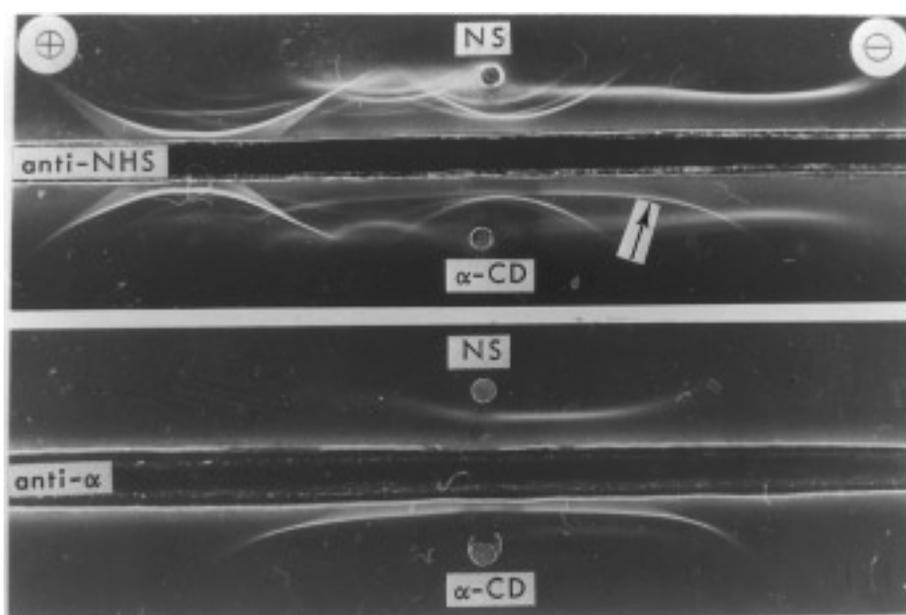


Photo 2 :

Immunoélectrophorèse du sérum dans un cas de maladie des chaînes lourdes α (α -CD), révélation par un antisérum anti-sérum humain normal polyvalent (anti-NHS) et un antisérum anti- α . Noter la ligne de précipitation très hétérogène de la protéine anormale (flèche), qui ne réagissait pas avec des antisérums anti- κ et anti- λ (non montré).

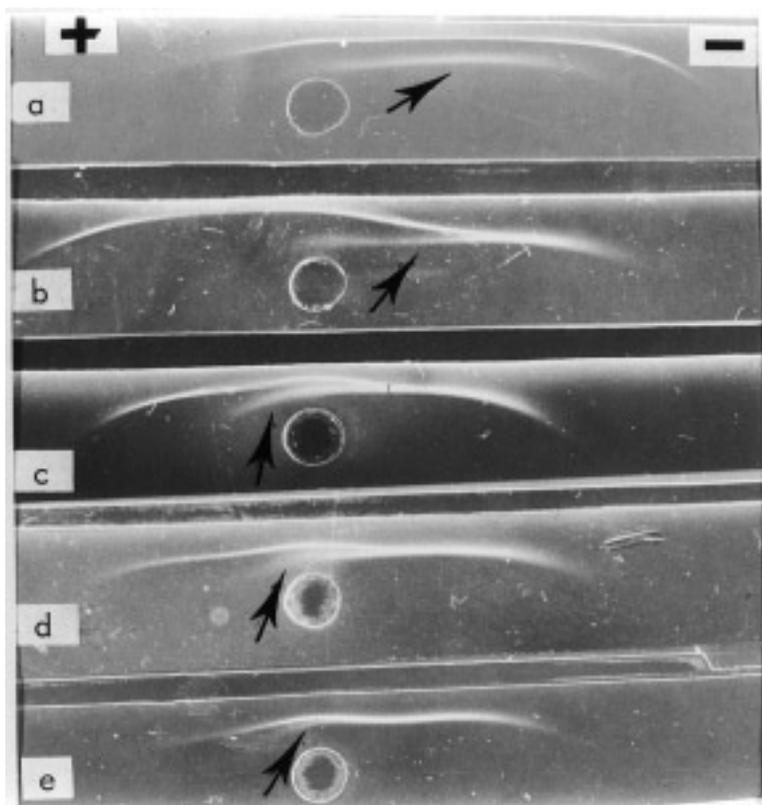


Photo 3 :

Immunoélectrophorèse du sérum dans cinq cas de maladie des chaînes lourdes α (a - e). Révélation par un antisérum anti- α . Les flèches montrent l'éperon des IgA normales résiduelles sur la protéine pathologique ou, ce qui a la même signification, la ligne de précipitation des IgA normales en dedans de celle de la protéine de maladie des chaînes lourdes (a).

région(s) déléte(e)s de la protéine pathologique. La diffusion de ces anticorps n'est donc pas arrêtée par la protéine de la maladie des chaînes lourdes. Ces anticorps peuvent en traverser la ligne de précipitation et réagir avec l'immunoglobuline normale, entraînant la formation d'un éperon (*photo 3*). Ce phénomène n'est toutefois pas spécifique. Par exemple, les IgG polyclonales éperonnent sur une IgG monoclonale d'une sous-classe peu abondante, telle qu'une IgG4, si l'antisérum anti- γ contient des anticorps dirigés contre des épitopes des autres sous-classes comme l'IgG1.

L'absence de réactivité avec les antisérums anti-chaînes légères par des techniques de précipitation, immunoélectrophorèse ou immunofixation, est un (bon) argument, mais pas une preuve. Il est, en effet, connu depuis longtemps que les chaînes légères de certaines immunoglobulines monoclonales, notamment IgA λ , ne sont pas ou très mal précipitées par les antisérums anti-chaînes légères. Dans le passé, certains antisérums anti- α contenant des anticorps réagissant avec des épitopes conformationnels du Fab α se sont avérés utiles pour le diagnostic de maladie des chaînes lourdes α . Une technique élégante (*photo 4*), l'immuno-sélection, consiste à incorporer dans un gel d'immunoélectrophorèse (ou d'immunodiffusion d'Ouchterlony) des antisérums anti-chaînes légères. Les immunoglobulines entières sont « trappées » par ces antisérums, et seules migrent et sont révélées par les antisérums anti-chaînes lourdes les protéines dépourvues de chaînes légères [32]. Personnellement, nous

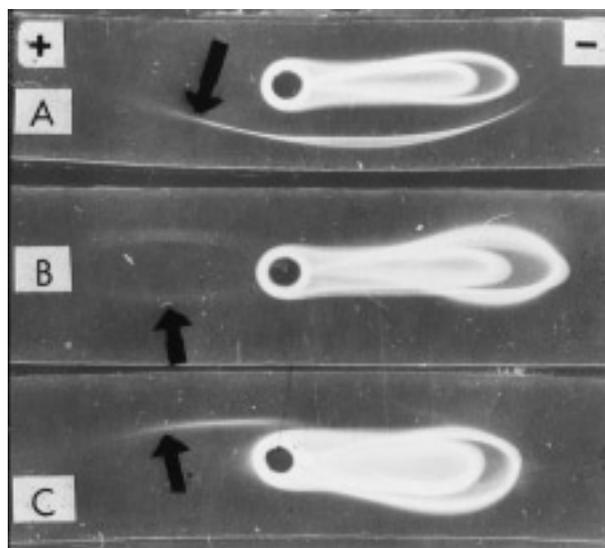


Photo 4 :

Etude en immunosélection de trois cas de maladie des chaînes lourdes α , dont deux (B et C) où la protéine anormale est peu abondante. Immunoélectrophorèse, révélation par un antisérum anti- α . Les IgA normales ne migrent pas, car elles réagissent avec les antisérums anti-chaînes légères contenus dans la gélose (grosses images de « rocket »), au contraire des protéines de maladie des chaînes lourdes (flèches).

utilisons une technique de western blot, qui ne fait pas appel à une réaction de précipitation et n'en comporte donc pas les inconvénients. Le sérum est soumis à une électrophorèse à haute résolution en couche mince d'agarose, suivie d'un transfert sur nitrocellulose et d'une révélation par des antisérums anti-chaînes d'immunoglobulines monospécifiques, couplés à une enzyme [33]. Outre l'avantage de l'absence des difficultés d'une réaction de précipitation, cette technique est moins onéreuse et beaucoup plus sensible et discriminative que l'immunofixation. Son inconvénient est qu'elle n'est pas commercialisée. Il faut noter que la présence d'une immunoglobuline monoclonale entière dans le même sérum n'exclut pas le diagnostic de maladie des chaînes lourdes car l'association a été observée dans plusieurs cas.

La confirmation formelle du diagnostic passe par la démonstration de ce que la protéine est délétée. Classiquement, ceci nécessitait la purification de la protéine et son étude par des méthodes physicochimiques, ce qui est évidemment long et onéreux, et impossible quand la protéine est peu abondante. Nous utilisons donc également une technique d'immunoblot. Le sérum est fractionné par électrophorèse en gel de polyacrylamide-sodium dodécyl sulfate (qui permet un fractionnement des protéines en fonction de leur masse moléculaire), en conditions réductrices. Un transfert sur nitrocellulose, suivi d'une révélation par des antisérums anti-chaînes lourdes, couplés à une enzyme, permet d'évaluer la masse moléculaire de la protéine anormale par rapport à celle de standards et d'immunoglobulines normales inclus dans le même gel. L'existence, pour les IgG, d'anticorps monoclonaux spécifiques de domaines permet également de déceler la délétion de l'un d'eux par western blot après simple électrophorèse en agarose [19].

En dehors du sérum, rappelons l'intérêt de l'étude immunochimique d'un liquide digestif dans les rares cas de maladie des chaînes lourdes α où la protéine n'est pas décelable dans le sérum, de même que l'intérêt de l'étude immuno- ou immunohistochimique de la

prolifération. Cette étude visant à mettre en évidence la chaîne lourde dans le cytoplasme et/ou sur la membrane plasmique, et à démontrer l'absence habituelle de chaînes légères, implique l'utilisation de conjugués de très bonne qualité. Elle peut être utile dans tous les cas et est, bien sûr, essentielle dans les formes non-excrétantes. On peut également utiliser les cellules pour des études moléculaires, mais elles ne sont pas du domaine de la pratique courante. Notons qu'en cas de transformation en lymphome agressif, les cellules ne sont généralement positives qu'en immunofluorescence de membrane et ne sécrètent pas la protéine, qui peut voir sa concentration sérique diminuer, voire n'être plus décelable en cas d'envahissement lymphomateux généralisé. Le diagnostic peut donc être difficile si le malade est vu pour la première fois à ce stade.

En ce qui concerne les urines, rappelons la rare possibilité de la présence de la protéine pathologique, et surtout celle d'une protéine de Bence Jones abondante dans environ la moitié des cas de maladie des chaînes lourdes μ (photos 5 et 6).

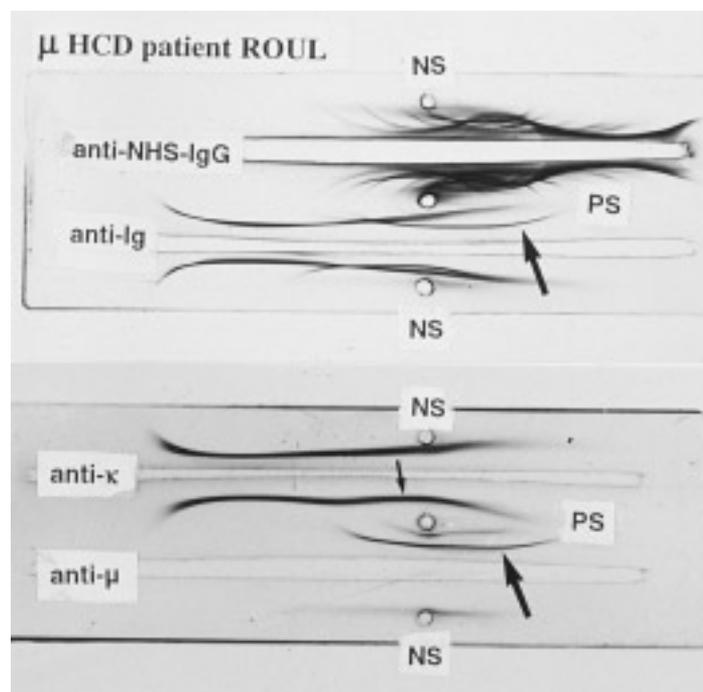


Photo 5 :

Etude du sérum dans un cas de maladie des chaînes lourdes μ avec délétion de la région V et pas du CHI. Haut : immunoélectrophorèse révélée par un antisérum anti-protéines du sérum humain normal, épuisé par des IgG normales (anti-NHS-IgG) et un antisérum anti-immunoglobulines polyvalent (noter que la protéine de maladie des chaînes lourdes, de mobilité rapide, est visible après révélation par l'anti-immunoglobulines, mais pas par l'anti-NHS-IgG, au contraire de l'IgM du sérum normal (NS). Bas : révélation par des antisérums anti- μ et anti- κ . Noter : 1) avec l'antisérum anti- μ , il existe une ligne de précipitation à l'intérieur de celle de la protéine de maladie des chaînes lourdes.

Il ne s'agit pas d'IgM normale, mais de polymères de poids moléculaire élevé de la chaîne μ (les antisérums anti- μ contiennent souvent des anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques des formes polymériques) ; 2) l'antisérum anti- κ (et pas l'anti- λ , non montré) montre la présence de chaînes κ (petite flèche) au niveau d'une partie de la ligne de précipitation de la chaîne μ (grande flèche). Les études complémentaires ont montré l'existence de liaisons non-covalentes entre les chaînes κ et une partie des chaînes μ .

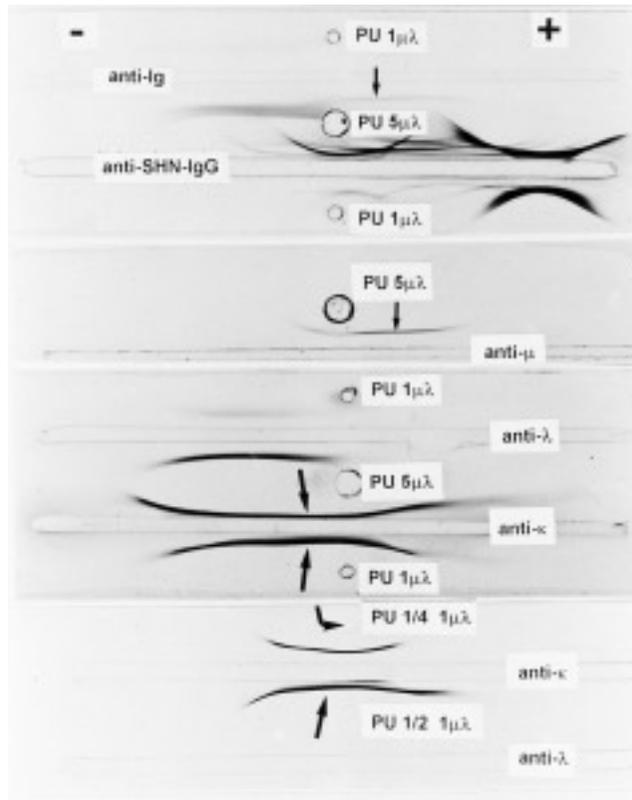


Photo 6 :

Urines du même malade que le sérum de la photo 5. Dépôts de 1 et 5 µl d'urines. Les antisérums anti-Ig et anti-SHN-IgG ne contiennent pas d'anticorps réagissant avec les chaînes légères libres, et révèlent seulement la protéine de maladie des chaînes lourdes (petite flèche dans les immunoélectrophorèses du haut). L'antisérum anti-κ révèle l'abondante protéine de Bence-Jones, bien visible dans l'échantillon dilué. A noter la présence de chaînes légères libres polyclonales (visibles ici avec l'antisérum anti-λ), témoin de l'atteinte tubulaire de ce malade qui avait une néphropathie à cylindres de chaînes légères (23).

Au total, le diagnostic biologique de maladie des chaînes lourdes n'est pas techniquement très complexe, mais il comporte de nombreux pièges qui peuvent le rendre fort difficile pour un œil non averti. Des protéines de maladie des chaînes lourdes, présentes en faible concentration sont facilement méconnues, et le point important est, peut-être, alors d'y penser en fonction du contexte clinique. Bien évidemment, ceci suppose que le prélèvement soit accompagné de renseignements cliniques (et nous ne faisons pas d'étude immuno-chimique en leur absence), mais ceci est un tout autre débat.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- FRANKLIN E.C., MELTZER M., GUGGENHEIM F., LOWENSTEIN J., An unusual micro-gammaglobulin in the serum and urine of a patient. *Fed. Proc.* 1963 ; 22 : 624.
- 2- FRANKLIN E.C., LOWENSTEIN J., BIGELOW B., MELTZER M., Heavy chain disease. A new disorder of serum γ globulins. *Am. J. Med.* 1964 ; 37 : 332-339.
- 3- SELIGMANN M., DANON F., HUREZ D., MIHAESCO E., PREUD'HOMME J.L., Alpha chain disease : a new immunoglobulin abnormality. *Science* 1968 ; 162 : 1396-1399.
- 4- FORTE F.A., PRELLI F., YOUNG W.J., JERRY L.M., KOCHWA S., FRANKLIN E.C., Heavy chain disease of the μ (γ M) type : report of the first case. *Blood* 1970 ; 36 : 137-146.
- 5- RAMBAUD J.C., SELIGMANN M. Alpha chain disease. *Clin. Gastroenterol.* 1976 ; 5 : 341-357.
- 6- SELIGMANN M., MIHAESCO E., PREUD'HOMME J.L., DANON F., BROUET J.C., Heavy chain diseases : current findings and concepts. *Immunol. Rev.* 1979 ; 487 : 145-167.
- 7- FERMAND J.P., BROUET J.C., DANON F., SELIGMANN M., Gamma heavy chain « disease » : heterogeneity of the clinicopathologic features. Report of 16 cases and review of the literature. *Medicine* 1989 ; 68 : 321-335.
- 8- SELIGMANN M., Maladies des chaînes lourdes. *Rev. Prat.* 1993 ; 43 : 317-320.
- 9- MARTIN I.G., ALDOORI M.I., Immunoproliferative small intestinal disease : Mediterranean lymphoma and alpha heavy chain disease. *Br. J. Surgery* 1994 ; 81 : 20-24.
- 10- RAMBAUD J.C., NOVIS B., MANOUSOS O., BROUET J., BEN AYED F., Maladie des chaînes. *Hepato-Gastro.* 1996 ; 3 : 189-199.
- 11- FERMAND J.P., BROUET J.C., Heavy-chain diseases. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 1999 ; 13 : 1281-1294.
- 12- FINE K.D., STONE M.J., Alpha-heavy chain disease, Mediterranean lymphoma, and immunoproliferative small intestinal disease : a review of clinicopathological features, pathogenesis, and differential diagnostic. *Am. J. Gastroenterol.* 1999 ; 94 : 1139-1152.
- 13- HUDNALL S.D., ALPERIN J.B., PETERSEN J.R., Composite nodular lymphocyte-predominance Hodgkin disease and gamma-heavy-chain disease : a case report and review of the literature. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2001 ; 125 : 803-807.
- 14- BERGER R., BERNHEIM A., TSAPIS A., BROUET J.C., SELIGMANN M., Cytogenetic studies in four cases of alpha chain disease. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1986 ; 22 : 219-223.

- 15- RAMBAUD J.C., GALIAN A., DANON F., PREUD'HOMME J.L., BRANDTZAEG P., WASSEF M., LE CARRER M., MEHAUT M., VOINCHET0., CHAPMAN A., Alpha chain disease without qualitative serum IgA abnormality : Report of two cases including a "non-secretory" form. *Cancer* 1983 ; 51 : 686-693.
- 16- MATUCHANSKY C., COGNE M., LEMAIRE M., BABIN P., TOUCHARD G., CHAMMARET S., PREUD'HOMME J.L., Non-secretory alpha-chain disease with immunoproliferative small intestinal disease. *N. Engl. J. Med.* 1989 ; 320 : 1534-1539.
- 17- MATUCHANSKY C., TOUCHARD G., BABIN P., LEMAIRE M., COGNE M., PREUD'HOMME J.L., Diffuse small intestinal lymphoid infiltration in non-immunodeficient adults from Western Europe. *Gastroenterology* 1988 ; 95 : 470-477.
- 18- CARBONNEL F., D'ALMAGNE H., LAVERGNE A., MATUCHANSKY C., BROUET J.C., SIGAUX F., BEAUGERIE L., NEMETH J., COFFIN B., COSNES J., GENDRE J.P., RAMBAUD J.C., The clinicopathological features of extensive intestinal CD4 T cell infiltration. *Gut* 1999 ; 45 : 638-639.
- 19- AUCOUTURIER P., KHAMLICH A.A., TOUCHARD G., JUSTRABO E., COGNE M., CHAUFFERT B., MARTIN F., PREUD'HOMME J.L., Heavy chain deposition disease. *N. Engl. J. Med.* 1993 ; 329 : 1389-1393.
- 20- PREUD'HOMME J.L., AUCOUTURIER P., TOUCHARD G., STRIKER L., KHAMLICH A.A., ROCCA A., DENOROY L., COGNE M., Monoclonal immunoglobulin deposition disease (Randall type). Relationship with structural abnormalities of immunoglobulin chains. *Kidney Internat.* 1994 ; 46 : 965-972.
- 21- KHAMLICH A.A., AUCOUTURIER P., PREUD'HOMME J.L., COGNE M., Structure of abnormal heavy chains in human heavy chain deposition disease. *Eur. J. Biochem.* 1995 ; 229 : 54-60.
- 22- PRELLI F., FRANGIONE B., Franklin's disease : Igy2 H chain mutant *Bur. J. Immunol.* 1992 ; 148 : 949-952.
- 23- PREUD'HOMME J.L., BAUWENS M., DUMONT G., GOUJON J.M., DREYFUS B., TOUCHARD G., Cast nephropathy in μ heavy chain disease. *Clin. Nephrol.* 1997 ; 48 : 118-121.
- 24- ROSEN S.M., BUXBAUM J.N., FRANGIONE B., The structure of immunoglobulins and their genes, DNA, rearrangement and B cell differentiation, molecular anomalies of some monoclonal immunoglobulins. *Sem. Oncol.* 1986 ; 13 : 260-274.
- 25- COGNE M., PREUD'HOMME J.L., GUGLIELMI P., Immunoglobulin gene alterations in human heavy chain diseases. *Res. Immunol.* 1989 ; 140 : 487-502.
- 26- COGNE M., SILVAIN C., KHAMLICH A.A., PREUD'HOMME J.L., Structurally abnormal immunoglobulins in human immunoproliferative disorders. *Blood* 1992 ; 79 : 2181-2195.

- 27- BUXBAUM J.N., PREUD'HOMME J.L., Alpha and gamma heavy chain disease in man : intracellular origin of the aberrant polypeptides. *J. Immunol.* 1972 ; 109 : 1131-1137.
- 28- PREUD'HOMME J.L., BROUET J.C., SELIGMANN M., Cellular immunoglobulins in human γ and α -chain diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 1979 ; 37 : 283-291.
- 29- COGNE M., AUCOUTURIER P., BRIZARD A., DREYFUS B., DUARTE F., PREUD'HOMME J.L., Complete variable region deletion in a μ heavy chain disease protein (ROUL). Correlation with light chain secretion. *Leukemia Res.* 1993 ; 17 : 527-532.
- 30- COGNE M., PREUD'HOMME J.L., Gene deletions force nonsecretory α -chain disease plasma cells to produce membrane α -chains only. *J. Immunol.* 1990 ; 145 : 2455-2458.
- 31- COGNE M., BAKHSHI A., KORSMEYER S.J., GUGLIELMI P., Gene mutations and alternate RNA splicing result in truncated Ig L chains in human γ H chain disease. *J. Immunol.* 1988 ; 141 : 1738-1744.
- 32- TENG M.H., ROSEN S., GORNY M.K, ALEXANDER A., BUXBAUM J., Gamma heavy chain disease in man : independant structural abnormalities and reduced transcription of a functionally rearranged lambda-L chain gene result in the absence of L-chains. *Blood Cells Mol. Dis.* 2000 ; 26 : 177-185.
- 33- DOE W., DANON F., SELIGMANN M., Immunodiagnosis of alpha chain disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1979 ; 36 : 189-197.
- 34- BEAUME A., BRIZARD A., DREYFUS B., PREUD'HOMME J.L., High incidence of serum monoclonal immunoglobulins detected by a sensitive immunoblotting technique in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1994 ; 84 : 1216-1219.

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--|--|
| N° 1 : <i>HÉMATOLOGIE</i> | N° 16 : <i>IMMUNO-ALLERGIE (2)</i> |
| N° 2 : <i>IMMUNOANALYSE</i> | N° 17 : <i>VIRUS DES HÉPATITES</i>
<i>A (VHA) et E (VHE)</i> |
| N° 3 : <i>PARASITOLOGIE</i> | N° 18 : <i>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</i>
<i>TOME II</i> |
| N° 4 : <i>BACTÉRIOLOGIE</i> | N° 19 : <i>VAGINITES ET VAGINOSES</i> |
| N° 5 : <i>HORMONOLOGIE</i>
<i>GAZOMÉTRIE</i> | N° 20 : <i>HÉMOSTASE ET THROMBOSE</i> |
| N° 6 : <i>G.B.E.A.</i> | N° 21 : <i>VIRUS DES HÉPATITES</i>
<i>B (VHB), DELTA (VDH),</i>
<i>C (VHC), AUTRES</i> |
| N° 7 : <i>IMMUNO-ALLERGIE (1)</i> | N° 22 : <i>SYNDROME</i>
<i>DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES</i> |
| N° 8 : <i>HÉMOGLOBINES GLYQUÉES</i>
<i>LIPIDES</i> | N° 23 : <i>PARASITES SANGUINS</i> |
| N° 9 : <i>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</i>
<i>TOME I</i> | N° 24 : <i>BIOCHIMIE PÉDIATRIQUE</i> |
| N° 10 : <i>HÉMATOLOGIE</i>
<i>CAS ILLUSTRÉS</i> | N° 25 : <i>LES MOISSISSURES</i>
<i>D'INTÉRÊT MÉDICAL</i> |
| N° 11 : <i>AMIBES ET FLAGELLÉS</i>
<i>INTESTINAUX</i> | N° 26 : <i>IMMUNO-HÉMATOLOGIE</i>
<i>ET GROUPES SANGUINS</i> |
| N° 12 : <i>LES MALADIES A PRIONS</i> | N° 27 : <i>LES MARQUEURS</i>
<i>CARDIAQUES</i> |
| N° 13 : <i>AUTOIMMUNITÉ</i>
<i>ET AUTOANTICORPS</i> | |
| N° 14 : <i>L'EXPLORATION</i>
<i>DE LA THYROÏDE</i> | |
| N° 15 : <i>DÉPISTAGE</i>
<i>DE LA TRISOMIE 21</i> | |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m. privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A., et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes. (S.d.B., S.N.M.B., et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privés et hospitaliers, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros, ou épuisés en version papier, seront disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net à partir de 2002.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6 500 exemplaires.