

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en science
de la nature et de la vie

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

*Intérêt de la technique d'immunotypage par
immunosoustraction dans le diagnostic des
gammopathies monoclonales*

Présenté par : - Rami Annissa
- Ziane Karima

Soutenu le : 30/09/2015

devant le jury :

- | | |
|---|---------------------|
| - Mr. CHIBAH A., Maître assistant | Encadreur |
| - Mr. HOUALI K., Professeur | Président |
| - Mme. BENZAOUZ K., Maître assistante | Examinatrice |
| - Mr. TAZDAIT D., Maître de conférences | Examineur |

Année Universitaire : 2014 – 2015

Remerciements



Nous tenons tout d'abord à remercier Mr CHIBAH AMAR, chargé de cours à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, qui a bien voulu accepter de nous prendre en charge pour réaliser ce modeste travail dont le mérite lui revient grâce à ses conseils précieux et sa gratitude.

Nous remercions vivement les membres de notre jury qui nous feront l'honneur de juger et enrichir notre travail par leurs propositions.

Nous n'oublierons pas de remercier tous les membres du laboratoire de Biochimie de CHU de Tizi-Ouzou essentiellement Dr. Toudert Amar pour l'aide permanente qu'il nous a apporté tout au long de notre pratique et Dr Dahmani qui nous a permis d'accéder au laboratoire.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Avec l'aide du tout Puissant, Qui nous a inspiré, Qui nous a guidé dans le bon chemin, nous avons pu réaliser ce modeste travail que je dédie:

✚ A mes chers parents sur qui j'ai pu compter et me ressourcer d'affection et de bénédictions durant toute ma vie ;

✚ A mes trois soeurs, Farida, Djamila, Hassina et mes trois frères, Ferhat, Lounes et Hamidouche qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé ;

✚ A mon encadreur Mr CHIBAH AMAR qui n'a pas cessé de m'encourager sagement aux moments de détresse ;

✚ A mes chers amis : Ouahiba, zina, Djamila, Samira, Tassadit, Sadjia, Nouara et autres.

A toutes les personnes que j'aime.

Annissa

Dédicace

Avec l'aide du tout Puissant, Qui nous a inspiré, Qui nous a guidé dans le bon chemin, nous avons pu réaliser ce modeste travail que je dédie:

✚ A mes chers parents sur qui j'ai pu compter et me ressourcer d'affection et de bénédictions durant toute ma vie ;

✚ A mes très chers frères et sœurs qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé ;

✚ A mon encadreur Mr CHIBAH AMAR qui n'a pas cessé de m'encourager sagement aux moments de détresse ;

✚ A tous mes amis (es) sans exception et toute la promotion de Biochimie appliquée en particulier et tous mes proches.

A toutes les personnes que j'aime.

Karima

Résumé :

Les gammopathies monoclonales sont des anomalies fréquentes qui peuvent correspondre à la fois à des pathologies bénignes et malignes, et qui augmentent avec l'âge. Ces affections sont caractérisées par la prolifération d'un seul clone de cellules plasmiques produisant une immunoglobuline monoclonale. La présence de l'Ig monoclonale peut être démontrée par l'électrophorèse des protéines sériques du patient et identifiée par immunosoustraction par électrophorèse capillaire. Dans les gammopathies monoclonales malignes, la protéinurie de Bence Jones peut être mise en évidence dans les urines concentrées. Dans notre étude, 51 patients ont été pris en charge pour le dépistage des gammopathies monoclonales. Les résultats obtenus ont permis de confirmer la prédominance masculine, la forte fréquence des myélomes multiples à IgG à chaînes légères kappa sur les autres Ig et une fréquence élevée des profils oligoclonaux. La protéinurie de Bence Jones est révélée chez cinq patients. L'électrophorèse capillaire représente une avancée technologique majeure pour l'exploration des Ig sériques avec une très bonne reproductibilité, une rapidité d'exécution et une sécurité par son automatisation complète. L'immunosoustraction présente un intérêt majeur dans le diagnostic des gammopathies monoclonales.

Mots clés : Gammopathies monoclonales, électrophorèse capillaire, immunosoustraction.

Abstract :

The monoclonal gammopathies are frequent anomalies which can correspond at the same time to pathologies benign and malignant, and which increase with the age. These affections are characterized by the proliferation of a single clone of plasma cells producing a monoclonal immunoglobulin. The presence of monoclonal immunoglobulin can be demonstrated by the serum protein electrophoresis of the patient and identified by immunosubstraction by capillary electrophoresis. In the malignant monoclonal gammopathie, the Bence Jones protein can be highlighted in the concentrated urines. In our study, 51 patients were taken care for the detection of the monoclonal gammopathies. The results obtained have confirmed the male prevalence, the strong frequency of the multiple myéloma with IgG with light chains kappa on other Ig and a high frequency of the oligoclonal profiles. The Bence Jones protein is found in five patients. The capillary electrophoresis represents a major technological advance in the exploration of serum Ig with very good reproductibility, speed of execution and security by its complete automation. The immunosubstraction is of major interest in the diagnosis of monoclonal gammopathies.

Keys words: Monoclonal gammopathies, capillary electrophoresis, immunosubstraction.

Liste des abréviations

Ac :	Anticorps
Ag :	Antigène
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
BCR :	B Cell Receptor
CLL :	Chaîne légère libre
CM :	Composant monoclonal
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
CZE :	<i>Capillary zone electrophoresis</i> / Electrophorèse capillaire de zone
EC :	Electrophorèse capillaire
EPS :	Electrophorèse des protéines sériques
EPU :	Electrophorèse des protéines urinaires
Fab :	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc :	Fragment cristallisable
FNS :	Formule numération sanguine
GM :	Gammopathie monoclonale
IEP :	Immunoélectrophorèse
Hb :	Hémoglobine
HDL :	<i>High density lipoprotein</i>
HGF :	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HPLC :	<i>High-performance liquid chromatography</i> / chromatographie liquide haute performance

IF :	Immunofixation
Ig :	Immunoglobuline
Igm :	Immunoglobuline monoclonale
IL :	Interleukine
IR :	Insuffisance rénale
IS :	Immunosoustraction
IT :	Immunotypage
LB :	Lymphocyte B
LDL :	<i>Low density lipoprotein</i> / lipoprotéine à basse densité
MGUS :	<i>Monoclonal gammopathy of undetermined significance</i> /gammapathie monoclonale de signification indéterminée
MCL :	Maladie des chaînes lourdes
Mip-1α :	<i>Macrophage inflammatory protein -1α</i>
MGW :	Macroglobulinémie de Waldenström
MM :	Myélome multiple
MO :	Moelle osseuse
PBJ :	Protéinurie de Bence Jones
RANK :	Recepteur activateur de nucléaire Kappa B
RANKL :	Ligand de récepteur activateur de nucléaire Kappa B
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
TNF :	<i>Tumor necrosis factor</i>
TP :	Taux de protides
VS :	Vitesse de sédimentation

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'une immunoglobuline	3
Figure 2 : Frottis médullaire montrant des plasmocytes normaux	7
Figure 3 : plasmocytes dystrophiques avec volumineux nucléoles	7
Figure 4 : Schéma de principe d'un montage d'électrophorèse capillaire	17
Figure 5 : Représentation du flux électro-osmotique dans un capillaire	21
Figure 6 : Principe de migration de l'électrophorèse capillaire de zone	22
Figure 7 : Profil d'électrophorèse des protéines sériques obtenu par Capillarys	26
Figure 8 : Schéma illustrant la démarche diagnostique dans l'exploration d'une Igm dans le sérum	34
Figure 9 : Schéma illustrant la démarche diagnostique dans l'exploration d'une Igm dans les urines	35
Figure 10 : Capillarys 2 Flex Piercing	38
Figure 11 : Exemple de tracé électrophorétique obtenu sur Capillarys (EC) au Laboratoire de Biochimie du CHU de Tizi-Ouzou.....	38
Figure 12 : Portoire d'échantillon contenant une barrette d'antisérums	40
Figure 13 : Résultat de l'immunotypage par immunosoustraction sur le Capillarys révélant une IgMc de type IgG kappa réalisé au laboratoire de Biochimie de CHU de Tizi-Ouzou.....	41
Figure 14 : Résultat de l'immunotypage urinaire par immunosoustraction sur le Capillarys révélant des chaînes légères de type kappa réalisé au laboratoire de Biochimie de CHU de Tizi-Ouzou	42

Figure 15 : Exemple de profil électrophorétique obtenu avant et après traitement au β -mercaptoéthanol	63
Figure 16 : Représentation graphique de la répartition des patients selon le sexe.....	44
Figure 17 : Répartition des cas de GM selon les tranches d'âge	45
Figure 18 : Répartition des patients selon le service d'admission	46
Figure 19 : Répartition selon le type de GM.....	47
Figure 20 : Répartition étiologique des GM	47
Figure 21 : Répartition selon le taux de protide.....	48
Figure 22 : Répartition des CM selon la zone de migration	49
Figure 23 : Répartition des patients selon l'hypogammaglobulinémie.....	50
Figure 24 : Répartition des GM selon la concentration du CM	51
Figure 25 : Répartition selon le type du CM.....	52
Figure 26 : Répartition des CM selon le type de la chaîne légère.....	53

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques des différentes classes des Ig humaines.....	4
Tableau II : Répartition des GM selon les tranches d'âge.....	44
Tableau III : Répartition des patients selon le service d'admission.....	45
Tableau IV : Répartition selon le type de GM.....	46
Tableau V : Répartition selon le taux de protide	48
Tableau VI : Répartition des CM selon la zone de migration	49
Tableau VII : Répartition selon l'hypogammaglobulinémie polyclonale	50
Tableau VIII : Répartition selon la concentration du CM.....	51
Tableau IX : Répartition selon le type du CM.....	52
Tableau X : Répartition des CM selon le type de la chaîne légère	53
Tableau XI : Résultats de la protéinurie de Bence Jones.....	54
Tableau XII : Distribution selon le sexe dans différentes séries de GM	55
Tableau XIII : Répartition étiologique des GM selon les séries	57
Tableau XIV : Distribution isotypique des GM selon les séries	60

Table des matières

INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Gammopathies monoclonales	3
I.1. Rappel sur les immunoglobulines	3
I.1.1. Définition et structure de base	3
I.1.2. Différentes classes des Ig	4
I.1.3. Synthèse des Ig	5
I.2. Les immunoglobulines monoclonales.....	5
I.2.1. Définition et caractéristiques	5
I.3. Les différents types de gammopathies monoclonales	5
I.3.1. Gammopathies monoclonales malignes	6
I.3.1.1. Myélome multiple	6
I.3.1.2. Macroglobulinémie de Waldenström.....	12
I.3.1.3. Maladies des chaînes lourdes	14
I.3.2. Gammopathies monoclonales bénignes	14
II. Electrophorèse capillaire	17
II.1. Principe de base	17
II.2. Appareillage.....	17
II.3. Mécanisme de migration	19
II.3.1. Migration électrophorétique	20
II.3.2. Migration électro-endosmose	20
II.4. Les modes de séparation en EC	22
II.5. Facteurs influençant la séparation	24
II.6. Avantages et limites.....	24
II.7. Les différentes applications	25
II.8. Electrophorèse capillaire des protéines sériques	25
II.9. Electrophorèse capillaire des protéines urinaire	27
III. Immunotypage	28
III.1. Définition.....	28
III.2. Immunoélectrophorèse	28
III.3. Immunofixation	28
III.4. Immunosoustraction	29
III.4.1. Principe de base.....	29
III.4.2. Les étapes de réalisation.....	29
III.4.3. Anomalies sur l'EPP pour lesquelles un IT est recommandé	30
III.4.4. Avantages et limites	31

PARTIE PRATIQUE

MATERIEL ET METHODES

I. Patients inclus	33
II. Méthodes	34
II.1. Recueil des échantillons	36
II.2. Dosage de la protidémie	36
II.3. Dosage de la protéinurie des 24 h.....	37
II.4. Electrophorèse des protéines sériques	37
II.5. Electrophorèse des protéines urinaires	39
II.6. Immunotypage par immunosoustraction	40
II.7. Traitement par β -mercaptoéthanol.....	43
II.8. Outils statistiques.....	43

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS

I. Caractéristiques de la population étudiée	44
I.1. Répartition selon l'âge	44
I.2. Répartition selon le sexe	44
I.3. Répartition selon le service d'admission	45
I.4. Répartition selon le type de GM	46
II. Résultats de dosage de la protidémie.....	48
III. Résultats de l'électrophorèse des protéines sériques.....	49
III.1. Répartition des CM selon la zone de migration	49
III.2. Répartition selon l'hypogammaglobulinémie polyclonale.....	50
III.3. Répartition des CM selon la concentration du CM	51
IV. Résultats de l'immunotypage.....	52
IV.1. Répartition des GM selon le type de CM.....	52
IV.2. Répartition des CM selon le type de la chaîne légère	53
V. Résultats de la protéinurie de Bence Jones.....	53

DISCUSSION

I. Répartition des cas de GM selon le sexe et l'âge	55
I.1. Sexe ratio	55
I.2. Age.....	55
II. Répartition en fonction des services prescripteurs	56
III. Répartition selon le type de GM	56
IV. Exploration biochimique.....	58
IV.1. Protidémie	58
IV.2. Electrophorèse des protéines sériques EPS.....	58
IV.3. Immunotypage.....	59
IV.4. Protéinurie de Bence Jones	61
V. Intérêt et limites de la technique de l'EC et de l'IS dans diagnostic des GM	62

CONCLUSION	63
-------------------------	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	64
--	----

ANNEXES

Introduction

Les disglobulinémies monoclonales, improprement appelées gammopathies monoclonales (GM) rassemblent un nombre de pathologies diverses, à la fois malignes et bénignes.

Il faut remonter au XIXe siècle pour voir apparaître les premières notions de GM avec la description par le docteur S. Solly du premier cas du myélome en 1844. Parallèlement, le Dr. Henry Bence Jones met en évidence en 1848, une protéine anormale dans les urines d'un patient atteint de myélome. Ce n'est qu'en 1889 que le docteur Otto Kahler en fait une description clinique détaillée et lui donne le nom éponyme de maladie de Kahler. Plus tard, en 1944, le Dr. Jean Gösta Waldenström décrit une nouvelle maladie caractérisée par la sécrétion d'une protéine anormale, la macroglobulinémie ou maladie de Waldenström (MGW). En 1964, Jean Waldenström sera le premier, à préciser le classement nosologique des GM et à attirer l'attention sur des cas où celles-ci ne sont pas liées à un syndrome immunoprolifératif malin. Ce concept de GM « bénigne » sera transformé par Kyle en gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) du fait de l'observation des cas de transformation maligne au cours de la surveillance.

Les GM sont définies par la prolifération incontrôlée d'un clone de cellules lymphocytaires de type B (lymphoplasmocytes ou plasmocytes), produisant une Igm qui constituent une population homogène d'Ig identiques entre elles, présentent dans le sang et/ou les urines. Les Igm se caractérisent par une seule classe de chaîne lourde et un seul type de chaîne légère. Elles peuvent être sécrétées de façon complète ou incomplète.

De nos jours, la prévalence des GM est importante puisqu'estimée à 1 % dans la population générale et à 3 % chez les sujets de plus de 50 ans. L'augmentation de leur détection depuis deux décennies n'est toutefois pas univoque. Elle a une explication évidente, liée au vieillissement de la population, à la systématisation de l'électrophorèse des protéines sériques et à l'amélioration des techniques du diagnostic biologique en termes de rapidité, de fiabilité, de sensibilité et de facilité d'interprétation pour le biologiste.

La biologie et plus particulièrement la biochimie tient un rôle majeur dans le dépistage et le diagnostic de ce type de pathologie. En effet, les différentes techniques de séparation font souvent appel à la chromatographie ou à l'électrophorèse. Ces deux techniques n'ont connu un développement important que depuis ces dernières décennies notamment avec l'introduction des outils de la haute pression ou l'amélioration de la qualité et de la résistance des supports de séparation.

Plus récemment, un énorme développement de l'électrophorèse a découlé de l'emploi de capillaire à la place de système planaire : c'est l'électrophorèse capillaire, une technique très performante qui représente un outil important dans la mise en évidence, et plus récemment dans le typage de l'IgM par immunosoustraction, par identification de sa chaîne lourde et sa chaîne légère.

L'objectif de notre étude a porté sur l'intérêt de la technique d'immunosoustraction dans le diagnostic des gammopathies monoclonales. Cette étude descriptive prospective a porté sur 51 cas de GM explorées au sein du service de biochimie du centre hospitalo-universitaire Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou, sur une période de 04 mois (Mars à Juin 2015) pour analyser les aspects épidémiologiques et immunologiques de cette population.

Cette étude est basée sur deux volets principaux : une revue de la littérature et une partie pratique dans laquelle on a exposé notre travail pratique ainsi que les résultats obtenus.

I. Gammopathies monoclonales :

I.1. Rappel sur les immunoglobulines :

I.1.1. Définition et structure de base :

Les immunoglobulines sont un groupe de protéines plasmatiques dotées d'une activité anticorps et qui peuvent reconnaître spécifiquement un antigène, de se lier à ce dernier et de le neutraliser. Elles sont localisées sur la membrane plasmique des lymphocytes B ou sécrétées par les plasmocytes dans le milieu intérieur (MARSHALL et BANGERT, 2005).

Les Ig sont des glycoprotéines complexes de masse moléculaire très élevée, composées de quatre chaînes polypeptidiques, deux chaînes lourdes ou Heavy (H) identiques (de type γ , μ , α , δ et ϵ) et deux chaînes légères ou Light (L) identiques (de type λ et κ) reliées entre elles par des ponts disulfures (figure 1). Chaque chaîne est constituée d'une partie constante C terminale et d'une partie variable N terminale (AIT MEBAREK, 2012).

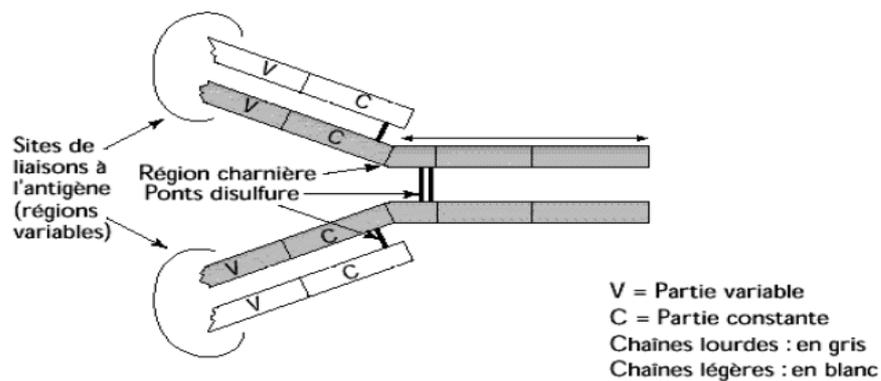


Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'une immunoglobuline

(MARSHALL et BANGERT, 2005)

Ces molécules sont caractérisées par un certains nombres de propriétés :

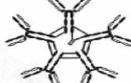
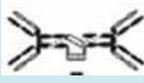
- **Dualité fonctionnelle** : les Ig présentent deux pôles fonctionnels : régions variables, impliquées dans les fonctions de reconnaissance de l'Ag (Fab) et régions constantes (Fc), responsables des fonctions effectrices ;
- **Dualité structurale** : les Ig sont constituées par deux types de chaînes légères et deux types de chaînes lourdes ;
- **Hétérogénéité** : les Ig humaines sont utilisées comme immunogènes, ce qui a permis de définir les différentes spécificités antigéniques qu'on peut classer en trois types :

- ◆ Spécificité isotypique : uniforme pour tous les individus d'une même espèce, elle définit les catégories (classes, sous classe, type de chaîne légère) des Ig ;
- ◆ Spécificité allotypique : elle correspond au polymorphisme génétique existant entre les différents individus d'une même espèce ;
- ◆ Spécificité idiotypique : elle est liée à l'hypervariabilité du site de liaison à l'antigène. Cette variation est propre à chaque clone de lymphocyte B (FRANCOIS BACH et LESAVRE, 1981).

I.1.2. Classes des immunoglobulines :

Les Ig humaines sont réparties en cinq classes principales qui sont déterminées par le type de chaîne lourde que contient la molécule, on distingue : IgG, IgM, IgA, IgD et IgE. Dans le cas des IgG et des IgA, il existe en outre des sous-classes : IgG₁, IgG₂, IgG₃ et IgG₄ ainsi que IgA₁ et IgA₂. La structure de l'IgG sert de référence structurale (HORN *et al.*, 2005).

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes classes des Ig humaines (MARSHALL et BANGERT, 2005).

Classe	Poids moléculaire (kDa)	Concentration sérique moyenne (g/l)	Structure	Rôle biologique
IgG (γ)	146	14	 monomère	- Ac principal des RI secondaires - protection du nouveau-né
IgM (μ)	970	1.5	 pentamère	- Ac principal de la RI primaire - reste dans le compartiment vasculaire
IgA (α)	160	3.5	 dimère	- Ac principal des sécrétions séromuqueuses (la salive, le mucus bronchique)
IgD (δ)	184	0.03	 monomère	- à la surface des LB impliquée dans la reconnaissance de l'Ag
IgE (ε)	188	traces	 monomère	- à la surface des mastocytes et des basophiles - rôle dans les réactions d'hypersensibilité immédiate

I.1.3. Synthèse des immunoglobulines :

Les lymphocytes B sont des cellules produites par la moelle osseuse et dont la différenciation se fait indépendamment du thymus. Ils ont la morphologie générale des petits lymphocytes ou des immunoblastes.

Le contact du LB avec l'Ag se traduit par le phénomène de «transformation lymphoblastique » ; les LB se différencient alors très rapidement en grandes cellules d'aspect blastique qui subissent de nombreuses mitoses et s'enrichissent en réticulum et en ARN cytoplasmiques, donc leur morphologie se modifie et évolue par étapes vers un autre type cellulaire : le plasmocyte ; véritable cellule effectrice de l'immunité à médiation humorale qui synthétise, stocke et excrète les molécules effectrices de ce type d'immunité : les immunoglobulines (HILLMAN *et al.*, 2007).

I.2. Les immunoglobulines monoclonales :

I.2.1. Définition et caractéristiques :

Une Ig monoclonale est une population homogène d'Ig synthétisée par un seul clone plasmocytaire. Les Igm sont définies par trois caractères :

- **L'identité structurale** : elles ne possèdent qu'un seul type de chaîne lourde et un seul type de chaîne légère ;
- **L'identité de charge électrique** : la mobilité électrophorétique est homogène d'où la visualisation à l'EPS et/ou à l'EPU d'un « pic monoclonal » : pic élevé pointu à base étroite migrant le plus souvent en position gamma mais pouvant plus rarement migrer en position alpha ou bêta ;
- **L'identité immunologique** : toutes les Igm possèdent les mêmes déterminants iso-, allo- et idiotypiques, donc la même activité Ac (GUERIN, 2008).

I.3. Les différents types de gammopathies monoclonales (GM) :

Le terme de GM rassemble un nombre de pathologies très diverses, à la fois malignes et d'autres bénignes selon KYLE (1978) qui s'appuie sur des critères biologiques : plasmocytose et taux d'Igm. Elle est définie par la prolifération excessive et incontrôlée d'un clone unique de cellules lymphocytaires de type B, produisant une Igm (KYLE et GREIPP, 1978). Les GM sont détectées chez un peu plus de 3 % des sujets après 50 ans, et jusqu'à 7 % après 70 ans (BEAUVILLAIN, 2011).

Cette Ig peut être sécrétée de façon complète (constituée d'une seule classe de chaîne lourde et d'un seul type de chaîne légère) ou incomplète (constituée soit de chaînes légères isolées d'un seul type, soit plus rarement de fragments de chaînes d'une seule classe) dans le sérum et/ou les urines (GUERIN, 2008).

I.3.1. Gammopathies monoclonales malignes :

Cet ensemble de pathologies, définies par une prolifération lymphocytaire à caractère tumoral, se présente sous des tableaux cliniques très différents selon le type et la concentration de l'Ig synthétisée (GUERIN, 2008).

I.3.1.1 Myélome multiple (MM):

Le myélome multiple ou maladie de Kähler est une prolifération plasmocytaire monoclonale maligne envahissant la moelle osseuse (MO) et sécrétant une Igm entière ou tronquée (chaîne légère libre), cette Igm peut être décelé dans le sang et/ou dans les urines. Elle est très généralement d'emblée disséminée, d'où le nom de «myélome multiple». C'est une maladie qui représente environ 80 % des GM malignes, 15 % des hémopathies malignes et environ 1% de l'ensemble des cancers (DECAUX *et al.*, 2007). On l'observe plus souvent chez l'homme que chez la femme, surtout au-delà de la cinquantaine. C'est une affection relativement fréquente chez le sujet âgé, mais plus rarement, l'affection peut s'observer chez l'adulte jeune (BOUATAYA *et al.*, 2013).

❖ Physiopathologie du myélome multiple :

Les cellules cancéreuses dans le MM sont des plasmocytes monoclonaux qui se trouvent dans la MO. Il s'agit de cellules de la lignée B au stade terminal qui sécrètent une IgMc appelée paraprotéine ou protéine-M.

L'origine du MM reste indéterminée. Néanmoins, toujours plus d'évidences suggèrent que le développement d'un MM découle de plusieurs étapes incluant l'acquisition de plusieurs modifications structurelles chromosomiques (CAIROLI et ANDRE DUCHOSAL, 2013). Les plasmocytes myélomateux sont parfois morphologiquement anormaux : plasmocytes jeunes, de grande taille, présentant des anomalies nucléaires ou cytoplasmiques (figure 3).

La prolifération médullaire a parfois une distribution hétérogène : la biopsie médullaire peut alors être nécessaire pour en affirmer la présence. (FRANCOIS BACH et LESAVRE, 1981).

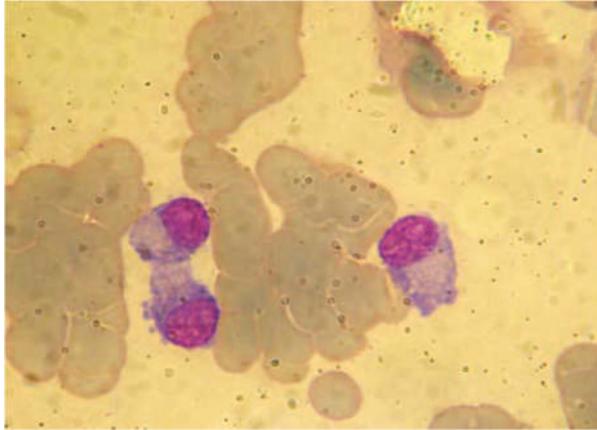


Figure 2 : Frottis médullaire montrant des plasmocytes normaux (AMRANI HASSANI *et al.*, 2010)

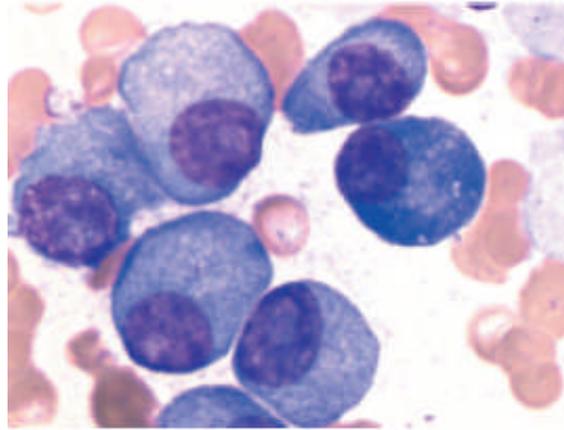


Figure 3 : Plasmocytes dystrophiques avec volumineux nucléoles (FERMAND, 2003)

Par ailleurs, il a été montré que la prolifération des plasmocytes est sous la dépendance des différentes cytokines, parmi lesquelles l'interleukine 6. Rappelons qu'à l'état physiologique, l'IL6 intervient dans la différenciation des cellules lymphoïdes B en plasmocytes matures sécrétant des Ig, aussi essentielle à la survie et à la croissance des cellules myélomateuses et inhibe leur apoptose (spontanée ou induite par les corticostéroïdes), et enfin favorise la résorption osseuse (lésions lytiques associées au myélome).

Dans le myélome, la sécrétion de l'IL6 ne serait pas autocrine mais paracrine : en effet, l'IL6 serait produite par les cellules du microenvironnement médullaire sous l'influence des cellules myélomateuses qui expriment des récepteurs pour l'IL-6 mais ne la sécrètent pas.

La destruction osseuse résulte d'un recrutement et de l'activation des ostéoclastes au contact des plasmocytes malins. Les facteurs qui en sont responsables regroupent de multiples cytokines dont les principales sont RANK ligand, IL1, IL6, HGF, MIP-1 α qui seront responsables de l'ostéolyse caractéristique de la maladie (VAUBOURDOLLE, 2013).

❖ Circonstances de découverte et signes cliniques :

Le MM peut être symptomatique ou asymptomatique. Il est considéré comme MM symptomatique, un myélome présentant une atteinte d'organe cible abrégé selon l'acronyme «CRAB» (*calcium, renal insufficiency, anemia or bone lesions*) (CAIROLI et ANDRE DUCHOSAL, 2013).

Le plus souvent se sont les manifestations osseuses qui sont à l'origine du diagnostic, souvent accompagnées d'une altération de l'état générale (asthénie, amaigrissement...). La découverte peut être également fortuite, à l'occasion d'un bilan systématique (CLAUVEL, 1986). Au cours de l'évolution, diverses manifestations cliniques peuvent apparaître :

- **Manifestations osseuses :**

Elles se traduisent par des douleurs osseuses, en général intenses, touchant le plus souvent le rachis et/ou la cage thoracique. Un bilan radiologique comprenant des radiographies du squelette permet de mettre en évidence différentes lésions : lésions des vertèbres avec parfois des tassements vertébraux, ce qui peut entraîner des compressions médullaires et être à l'origine de signes neurologiques, fractures, notamment des os longs, spontanées ou provoquées par un traumatisme minime, géodes qui sont des lacunes à l'emporte-pièce au niveau des os plats (crâne, bassin, cage thoracique) et déminéralisation diffuse (HILLMAN, 2007).

- **Manifestations hématologiques :**

Elles sont liées aux signes d'insuffisance médullaire. L'anémie est la plus habituelle, car l'érythropoïèse est inhibée, thrombopénie et/ou thrombopathie avec troubles de l'hémostase (peu fréquent) et leucopénie. Elles contribuent à l'altération de l'état général.

- **Manifestations rénales :**

L'atteinte rénale, notée dans la moitié des cas de myélome multiple, est la seconde cause de mortalité. Le rein myélomateux se caractérise par la présence de cylindres tubulaires denses parfois entourés de cellules géantes (CLAUVEL, 1986). Le mécanisme de l'insuffisance rénale est multifactoriel, résultant principalement de la précipitation intratubulaire des chaînes légères, favorisée par la déshydratation (peut être engendré par des épisodes infectieux aigus fibrils) et l'hypercalcémie qui est liée à l'ostéolyse (HILLMAN, 2007).

- **Manifestations liées à l'hyperviscosité :**

Quand l'Ig est produite en très grande quantité, il peut apparaître des troubles oculaires, céphalées, une sureté brusque etc. L'augmentation de la viscosité sérique n'est considérée comme significative que pour des valeurs dépassant trois fois les valeurs normales. Le traitement de l'hyperviscosité est urgent et repose sur le maintien d'une hydratation convenable.

- **Infections à répétition :**

Elles sont liées à la déplétion en lymphocytes et au déficit en Ig polyclonales, elles sont à l'origine de pneumopathies, sépticémie... Les infections sont responsables de 20 à 50 % des décès dans l'évolution du myélome (MANIER *et al.*, 2011).

- ❖ **Diagnostic biologique :**

Le diagnostic du MM est souvent évoqué sur des examens réalisés à partir d'un prélèvement de sang et des urines. Le principal d'entre eux est l'électrophorèse des protéines sériques (EPS) qui permet de déterminer s'il existe une Igm formant un pic bien identifiable. Ce pic explique l'élévation de la vitesse de sédimentation (au-dessus de 100 mm à la première heure). Des analyses complémentaires servent alors à déterminer de quelle Ig il s'agit précisément et à la quantifier (CAIROLI et ANDRE DUCHOSAL, 2013). On peut ainsi distinguer quatre situations différentes qui définissent les différents types de MM :

- l'existence d'une Igm entière dans le sérum (10% des cas) ;
- l'existence d'une Igm associée à un excès de chaînes légères libres (CLL) (60% des cas). Ces CLL peuvent être éliminées dans les urines, donnant ainsi lieu à une protéinurie de Bence Jones (PBJ) ; dans ces deux situations, il s'agit d'un MM sécrétant.
- l'existence de chaînes légères seules dans le sérum et dans les urines (PBJ) (30% des cas), dans ces cas, les plasmocytes n'excrètent pas leur Ig complète, mais seulement la chaîne légère soit kappa, soit lambda, bien que la chaîne lourde puisse être retrouvée à l'intérieur du cytoplasme. Il s'agit d'un MM à chaînes légères.
- enfin, l'absence de toutes Igm et de tout excès de chaînes légères (1% des cas). Il s'agit d'un MM non sécrétant, dont le diagnostic ne pourra être fait que par l'immunofluorescence qui révèle, au niveau de la MO, de très nombreux plasmocytes riches en Ig intracytoplasmiques.

Les anomalies protéiques peuvent être accompagnées très souvent d'un effondrement du taux des autres Ig, cela explique l'hypogammaglobulinémie absolue rencontrée dans les MM à PBJ ou non excréteurs (CASASSUS et LE ROUX, 1991).

Parallèlement, des radiographies du squelette sont réalisées afin de rechercher d'éventuelles atteintes osseuses. Des examens complémentaires de laboratoire sont utiles :

- un hémogramme ;
- une évaluation de la fonction rénale (ionogramme sérique et urinaire, créatininémie et recherche et dosage de la protéinurie des 24 h) ;
- la mesure de la calcémie ;

- mesure de l'albulinémie et de taux sérique de β 2-microglobuline (HILLMAN, 2007).

Pour affirmer de façon certaine le diagnostic, il est nécessaire de pratiquer une ponction de la moelle osseuse (un myélogramme), celle-ci consiste à insérer une aiguille creuse dans un os. Une petite quantité de moelle est alors aspirée, ce qui permet d'étudier au microscope les plasmocytes anormaux et de préciser le pronostic de la maladie, par l'étude de leurs chromosomes et de leurs gènes (CAIROLI et ANDRE DUCHOSAL, 2013).

❖ Classification pronostique :

Le MM est caractérisé au moment du diagnostic par un stade tumoral. Le système ISS (*International Staging System*) est universellement utilisé depuis 2005 et permet de stratifier simplement le pronostic de survie des patients. Cette classification détermine trois stades en tenant compte de deux variables, l'albumine et la bêta-2-microglobuline qui est une protéine formée par une chaîne légère du système d'histocompatibilité de classe I présente dans toutes les cellules malades, est sécrétée par les cellules tumorales. Au cours du MM, le taux de β 2 microglobuline est le reflet à la fois de la masse tumorale et de la fonction rénale (FILALI MOUHIM, 2011) (voir annexe 01).

La classification anciennement utilisée selon Durie et Salmon décrite en 1975 reste souvent utilisée en parallèle car elle donne une bonne évaluation de l'étendue de la maladie (masse tumorale) et de distinguer trois stades, classés par ordre de gravité croissante (voir annexe 02).

❖ Traitement du MM :

Le MM reste une maladie incurable. Il est responsable de 1 % de la mortalité par cancer (DECAUX *et al.*, 2007). En l'absence de traitement, la survie médiane à partir du diagnostic ne dépasse pas 6 à 12 mois et est de l'ordre de trois ans avec les traitements chimiothérapeutiques conventionnels (HILLMAN S., 2007).

L'efficacité du traitement est en générale transitoire. Les patients asymptomatiques font l'objet d'une surveillance clinique tous les trois à six mois (DIMOPOULOS *et al.*, 2000).

Les MM doivent être traités, d'où le traitement chimiothérapeutique (antitumoral) et traitement des symptômes :

• La chimiothérapie :

Elle demeure le traitement d'élection et repose dans la majorité des cas sur des agents alkylants qui ont une activité myélosuppressive, tels le melphalan (Alkéran®) ou la cyclophosphamide (Endoxan®). Pour assurer une efficacité maximale, les doses sont ajustées

de telle sorte qu'elles provoquent une thrombocytopénie et une neutropénie modérée. De ce fait, un suivi des taux de plaquettes et de leucocytes doit être réalisé pendant toute la durée du traitement (WENSIERKI, 2010). En cas de réponse favorable, on observe une diminution progressive du taux de l'Igm.

Les insuffisances des monochimiothérapies ont poussé à développer des polychimiothérapies grâce à l'avènement des nouveaux agents thérapeutiques: thalidomide puis bortezomib et lenalidomide ce qui a permis d'améliorer la survie des patients. (MONCONDUIT, 1994).

- **Auto et allogreffe de la moelle osseuse :**

Les deux sont réservées aux patients les plus jeunes, en raison d'effets toxiques importants à cours terme. Suite à une chimiothérapie intenssive initiale, les autogreffes sont réalisées après recueil de cellules souches périphériques, puis traitement par melphalan puis réinjection de ces cellules. Elles représentent une avancé thérapeutique significative en améliorant la qualité de vie et en augmentant les médianes de survie (GASTINNE *et al.*, 2007).

Les allogreffes de la MO peuvent être proposées chez les malades en rechute. Elles seules, peuvent permettre des rémissions complètes suffisamment prolongées pour espérer une guérison (VAUBOURDOLLE, 2013).

- **La radiothérapie :**

Est utile pour soulager la douleur provoquée par une localisation de la maladie, les irradiations étendues à l'ensemble du squelette peuvent être proposées dans certains contextes hyperalgiques mais comportent une toxicité hématologique importante (MEHTA et HOFFBRAND, 2003).

- **Traitement des symptômes :**

Sont des traitements de soutien qui doivent être mis en place :

- antibiothérapie pour lutter contre les infections secondaires à l'immunosuppression ;
- réhydratation pour prévenir les insuffisances rénales modérées et en cas des insuffisances rénales sévères, nécessitent l'hémodialyse ;
- transfusion sanguine en cas d'anémie ;
- lutte contre l'hypercalcémie avec des corticoïdes, des diurétiques et des biphosphonates ;
- plasmaphérèse pour lutter contre le syndrome d'hyperviscosité (WENSIERKI, 2010) ;

- La chirurgie peut être nécessaire pour les complications, par exemple : fracture pathologique et compression de moelle épinière (MEHTA et HOFFBRAND, 2003).

I.3.1.2. Macroglobulinémie de Waldenström (MGW):

❖ Définition- Epidémiologie :

La maladie de Waldenström est une hémopathie lymphoïde maligne caractérisée par l'envahissement de la MO hématopoïétique, des ganglions, de la rate et du foie par des lymphoplasmocytes tumoraux et la sécrétion d'une quantité élevée d'IgM par ces dernières. C'est une affection rare qui représente environ 6% des hémopathies lymphoprolifératives et 1 à 2% des hémopathies malignes ; elle est moins fréquente que le MM (MOREAU *et al.*, 2007). Le taux d'IgM sécrété dépasse habituellement 10 g/l et cette IgM est le plus souvent à chaînes légères kappa (RENE CAQUET, 2004). L'âge médian de survenue de la maladie se situe entre 63 et 68 ans, avec une prédominance masculine de l'ordre de 55 à 70% (GUERIN, 2008).

❖ Physiopathologie :

Il s'agit d'une prolifération lymphoplasmocytaire hétérogène, caractérisée par la présence de lymphocytes présentant des stades de différenciation divers, bien que tous dérivés d'un même lymphocyte B ; on observe ainsi à la fois des petits lymphocytes, des grands lymphocytes et des plasmocytes, dont seuls les éléments les plus mûrs (plasmocytes et lymphoplasmocytes) excrètent l'IgM monoclonale sérique (BROUET et FERMAND, 1986).

❖ Manifestations cliniques :

La MGW se manifeste par divers signes cliniques :

- Signes liés à la prolifération lymphoïde :
 - polyadénopathie superficielle et profonde ;
 - hépatosplénomégalie ;
 - plus rarement, localisations viscérales.
- Signes liés à la disglobulinémie monoclonale :
 - Céphalées, somnolences, vertiges, troubles visuels dus à l'hyperviscosité ;
 - Insuffisance cardiaque ;
 - Neuropathie périphérique.

- Singes liés à l'insuffisance médulaire :
 - Infections à répétitions, anémie, hémorragies.
- Atteinte de l'état générale : asthénie progressive (signe révélateur le plus fréquent), amaigrissement et saignements muqueux.

Parfois, l'affection reste latente pendant longtemps, aussi dans certains cas la MGW est asymptomatique, de découverte fortuite ou sans prolifération lymphoïde décelable « de signification indéterminée » (COLOMBAT, 1995).

❖ Diagnostic de MGW :

Le diagnostic de la maladie de Waldenström est évoqué dans un premier temps à partir d'examens sanguins. Parfois, c'est une simple élévation de la vitesse de sédimentation du sang, ou l'existence d'une anémie qui conduit à rechercher la maladie. Il est alors nécessaire de réaliser une EPS et un immunotypage des Ig. La présence en quantité importante de l'IgM produite par les lymphocytes anormaux se traduit par un « pic » qui doit conduire à réaliser un myélogramme qui permet de confirmer le diagnostic (infiltration lymphoplasmocytaires) (LEBLOND et TOURNILHAC, 2005).

Les adénopathies et les hépato-splénomégalies sont recherchées par une radiographie du thorax, et une échographie abdominale (FERMAND, 2003).

Un hémogramme et un frottis sanguin permettent de révéler une anémie et de mettre en évidence des hématies en rouleaux, une caractéristique typique de la maladie (GUERIN, 2008).

❖ Traitement de la MGW :

La maladie de Waldenström reste à l'heure actuelle une maladie incurable. Seuls les patients symptomatiques relèvent d'un traitement antitumoral (GHOBRIAL, 2006).

Ce traitement s'appuie sur l'administration d'une chimiothérapie ou d'une immunothérapie. Parfois, ces deux types de traitements sont associés. La chimiothérapie se base sur l'emploi de médicaments (alkylants) qui s'attaquent aux cellules de la maladie, soit en les détruisant, soit en stoppant leur croissance. L'immunothérapie consiste à administrer des médicaments (anticorps monoclonaux) spécifiquement dirigés contre les cellules de la maladie. Ces médicaments imitent les anticorps naturels et entraînent la mort des cellules qu'ils ciblent (LEBLOND et TOURNILHAC, 2005).

Les traitements actuels permettent dans la grande majorité des cas d'obtenir une réponse thérapeutique : les symptômes disparaissent, le taux d'IgM monoclonale baisse sensiblement et la maladie n'évolue plus. Pendant toute la durée de la réponse thérapeutique,

le suivi médical est équivalent à celui des personnes qui ont une maladie asymptomatique, avec une consultation tous les six mois.

En cas de rechute de la maladie, un nouveau traitement est alors entrepris afin d'obtenir une nouvelle réponse. Même si les traitements actuels ne permettent pas de guérir la maladie, il est ainsi possible de contrôler celle-ci durablement (MOREAU *et al.*, 2007).

I.3.1.3. Maladie des chaînes lourdes :

Les maladies des chaînes lourdes (MCL), sont définies par la présence dans le sérum d'une IgMc constituée uniquement de deux chaînes lourdes incomplètes, tronquées et sans chaînes légères associées. Il s'agit d'une prolifération lymphoïde peu fréquente, initialement non maligne, mais susceptible de transformer en un lymphôme agressif. Elles sont connues pour les trois classes d'Ig : IgG, IgA et IgM dont la MCL alpha est la plus fréquente (FERMAND, 2003).

La maladie des chaînes alpha touche des sujets jeunes, le plus souvent âgés de 10 à 30 ans. Exceptionnellement respiratoire, l'atteinte est le plus souvent digestive, avec infiltration lymphoplasmocytaire du grêle responsable d'une malabsorption grave.

Les maladies des chaînes gamma et mu sont exceptionnelles et sont marquées par une prolifération lymphoplasmocytaire ganglionnaire et hépatosplénique (HILLMAN, 2007).

Une bande monoclonale est détectée dans 6 à 86% des cas, son typage permet d'établir le diagnostic. Précisons que les chaînes lourdes alpha et gamma peuvent se retrouver dans les urines (GUERIN, 2008).

I.3.2. Gammopathies monoclonales bénignes (MGUS) :

❖ Définition et épidémiologie :

Aussi appelées MGUS (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*) par les anglosaxons (GUERIN, 2008).

On considère actuellement que les MGUS sont des pathologies plasmocytaires monoclonales à malignité réduite (asymptomatiques) qui sont définies lorsqu'on découvre à la fois, une protéine monoclonale dans le sérum inférieure ou égale à 30 g/l (quelque soit le type d'Ig), moins de 10% de cellules lymphoplasmocytaires dans la MO, et qu'il n'y a pas trace d'hypercalcémie, d'insuffisance rénale, d'anémie ou de lésions osseuses liées au désordre des cellules prolifératives du sang. L'incidence des MGUS augmente avec l'âge, elle est estimée à 3% de la population de 50 ans ou plus et chez 5 % des personnes au delà de 70 ans. La protéine M peut être une IgG (69 %), une IgA (11 %), une IgM (17 %) ou elle peut être

biclonale (deux protéines M) dans 3 % des cas. On rencontre plus de MGUS chez les hommes que chez les femmes (3.7 % contre 2.9 %) (KYLE, 2008). D'après les données de la Mayo clinique aux Etats Unis, les MGUS représentent presque 60% des GM (KYLE et RAJKUMAR, 2005).

❖ **Les caractères cliniques et biologiques de GM bénigne :**

- absence de symptômes cliniques ou radiologiques des proliférations lymphoïdes et/ou plasmocytaires malignes ;
- le taux des Igm est en général peu important, inférieur à 10g/l pour les IgA, et à 20g/l pour les IgG ;
- le taux des autres Ig polyclonales est normal et même par fois élevé ;
- la PBJ est observée dans un tiers des cas à un taux faible inférieur à 300 mg/24h ;
- plasmocytose médullaire normale ou peu augmentée en général inférieur à 5 % des éléments de la MO ;
- le taux de béta-2-microglobuline sérique habituellement normale ;
- le caractère bénin de l'Igm ne pourra être affirmé qu'après plusieurs surveillance des éléments cliniques, cytologiques, radiologiques et immunochimiques (CLAUVEL et DUBREUIL, 1994).

❖ **Circonstances de découverte :**

Anomalie globulinique découverte au cours d'un examen systématique (souvent fortuite), ou lors de l'étude d'une anomalie biologique telle qu'une augmentation de la VS. Le caractère monoclonal de l'Ig est affirmé par l'analyse immunoélectrophorétique ou par l'immunofixation. La constatation d'une Igm nécessite dans un premier temps, la recherche des symptômes d'une prolifération des cellules B : maladie de Kahler, maladie de Waldenström. Les examens suivants sont nécessaires :

- hémogramme ;
- myélogramme par ponction ;
- étude des Ig du sérum et des Ig des urines après concentration ;
- créatinine, ionogramme, calcémie, phosphorémie ;
- clichés de l'ensemble du squelette et du thorax ;
- échographie abdominale (recherche d'adénopathies superfiteilles ou profondes) (CLAUVEL et DUBREUIL, 1994).

❖ Les affections associées :

La présence d'une Igm est relativement fréquente dans certaines affections : déficit immunitaire et hémopathie lymphoïde. Qu'elle soit isolée ou témoignant d'une hémopathie lymphoïde ou plasmocytaire, l'Igm peut s'associer à diverses affections : les cancers, la suppuration biliaire chronique, la cirrhose (rarement, il s'agit le plus souvent d'une hyperimmunoglobulinémie polyclonale), l'amylose (IgG), les cryoglobulinemies, les maladies auto-immunes et des atteintes cutanées...etc (LEVY *et al.*, 2008).

❖ Evolution des MGUS :

Dans la majorité des cas, le taux de l'Igm reste stable au cours de l'évolution. L'augmentation du taux de l'Igm, lorsqu'elle survient, est le plus souvent lente, progressive sans qu'apparaissent de signes de myélome.

L'évolution des GM non myélomateuses est variable. Le plus souvent le taux d'Ig pathologique reste stable ou n'augmente que très peu. Exceptionnellement, la disglobulinémie peut être transitoire et ne durer que quelques semaines ou quelques mois lorsqu'une infection en est la cause. A l'opposé, on peut observer dans certains cas, après quelques années d'évolution stable une augmentation progressive et régulière de l'Ig pathologique ou plus rarement une brusque ascension, traduisant la transformation myélomateuse (ZETTOUN *et al.*, 1992).

❖ Surveillance et traitement des MGUS :

Aucun traitement n'est justifié lorsque l'Igm est isolée, asymptomatique d'autant peut l'on connaît les risques leucémogènes des alkylants. Dans ces cas, après la découverte de l'anomalie protéique, il est nécessaire d'établir une surveillance régulière trois mois après le premier examen, puis six mois, puis ensuite environ tous les ans. Un traitement doit être proposé lorsque l'Igm, du fait de son activité Ac et/ou de ses propriétés physico-chimiques est responsable des manifestations pathologiques.

Ces immunoglobulines monoclonales bénignes sont moins sensibles aux chimiothérapies que les proliférations lymphoplasmocytaires patentes. (CLAUVEL et DUBREUIL, 1994).

II. Electrophorèse capillaire :

II.1. Principe de base :

L'électrophorèse capillaire est une méthode de séparation analytique très performante, rapide, quantitative et reproductible et offre essentiellement les avantages de la très grande résolution et partant d'une très grande sensibilité de la détection (LE CARRER et BACH-NGOHOU, 2005).

C'est une miniaturisation de l'électrophorèse en veine liquide initialement décrite par Tiselius dans les années 1930. Elle implique la séparation d'espèces chargées sous l'influence d'un champ électrique dans un capillaire, généralement sur base de leur rapport charge/masse (COTTON *et al*, 2006). Elle permet notamment une séparation rapide de molécules organiques de masse moléculaire et de structure très variées telles que les sucres, les lipides, les peptides et les protéines (LE CARRER et BACH-NGOHOU, 2005).

II.2. Appareillage :

L'électrophorèse capillaire se caractérise par une instrumentation très simple. De façon très schématique, un appareillage est constitué d'un capillaire de silice enfermé dans un système de thermostatisation dont les extrémités plongent dans des récipients remplis d'une solution-tampon, une source de courant électrique haute tension, d'un système d'injection des échantions à analyser et d'un dispositif de détection à travers le capillaire. Les différentes étapes de l'analyse sont contrôlées par un ordinateur (figure 4) (DAUNIZEAU, 2003).

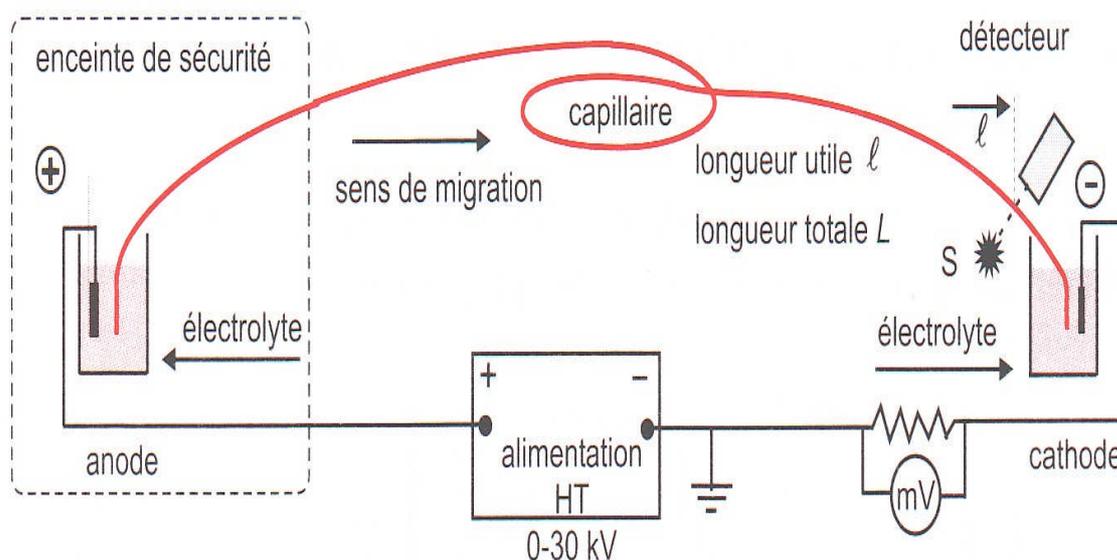


Figure 4 : Schéma de principe d'un montage d'électrophorèse capillaire (MARC *et al*, 1999).

- **Le capillaire :**

Les capillaires sont en général en silice fondue revêtue de polyimide pour les protéger et ce qui leur donne un aspect souple et rigide. Ils présentent un diamètre intérieur de 25 à 100 μm et une longueur de 25 à 100 cm. Ils sont remplis d'une solution tampon électrophorétique (BURGOT et BURGOT, 2011).

La silice fondue ou quartz n'absorbe pas les rayonnements UV et conduit bien la chaleur. Le faible diamètre du capillaire fournit un rapport surface/volume important qui favorise la dissipation de la chaleur produite par effet joule (MARLIN, 1995).

- **Les systèmes d'injection :**

Pour introduire un micro volume d'échantillon (de l'ordre de nano), qui n'excède pas 1 à 2 μl , l'échantillon est injecté à l'une des extrémités du capillaire (côté anodique). Trois modes d'injection sont préconisés (SINE, 2003) :

- a) Injection par gravité (mode hydrostatique) :**

Il semble d'être le plus fréquemment utilisé. Il consiste à injecter l'échantillon par gravité dans le capillaire. On surélève d'une hauteur h pendant un temps bien précis le flacon d'échantillon dans lequel on plonge l'extrémité du capillaire préalablement remplie d'électrolyte, puis on revient à la position initiale (capillaire et électrode dans le tampon), et enfin on applique la tension d'analyse (BURGOT et BURGOT, 2011).

- b) Injection hydrodynamique :**

Cette injection consiste à appliquer une différence de pression entre les extrémités du capillaire, pendant un temps Δt (BURGOT et BURGOT, 2011), où l'une des extrémités est émergée dans la solution d'échantillon avec l'électrode, ensuite on revient à la position initiale. Enfin, on applique la tension d'analyse (SINE, 2003).

- c) Injection électrocinétique (injection par électro-migration) :**

C'est le plus simple des modes d'injection, s'opère en introduisant l'échantillon dans le capillaire préalablement remplie d'électrolytes, où l'une de ses extrémités est placée dans le flacon d'échantillon avec l'électrode en appliquant une tension bien déterminée pendant un temps bien déterminé, puis on revient à la position initiale et on applique enfin la tension d'analyse (BURGOT et BURGOT, 2011 ; SINE, 2003).

- **Champ appliqué :**

L'électrophorèse capillaire nécessite de forts champs électriques pour assurer une séparation rapide et efficace (MENDHAM *et al*, 2006). La différence de potentiel appliquée aux deux extrémités du capillaire atteint 30 kV sans que la chaleur dégagée par effet joule n'apporte de perturbation. On travaille sous une intensité de l'ordre de 10 μ A, ce qui permet de réduire considérablement la durée d'une analyse (quelques minutes) et les pertes de résolution par diffusion ou convection (AUDIGIE *et al*, 1995).

- **Les systèmes de détection :**

La détection est le plus souvent faite par mesure de l'absorbance UV-visible. La mesure est effectuée à travers le capillaire, au fur et à mesure que les molécules se déplacent vers son extrémité (AUDIGIE *et al*, 1995). Le faisceau lumineux traverse le capillaire avant d'atteindre le détecteur du côté opposé. Les lois de l'absorption s'appliquent et le signal fourni par le photodétecteur peut être transmis à un enregistreur. La détection directement à l'intérieur du capillaire permet l'analyse des solutés sans perte d'efficacité (MENDHAM *et al*, 2006).

La détection peut aussi se faire par fluorescence qui est un procédé plus sensible et sélectif si on emploie une source laser. Pour étendre le champ d'application de cette forme de détection on peut faire une pré- ou postdérivation des analytes pour les rendre porteurs d'un fluorophore (ROUESSAC et ROUESSAC, 1992).

L'électrochimie peut aussi être utilisée comme mode de détection réalisable en insérant de minuscules électrodes dans le capillaire. Ce mode de détection est plus sensible et plus sélectif que l'UV-visible (ROUESSAC et ROUESSAC, 1992).

L'électrophorèse capillaire peut être aussi couplée à la spectrométrie de masse pour constituer un détecteur très sensible et spécifique (MENDHAM *et al*, 2006).

II.3. Mécanisme de migration :

La séparation électrophorétique est fondée sur la migration différentielle des molécules chargées par effet de deux facteurs principaux appelés mobilité électrophorétique et flux ou écoulement électro-osmotique (PETITJEAN *et al*, 2001) :

➤ **Migration électrophorétique :**

La mobilité électrophorétique μ_e , correspond au déplacement des molécules chargées avec une vitesse, en fonction de leur masse et de leur charge dans un électrolyte supposé immobile, vers l'électrode de signe opposé. Elle correspond au quotient de la vitesse v_e de l'ion sur la valeur du champ électrique E (PETITJEAN *et al.*, 2001) :

$$\mu_e = v_e / E = \frac{Q}{6\pi \eta r} \quad (\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$$

Q : charge de la particule, r : rayon de la particule, η : coefficient de viscosité du tampon.

La charge Q de la molécule est en fonction du pH isoélectrique de la particule et du pH du solvant. On appelle pH isoélectrique d'une particule, le pH pour lequel cette particule ne migre pas dans un champ électrique.

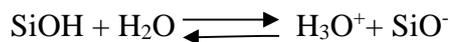
La différence $\text{pH} - \text{pH}_i$ détermine le signe de la charge Q d'une particule :

- si $\text{pH} > \text{pH}_i$ charge nette négative (anion) \longrightarrow migration vers l'anode
- si $\text{pH} < \text{pH}_i$ charge nette positive (cation) \longrightarrow migration vers la cathode
- si $\text{pH} = \text{pH}_i$ charge nette nulle \longrightarrow pas de migration.

➤ **Migration électro-osmotique :**

Phénomène parasite en électrophorèse classique, celui-ci est à la base des séparations en électrophorèse capillaire (BURGOT et BURGOT, 2011).

C'est la migration de l'ensemble de l'électrolyte dans le capillaire sous l'effet du champ électrique par effet de la paroi interne du capillaire. La paroi de silice est en effet tapissée de groupement silanols qui se déprotonnent si le pH est supérieur à 2 pour former une couche polyanionique de type Si-O^- :



On définit la mobilité électro-osmotique μ_{eo} par la relation :

$$\mu_{eo} = v_{eo} / E = v_{eo} \cdot \frac{L}{V}$$

L'équilibre est en fonction du pH de la solution et le nombre de groupement SiO^- augmente quand le pH augmente. Les ions positifs de la solution d'électrolyte s'associent à ces charges négatives par attraction électrostatique en formant une double couche : une statique plus solidement fixée à la paroi et une autre diffuse. Entre ces deux couches existe un potentiel ξ (zêta) qui caractérise la densité de charge de la surface du capillaire. La couche ionique se déplace sous l'action du champ électrique vers la cathode entraînant avec elle les molécules de solvant ou de l'échantillon (BURGOT et BURGOT, 2011).

Le déplacement d'un soluté est commandé par la combinaison des deux phénomènes. On définit une mobilité apparente μ_{app} par la vitesse réelle de migration des molécules au sein du capillaire exprimée par la relation :

$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_e$$

- **Cas où les espèces à analyser sont chargées positivement:**

Les espèces chargées positivement ont une mobilité apparente $\mu_{app} > \mu_{eo}$.

Les cations présents dans la solution tampon vont se fixer sur les groupements silanols chargés négativement pour former une couche fixe chargée positivement (PETITJEAN *et al*, 2001).

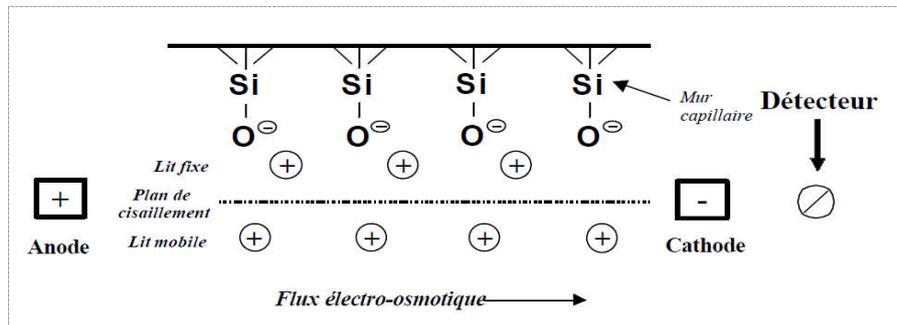


Figure 5 : Représentation du flux électro-osmotique (pour un cation) dans un capillaire (PETITJEAN *et al*, 2001).

Dès qu'un champ électrique est appliqué les cations (solvatés) de la solution vont migrer vers la cathode entraînant avec eux le tampon créant ainsi le flux électro-osmotique. Ce déplacement de l'électrolyte produit par la charge des ions et le potentiel appliqué (PETITJEAN *et al*, 2001).

- **Cas où les espèces à analyser sont chargées négativement ($\mu_{app} < \mu_{eo}$) :**

Lors de l'analyse des anions (injection du côté négatif), le sens d'écoulement de l'électrolyte qui est opposé à celui de la migration des anions empêche toute séparation performante des anions.

Cette séparation est améliorée grâce au greffage dynamique sur les sites silanols, par addition à l'électrolyte d'un inverseur de flux tel l'OFM (osmotic flow modifier) entraînant donc le changement du signe de la paroi interne du capillaire et par conséquent l'inversion du flux électro-osmotique qui sert à l'amélioration du temps de migration.

❖ **Ordre de migration :**

- les cations avec le plus grand rapport charge/taille migrent en premier, suivi de ceux ayant un ratio plus faible ;
- puis, les espèces neutres migrent dans le capillaire avec une mobilité apparente égale au flux électro-osmotique ($\mu_{app} = \mu_{eo}$) car leur mobilité électrophorétique est nulle ;
- en fin, les anions se déplacent avec une mobilité apparente inférieure au flux EO car leur mobilité électrophorétique est négative.

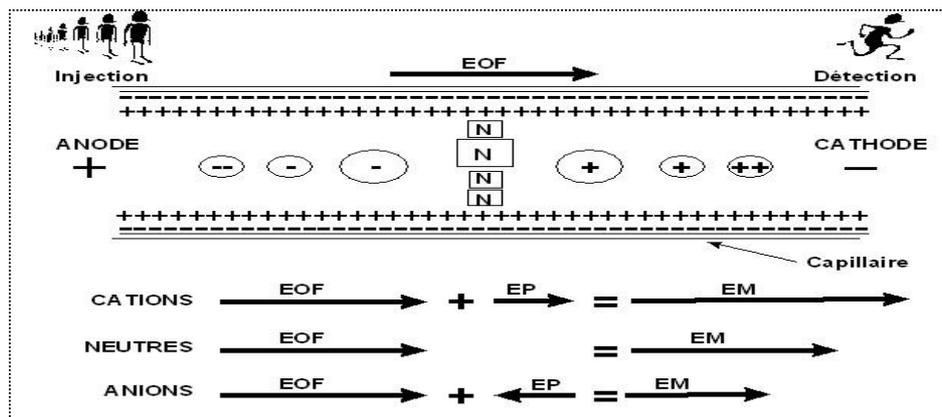


Figure 6 : principe de migration de l'électrophorèse capillaire de zone.

II.4. Les modes de séparation en EC :

Plusieurs types de techniques ont été mises en point sur le même type d'instrument dont :

➤ **Electrophorèse capillaire en zone libre (CZE) :**

L'électrophorèse capillaire de zone ou en solution libre est la plus simple et la plus utilisée des modes d'EC. Le capillaire est parcouru par l'électrolyte constitué par un milieu tampon (ROUESSAC et ROUESSAC, 1992). La séparation repose sur les différences de mobilité électrophorétique existant entre les analytes à séparer, ce qui se traduit par des vitesses de migration différentes dans le tampon d'électrophorèse à l'intérieur du capillaire. Les caractéristiques fondamentales de CZE sont l'homogénéité de la solution tampon et la constance du champ électrique sur toute la longueur du capillaire (BLESSUM *et al.*, 1999).

➤ **Electrophorèse capillaire en gel (CGE) :**

La séparation de biopolymères tels que l'ARN, l'ADN double ou simple brin ou les protéines dénaturées par le SDS, ne peut être réalisée en solution libre car ces molécules possèdent un rapport charge/taille constant. Leur séparation peut être réalisée en combinant une séparation électrophorétique et un tamisage moléculaire en remplissant le capillaire d'un gel qui assurent également la séparation des molécules en fonction de leur taille quand celles-ci migrent à travers les pores du gel (BURGOT et BURGOT, 2011).

➤ **Electrophorèse capillaire en mode micellaire (MECC) :**

Le principe de cette technique est basé sur le partage des molécules à analyser entre une phase micellaire et le solvant en fonction de leur hydrophobicité et de leur charge. Cette technique permet la séparation des espèces neutres et également pour des espèces chargées de mobilités voisines en ajoutant au tampon un tensio-actif ionique, tel que le SDS pour qu'il associe aux espèces à séparer en agrégats sphériques appelés micelles constitués des groupements hydrophiles à l'extérieur et de groupements hydrophobes orientés vers le centre (BURGOT et BURGOT, 2011).

➤ **Electrophorèse à focalisation isoélectrique (CIEF) :**

Ce mode de séparation utilise aussi des capillaires neutres dont les extrémités sont placées dans une solution basique et une solution acide. L'intérieur du capillaire est rempli d'un mélange d'ampholytes contenant les analytes à séparer. Sous l'effet du champ électrique, les différents analytes se focalisent à leur point isoélectrique dans un gradient de pH allant de 3 à 9. Pour détecter les bandes immobilisées, le contenu du capillaire est poussé vers le détecteur sous l'effet d'une pression de gaz (SINE, 2003).

➤ **Isotachophorèse (ITP) :**

Elle permet la séparation et la concentration des analytes de même charge selon un gradient de champ électrique (SINE, 2003). Dans cette technique, on s'arrange pour que le flux endosmotique soit nul. 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 « meneurs » et « terminaux ». L'ensemble des molécules se déplacent alors à vitesse égale et les différentes

molécules se trouvent focalisées dans des zones très étroites, conduisant à une séparation à haute résolution (DAUNIZEAU, 2003).

➤ **Electrochromatographie capillaire (ECC) :**

C'est une technique de séparation mettant en œuvre les mécanismes de l'EC et de l'HPLC. Le capillaire est rempli d'une phase stationnaire et la phase mobile est hydrodynamique. Elle se déplace sous l'effet du champ électrique, le système de pompe n'est donc plus nécessaire pour assurer le déplacement du liquide. Le diamètre des particules est encore plus faible, améliorant ainsi la résolution des mélanges. Les espèces neutres vont se partager comme en HPLC entre la phase stationnaire et la phase mobile alors que les séparations des espèces chargées combinent les deux phénomènes de partage et de migration électrophorétique (BLESSUM *et al.*, 1999).

II.5. Facteurs influençant la séparation :

Divers paramètres influent sur la séparation tels que :

- **Le pH de la solution tampon :**

Il intervient à deux niveaux :

-d'une part, sur le degré de dissociation des molécules ;

-d'autre part, dans l'intensité du flux d'électroendosmose par le nombre de groupements silanols ionisés.

- **La différence de potentiel :**

Elle influence directement la valeur du champ électrique et par conséquent la mobilité des molécules.

- **Les caractéristiques géométriques du capillaire :**

Le diamètre et la longueur du capillaire ont une influence sur la durée de séparation et sur la résolution. Les pics deviennent plus symétriques lorsqu'on augmente le diamètre des capillaires mais en parallèle la résolution diminue conjointement. A priori, lorsque l'on veut diminuer la durée d'une analyse, il est possible d'utiliser des capillaires moins longs en augmentant la différence de potentiel appliquée, mais la technique a ses limites car plus le capillaire est court, plus la résistance électrique diminue, ce qui provoque une augmentation de l'intensité du courant et par conséquent une augmentation de la chaleur produite par effet joule (BURGOT et BURGOT, 2011).

II.6. Avantages et limites de l'EC :**Avantages :**

- Elle permet d'analyser des composés hydrosolubles, chargés ou non, ions inorganiques, molécules organiques et macromolécules avec une grande efficacité en temps très courts qui peuvent durer de 5 à 20 min par rapport à l'HPLC (COTTON *et al*, 2006).
- Faible coût d'utilisation grâce à l'absence du solvant organique, ce qui rend cette technique respectueuse de l'environnement que la technique d'HPLC.
- Automatisation complète de l'analyse et simplicité d'utilisation, permet une séparation, identification et quantification en une seule étape (DAUNIZEAU, 2003).
- La technique en capillaire présente une meilleure résolution que l'électrophorèse en gel d'agarose permettant une estimation plus précise des pics (FILALI MOUHIM, 2011).
- La quantité d'échantillon injectée est très faible (BURGOT et BURGET, 2011).
- Le contrôle de la température est plus important en EC grâce à un système de refroidissement qui limite l'effet joule (DAUNIZEAU, 2003).
- La reproductibilité de l'EC est supérieure à celle de l'électrophorèse en gel d'agarose (FILALI MOUHIM, 2011).

Limites :

- Le point faible de l'EC est sans doute la médiocre sensibilité de la détection réalisée par absorbance et ce du fait du faible diamètre interne du capillaire et par conséquent le faible chemin optique disponible (LE BRICON et TRIVIN, 2013).
- La précision de l'EC en matière de détermination quantitative est inférieure à celle des méthodes chromatographiques (HPLC et CPG) en raison du faible volume injecté. La difficulté d'obtention d'un flux électroosmotique reproductible surtout en mode micellaire contribue au manque de précision (BURGOT et BURGET, 2011).

II.7. Les différentes applications :

Les applications de l'EC sont multiples et couvrent de nombreux domaines dont :
Domaine agroalimentaire, hydrologie, pharmaceutique et la biologie clinique (voir annexe 03)

II.8. Electrophorèse des protéines sériques :

L'électrophorèse des protéines sériques (EPS) est un examen biologique simple qui permet une appréciation quantitative mais également qualitative des principales composantes protéiques du plasma. La séparation peut se réaliser soit dans un capillaire unique, soit dans un système multicapillaire. Le principe utilisé est celui de l'électrophorèse capillaire de zone à l'aide de capillaires en silice. Les protéines sont séparées selon leur charge en 6 zones : albumine, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , et γ -globulines. Mais, du fait du courant d'électroendosmose, ce sont les gammaglobulines qui sont détectées en premier par mesure de l'absorbance UV au niveau de l'extrémité cathodique du capillaire (BLESSUM *et al.*, 1999).

Généralement, 10 protéines sériques peuvent être identifiées sur l'électrophorégramme (Figure 7).

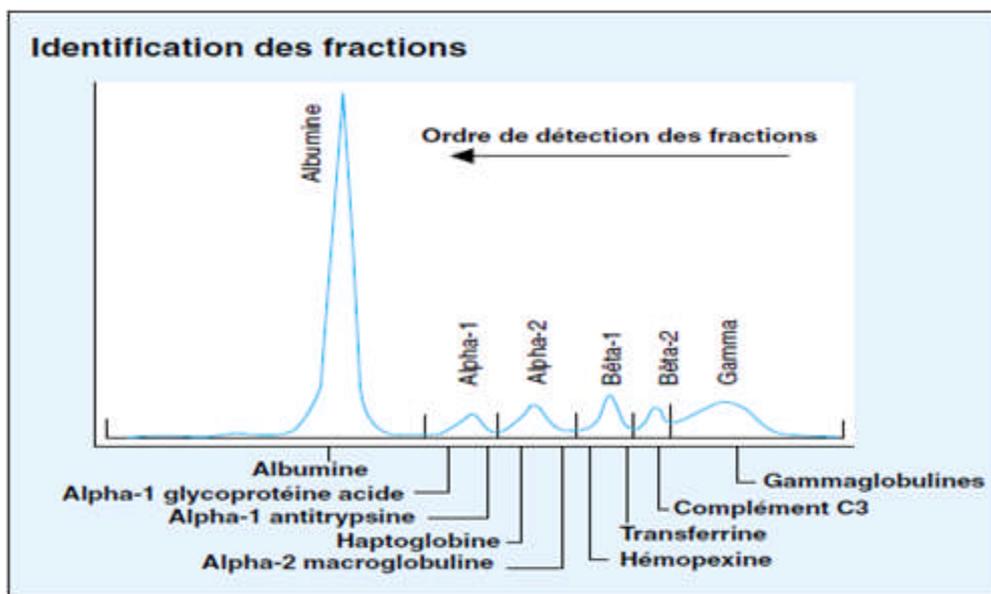


Figure 7 : Profil d'électrophorèse des protéines sériques obtenu par Capillarys (FILALI MOUHIM, 2011).

L'EPS est une analyse très utile dans de nombreuses situations pathologiques pour orienter un diagnostic, préciser la gravité d'une maladie ou suivre l'efficacité d'une thérapeutique (SZYMANOWICZ *et al*, 2006). Elle est prescrite dans les situations suivantes :

- un taux de protides circulants élevé ou très bas ;
- une élévation inexpliquée de la VS ;
- des infections répétées, en particulier bactériennes (recherche d'un déficit immunitaire responsable d'une hypogammaglobulinémie) ;
- une suspicion de syndrome inflammatoire ;
- une cirrhose éventuelle ;
- découverte de pics monoclonaux au niveau des gammaglobulines ou des bêta 2-globulines. Dans 25 % des cas, la présence d'une Igm est associée à une hémopathie maligne (MM, MGW, ...etc) (RETORNAZ *et al*, 2010).

II.9. Electrophorèse des protéines urinaires (EPU) :

Les protéines sont normalement quasiment absentes dans l'urine des sujets indemnes d'affections, leur présence dans les urines constitue toujours un symptôme pathologique (SZYMANOWICZI *et al.*, 2006).

L'EPU est classiquement utilisée pour caractériser le type de protéinurie (présence de protéines dans les urines). Une application très importante de l'EPU est l'identification et la quantification de la PBJ qui correspond à l'élimination urinaire de CLL monoclonales (FILALI MOUHIM, 2011). La PBJ peut apparaître sous la forme de monomères (22 kDa) ou de dimères (44 kDa) qui sont filtrés de manière libre dans l'urine et qui sont en fait plus facilement détectés dans l'urine que dans le sérum (BLESSUM *et al.*, 1999). L'EPU doit être réalisée parallèlement à l'électrophorèse des protéines sériques dans le cas du diagnostic des GM. Comme pour l'Igm sérique, la nature monoclonale de la PBJ ne peut être affirmée qu'après immunotypage (GUERIN, 2008).

III. Immunotypage (IT) :

III.1. Définition :

L'immunotypage est une analyse immunochimique d'une immunoglobuline monoclonale qui peut être réalisée par différentes techniques, éventuellement complémentaires : l'immunoélectrophorèse, l'immunofixation, l'immunoempreinte (western blot) et plus récemment, l'immunosoustraction qui est la dernière et la plus récente technique mise en place au laboratoire de biochimie pour typer une Igm (DAUNIZEAU, 2003).

III.2. Immunoélectrophorèse (IEP) :

L'immunoélectrophorèse combine électrophorèse en gel d'agarose et immunodiffusion. Le premier temps consiste à faire migrer le sérum à analyser dans un puits creusé dans le gel. Les protéines sont ainsi séparées selon leur mobilité électrophoretique. Dans un second temps, on dispose un antisérum polyspécifique ou monospécifique dans un réservoir parallèle au champ de migration.

La diffusion des Ag et des Ac les uns vers les autres entraîne alors la formation d'arcs de précipitation révélés par une coloration au bleu de Coomassie.

Cette technique semi-quantitative nécessite l'utilisation d'un sérum témoin en parallèle de l'échantillon patient afin de comparer les arcs obtenus (aspect, position, intensité).

L'IEP est une méthode d'analyse très spécifique et très sensible. Cependant, la lecture et l'interprétation des plaques sont difficiles et nécessitent un personnel formé et expérimenté. Elle a été abandonnée en 1995 au profit de l'immunofixation (GUERIN, 2008).

III.3. Immunofixation (IF) :

L'immunofixation est la technique la plus utilisée par les laboratoires pour la recherche d'Igm. Elle consiste à déposer du sérum sur un gel. Après séparation électrophorétique des protéines sériques, des Ac spécifiques de chaque type d'Ig (IgG, IgA, IgM, IgD et IgE) et des chaînes légères (Kappa ou Lambda) sont déposés sur le gel. Il apparaît ainsi des bandes plus ou moins étroites sur le gel, au niveau où se situent les différentes Ig.

Cette technique est également applicable pour la recherche et le typage d'une PBJ avec ou sans concentration préalable.

L'IF est une méthode simple, résolutive, plus rapide (délai de réponse en 3h), un peu plus sensible (seuil de 0,5 à 1g/l), spécifique et d'interprétation facile que l'immunoélectrophorèse, l'IF n'est cependant pas dénuée de pièges (DUC *et al*, 1988).

III.4. Immunosoustraction (IS) :

Cette technique s'est développée grâce à l'émergence de l'EC qui est son support direct. Ce test est réalisé sur les protéines sériques et urinaires, permet l'identification de la chaîne lourde et de la chaîne légère du CM (DAUNIZEAU, 2003).

III.4.1. Principe de base :

Deux méthodologies existent : La première, celle de Beckman, utilise des billes de sépharose sur lesquelles sont fixés des anticorps spécifiques réagissant respectivement avec les chaînes lourdes γ , μ , α et les chaînes légères κ et λ ; un puits sert de référence. Les complexes antigènes-anticorps précipitent alors au fond des puits par sédimentation. Les surnageants sont ensuite prélevés et injectés dans les capillaires où a lieu l'étape classique de séparation électrophorétique (BOSSUYT *et al.*, 1998 ; BLESSUM *et al.*, 1999).

La deuxième, de Sebia, l'immunosoustraction est basée sur l'utilisation des anticorps spécifiques en milieu liquide, ce qui présente l'avantage d'obtenir des immuns complexes solubles. L'injection dans les capillaires se fait donc plus rapidement, sans étape de sédimentation. Ces complexes ainsi formés, plus lourds que les autres fractions protéiques vont migrer avant l'albumine (apparaît en position très anodique) ne gênant pas la lecture des six traces d'électrophorèses. La superposition d'un des profils antisérum avec le profil protéique de référence ELP permet de visualiser la disparition et / ou la diminution d'un pic monoclonal sur le profil antisérum et d'en déduire une gammopathie (FILALI MOUHIM, 2011).

III.4.2. Les étapes de réalisation de l'IS :

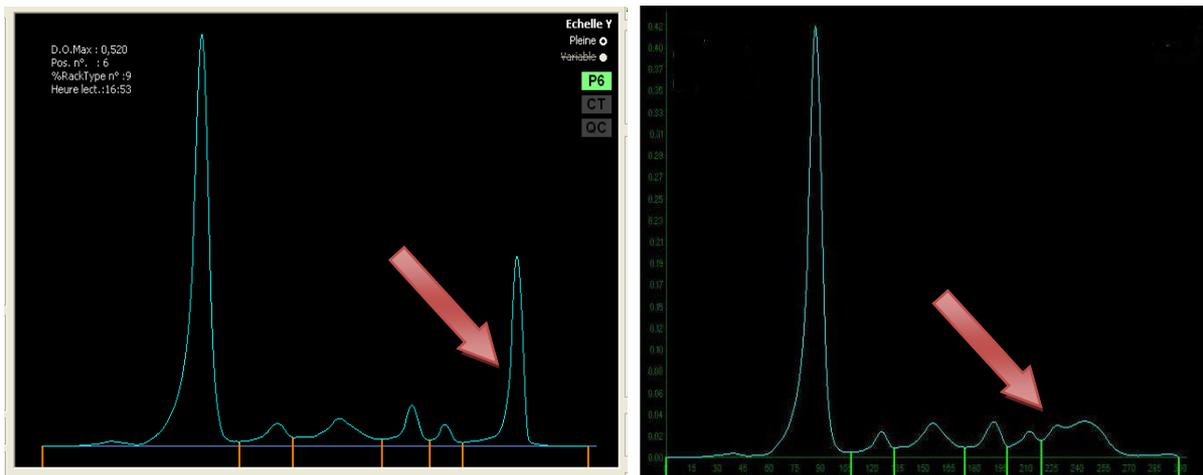
L'immunosoustraction se réalise en quatre étapes :

1. Dilution du sérum ou de l'urine dialysée dans un diluant spécifique contenu dans le double puits de la barrette antisérums. La dilution est adaptée à la concentration en immunoglobulines de l'échantillon.
2. Mélange de l'échantillon dilué avec les différents antisérums. Le complexe antigène-anticorps se forme rapidement en milieu liquide sans étape d'incubation, ni de sédimentation.
3. Injection des échantillons traités par aspiration dans 6 capillaires (côté anodique) puis séparation électrophorétique des protéines en milieu alcalin par application d'une différence de potentiel de plusieurs milliers de volts aux bornes des capillaires. La détection directe des protéines est effectuée à 200 nm (côté cathodique).

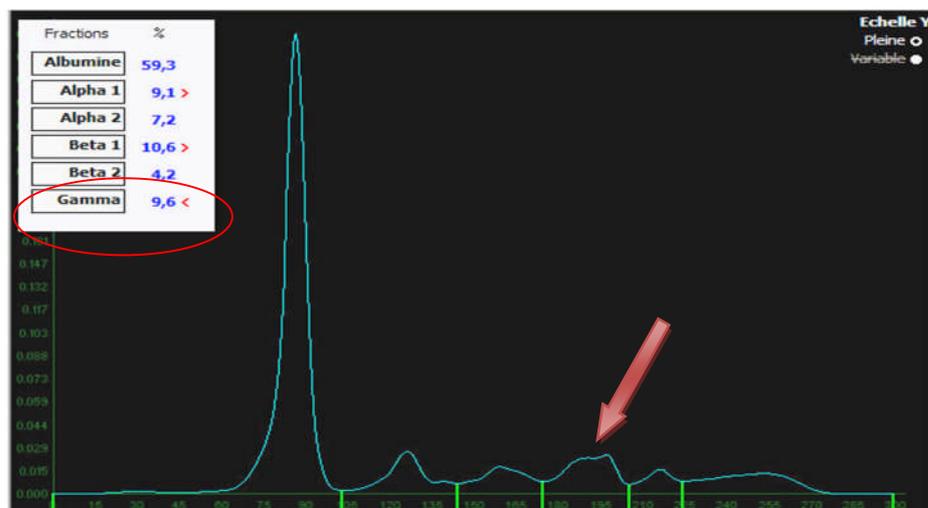
4. Superposition du profil ELP et des profils antisérums (Ig G, Ig A, Ig M, Kappa et Lambda) permettant la caractérisation de la protéine monoclonale (FILALI MOUHIM, 2011).

III.4.3. Anomalies sur l'EPP pour lesquelles un IT est recommandé :

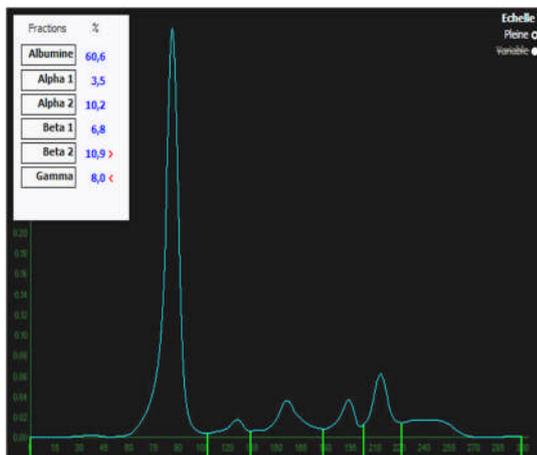
- Tout pic ou toute déformation visible dans la zone gamma ;



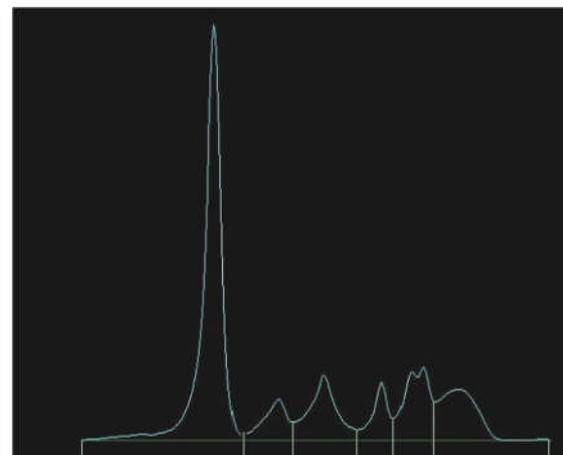
- Augmentation de la zone bêta-1 (hors légère augmentation des bêta-1 dans les anémies ferriprives).
- Toute déformation de la zone bêta-1 surtout si associée à une hypogammaglobulinémie.



- Augmentation de la zone bêta-2 ($\text{bêta-2} \geq \text{bêta-1}$) hors contexte inflammatoire ou hépatique ;
- Déformation de la zone bêta-2 surtout si associée à une hypogammaglobulinémie ;

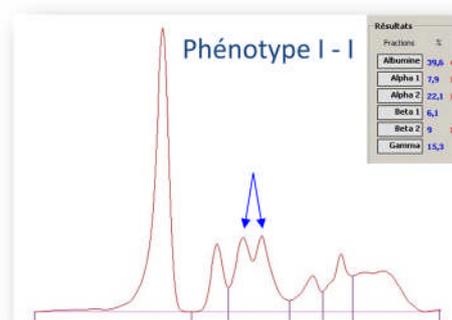
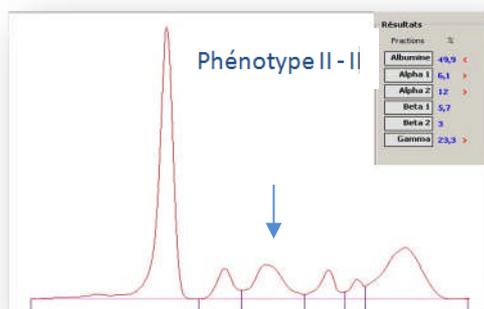


Pic monoclonal en bêta-2



Pic monoclonal ou fibrinogène?
Confirmation par immunotypage

- Augmentation de la zone alpha-2 (sérum non hémolysé, hors contexte inflammatoire ou néphrotique), surtout si cette augmentation est associée à une hypogammaglobulinémie
- Dédoublage de la zone alpha-2 est, le plus souvent, le signe d'un phénotype hétérozygote de l'haptoglobine et pas d'une protéine monoclonale.



III.4.4. Avantages et limites de l'IS :

Avantages :

L'immunoélectrophorèse qui reste une technique de référence pour la recherche d'une Igm, a été remplacée progressivement par des techniques plus automatisées, donc plus rapides mais aussi plus faciles à interpréter (immunosoustraction).

Certaines études, dont celle publiée en 2007 par Yang *et al*, ont comparé la performance de l'immunofixation face à l'immuno-soustraction. Différents points en ressortent. Il apparaît tout d'abord que ces deux techniques sont simples d'exécution, d'un coût assez comparable et obtiennent des résultats concordant à 80%. Cependant, en termes de délai de réalisation, l'IS permet de confirmer la présence de l'Igm de façon plus rapide que l'IF (10 échantillons à l'heure contre 4 en une heure et demie) (FILALI MOUHIM, 2011).

Limites :

Même si l'immunosoustraction est très séduisante, rapide et automatisable, elle n'est pas encore aussi sensible que l'immunofixation en gel pour le typage d'un CM, puisque ne permet ni la caractérisation des IgD, des IgE, ni celles des CLL monoclonales.

Un autre inconvénient de cette méthode découle de son principe lui-même. L'identification d'Igm n'est possible qu'en présence de pic étroit et bien individualisable à l'EPS, permettant d'appliquer l'immunosoustraction qui fera disparaître le pic étroit. Ainsi, toute Igm migrant en dehors de zone gamma peut être méconnue, de même la présence d'Igm en faible quantité dans le sérum peut passer inaperçue (FILALI MOUHIM, 2011).

Type de l'étude :

Etude prospective et descriptive de l'épidémiologie et les résultats d'exploration immunologique d'un groupe de patients atteints de gammopathie monoclonale.

Objectifs de l'étude :

L'objectif principal de notre étude est de montrer l'intérêt d'une technique immunochimique (immunosoustraction) pour compléter le diagnostic des gammopathies monoclonales.

MATERIEL ET METHODES :**I. Patients inclus :**

Entre Mars et Juillet 2015, 51 patients sont pris en charge pour le diagnostic de gammopathies monoclonales au service de Biochimie du CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou. Ces patients sont originaires pour la grande majorité d'entre eux de Tizi ouzou et environs.

On peut les séparer en deux groupes : ceux pris en charge suite à l'apparition de signes cliniques évocateurs d'une hémopathie, et ceux pour qui la découverte est fortuite, à l'occasion d'un bilan de routine (NFS, VS, Calcémie, ...) ou bilan d'extension d'une autre pathologie.

Nous avons inclus dans notre étude les patients présentant à l'EPP et/ou à l'électrophorèse des protéines urinaire, une anomalie évoquant une GM (pic monoclonal, hypogammaglobulinémie, hypoprotidémie,...) qui a fait l'objet d'une exploration biochimique complémentaire.

❖ Démarche diagnostic :

L'identification du composant monoclonal est un des critères nécessaires au diagnostic du GM. Plusieurs explorations immunochimiques sont disponibles pour effectuer ce diagnostic. L'exploration biochimique a lieu à la fois dans le sang et dans les urines avec une démarche très similaire.

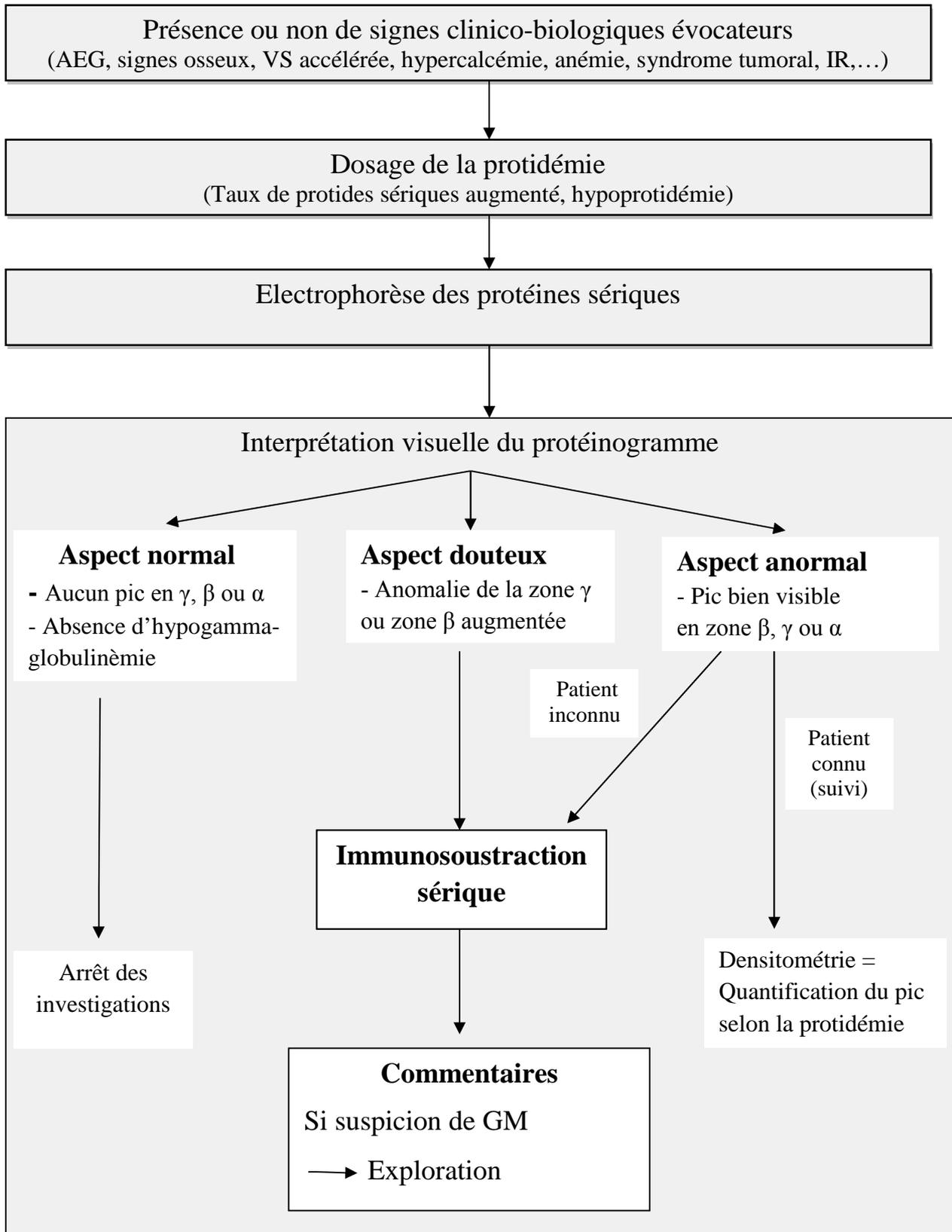


Figure 8 : Schéma illustrant la démarche diagnostique dans l'exploration d'une Igm dans le sérum.

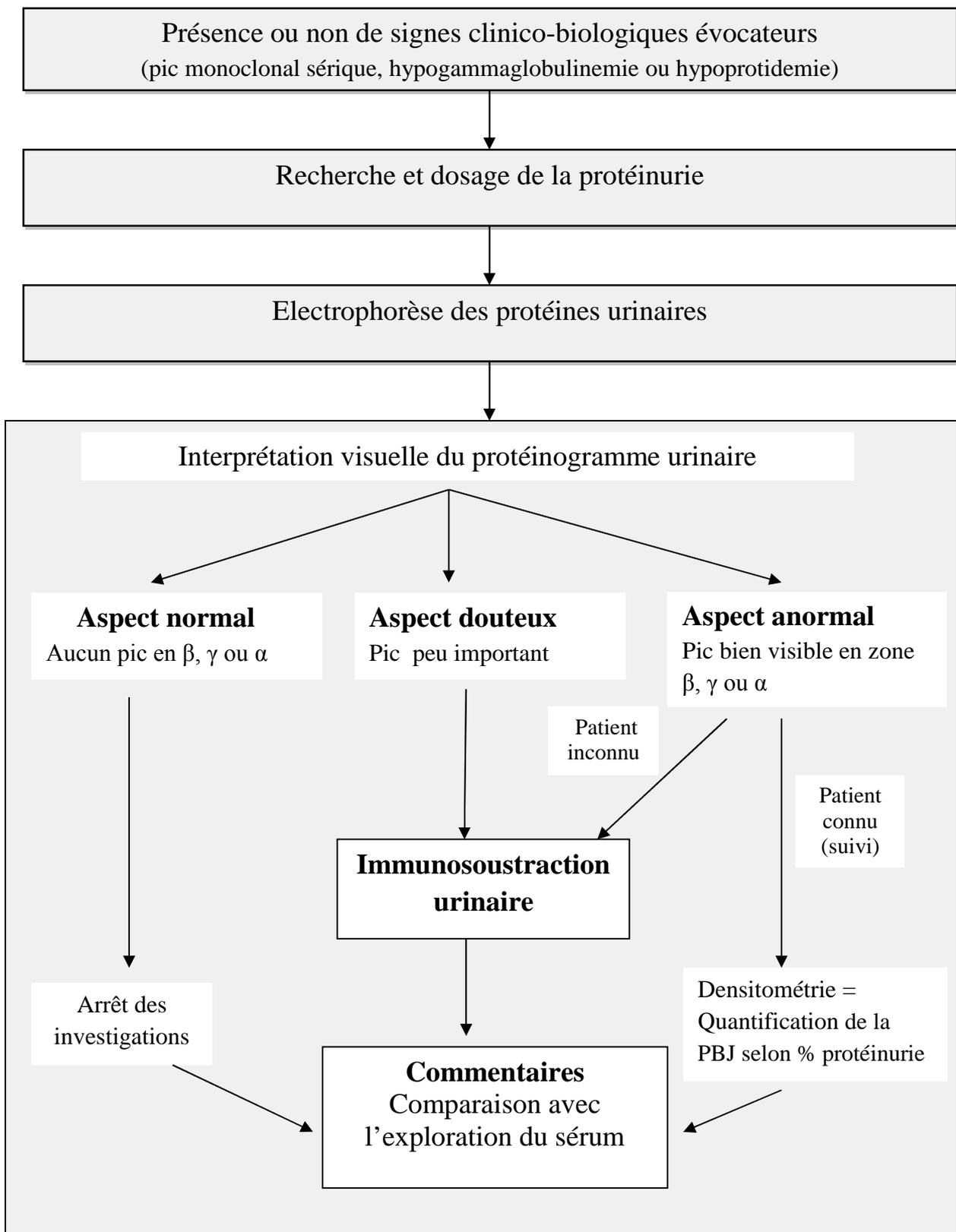


Figure 9 : Schéma illustrant la démarche diagnostique dans l'exploration d'une Igm dans les urines.

I. Méthodes :**II.1. Recueil des échantillons :**

- Au niveau sanguin :

Pour chaque patient, il est réalisé un prélèvement sanguin, effectué sur tube sec (sans anticoagulant). Ces échantillons sanguins sont acheminés au laboratoire, puis centrifugés à 3100 tr/min pendant 2 min à l'aide d'une centrifugeuse *NAHITA Multibas centrifuge*.

L'analyse s'effectue soit sur des sérums frais, soit sur des sérums conservés. Les échantillons peuvent être conservés au maximum 10 jours au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Pour des conservations prolongées, il faut congeler les échantillons rapidement (au maximum dans les 8 heures après le prélèvement). Les sérums congelés sont stables 1 mois.

- Au niveau urinaire :

L'analyse se fait sur des urines des 24h (impérativement accompagnées de valeur de la diurèse), une quantité de cette diurèse (5ml) est centrifugée à 6000 tr/min pendant 10 min sur une centrifugeuse *NÜVE NF800*.

L'envoi au laboratoire d'un échantillon d'urine obtenu à partir d'un recueil de 24h, en même temps que le sérum est exigé mais n'a pas été toujours respecté.

Les échantillons peuvent être conservés une semaine au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Pour des conservations prolongées, il est recommandé de congeler les échantillons à - 70 °C ; les échantillons congelés sont stables au minimum 1 mois.

II.2. Dosage de la protidémie :

Le dosage de la protidémie à été réalisé par technique colorimétrique de *Biuret* sur automate *ARCHITECT plus ci 4100* par l'utilisation de réactif de Sulfate de cuivre en solution alcaline.

En milieu alcalin, les protéines qui possèdent au moins quatre liaisons peptidiques forment avec les ions cuivriques (Cu^{2+}) un complexe bleu-violet dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en protéines. Un dosage colorimétrique est donc possible à 540 nm (GUERIN, 2008). Les valeurs de référence du laboratoire sont comprises entre 58 et 88g/l.

Le dosage de la protidémie est nécessaire pour la distribution des concentrations de différentes fractions protéiques du sang.

II.3. Dosage de la protéinurie des 24h :

La technique utilisée pour le dosage des protéines urinaires est la technique au rouge pyrogallol sur automate *ARCHITECT plus ci 4100*. Le complexe formé en milieu acide par le colorant, les ions molybdates et les groupements aminés des protéines, est mesuré par colorimétrie à 600 nm. Les valeurs physiologiques se situent en dessous de 150 mg/24h.

Valeurs de références :

- 24 heures : 10-140 mg /l.
- Au repos : 50- 80 mg /jour.
- Après un effort intense : < 250 mg /jour.

II.4. Electrophorèse des protéines sériques (EPS) :

L'analyse des protéines sériques a été réalisée par la technique d'électrophorèse capillaire sur automate *CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING*.

Le système *CAPILLARYS* utilise le principe de l'électrophorèse capillaire en solution libre. Il permet la séparation en milieu basique (pH 9,9) des protéines du sérum humain et de l'urine. Ce système comprend 8 capillaires en parallèle, permettant 8 analyses simultanées.

L'injection dans les capillaires de l'échantillon (dilué dans le tampon d'analyse) est effectuée à l'anode par aspiration. La séparation est ensuite réalisée en appliquant une différence de potentiel de plusieurs milliers de volts aux bornes de chaque capillaire. La détection directe des protéines est effectuée à 200 nm côté cathode. Les capillaires sont ensuite lavés par une solution de lavage, puis par le tampon d'analyse. Un logiciel permet la reconstitution des courbes sous forme de protéinogramme.



Figure 10 : Capillarys 2 Flex Piercing

Les protéines du sérum normal humain sont séparées en six fractions majeures. Un exemple de tracé électrophorétique obtenu sur le Capillarys au laboratoire de Biochimie de CHU de Tizi-Ouzou est illustré par la figure suivante.

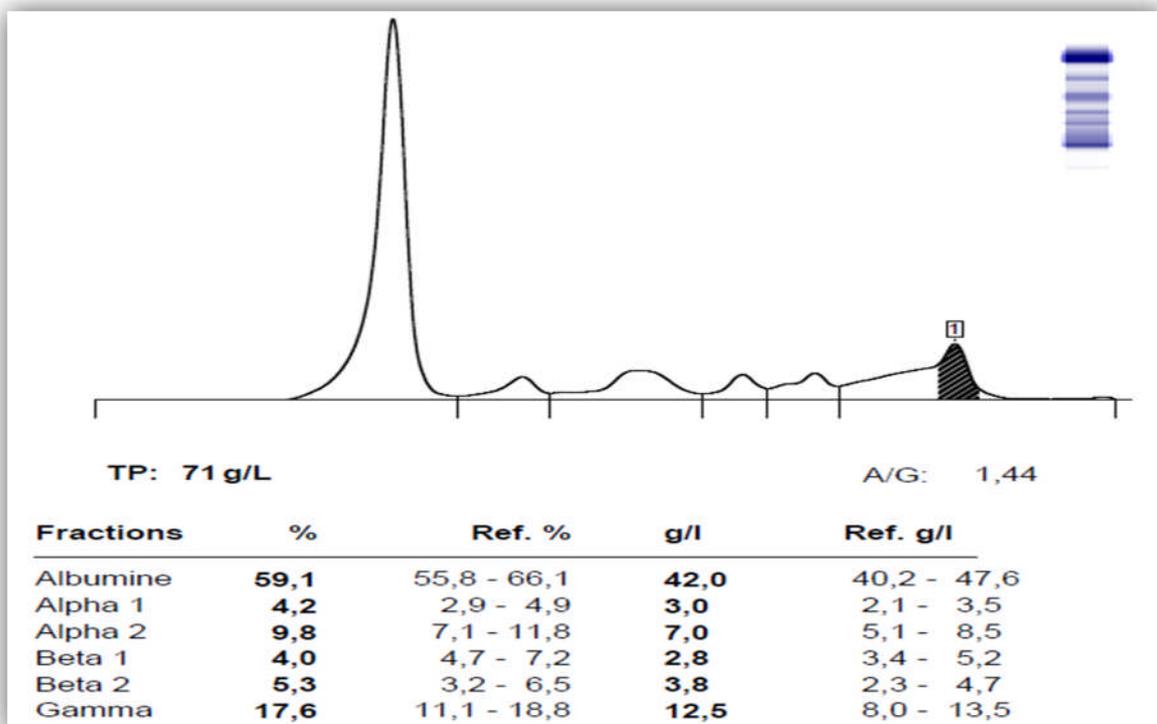


Figure 11 : Exemple de tracé électrophorétique obtenu sur Capillarys au laboratoire de Biochimie du CHU de Tizi-Ouzou.

- Les valeurs de référence :

Fractions	%	g/l
Albumine	55,8 - 66,1	40,2 - 47,6
α 1-globulines	2,9 - 4,9	2,1 - 3,5
α 2-globulines	7,1 - 11,8	5,1 - 8,5
B 1-globulines	4,7 - 7,2	3,4 - 5,2
B 2-globulines	3,2 - 6,5	2,3 - 4,7
γ -globulines	11,1 - 18,8	8 - 13,5

II.5. Electrophorèse des protéines urinaires (EPU) :

L'analyse des urines est associée à la recherche et à la détection d'une éventuelle PBJ. L'électrophorèse des protéines urinaires utilise le même principe que l'électrophorèse des protéines sériques, mais nécessite une concentration préalable, comprenant les étapes suivantes:

- selon le TP, les échantillons sont préparés en réalisant des dilutions selon le tableau suivant :

Concentration TP	Pré-dilution	Volume d'urine	Volume Δ H ₂ O
TP < 1 g/l	NON	2 ml	18 ml
1 g/l < TP < 3g/l	NON	0,5 ml	19,5 ml
TP > 3 g/l	Dilution dans Δ H ₂ O pour obtenir TP=3g/l	0,5 ml	19,5ml

- centrifugation pendant 40 min à 6200 tr/min dans des tubes SEBIA et récupérer le surnageant ;
- pour la dialyse : ajuster le volume à 20 ml avec le tampon de dialyse dilué ;
- centrifugation pendant 40 min à 6200 tr/min ;
- récupérer le reste d'échantillon, si le volume est inférieur à 0.5 ml : ajuster à 0.5 ml avec le tampon de dialyse dilué ;

- le volume récupéré est en suite mis dans un tube sec pour réaliser l'électrophorèse urinaire sur automate *CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING*.

II.6. Immunotypage par immunosoustraction :

L'interprétation du protéinogramme obtenu par l'EPS, permet de décider s'il serait nécessaire ou non d'ajouter une exploration complémentaire en cas d'anomalie évoquant une Igm. La technique d'immunotypage ou d'immunosoustraction par électrophorèse capillaire est alors réalisée pour l'identification du composant monoclonal. L'EPS est réalisée avant (tracé de référence) et après incubation du sérum avec les antisérums standards (anti-gamma, anti-mu, anti-alpha, anti-lambda et anti-kappa) contenu dans des barrettes déposées sur le portoire de l'échantillon (Figure12).

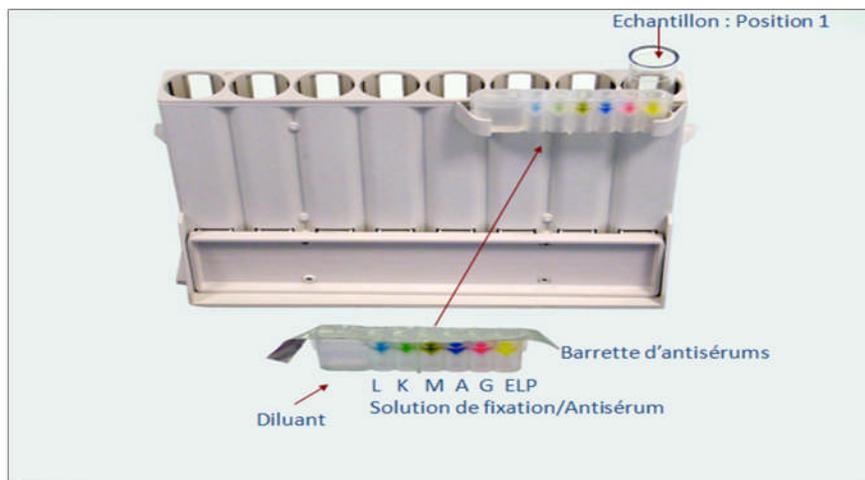


Figure 12 : Portoire d'échantillon contenant une barrette d'antisérums.

Après une séparation électrophorétique, l'analyse des résultats se fait en comparant les six tracés électrophorétiques de l'échantillon testé. La présence d'une Igm se traduit par la disparition et/ou la diminution du pic mis en évidence sur le tracé de référence. Un exemple de résultat d'immunosoustraction est illustré dans la figure suivante :

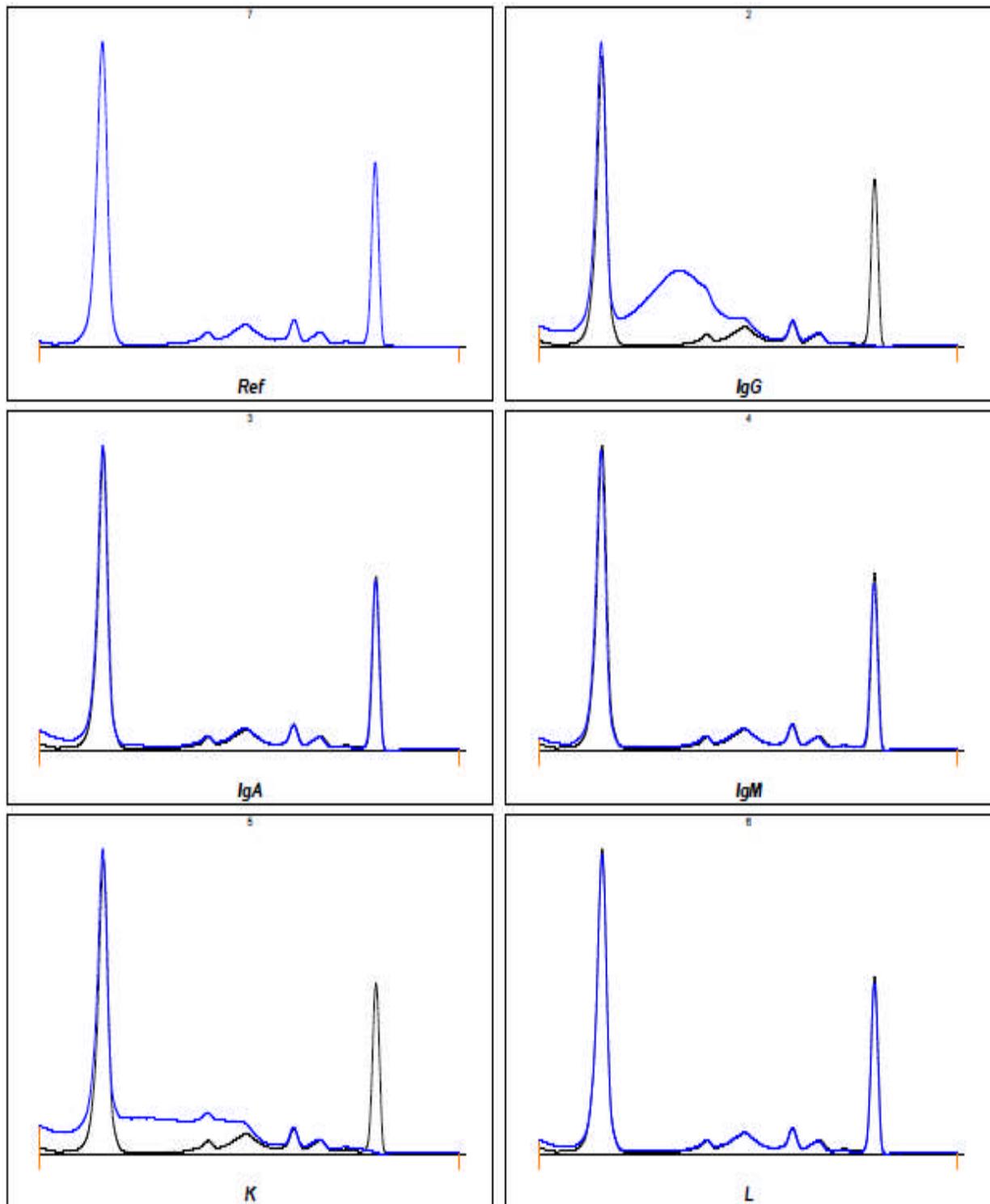


Figure 13 : Résultat de l'immunotypage par immunosoustraction sur le Capillarys révélant une IgM de type IgG kappa réalisé au laboratoire de Biochimie de CHU de Tizi-Ouzou.

Pour le typage des protéines urinaires, il s'agit du même principe que l'immunotypage sérique. Un exemple de profil d'immunotypage urinaire est illustré dans la figure suivante :

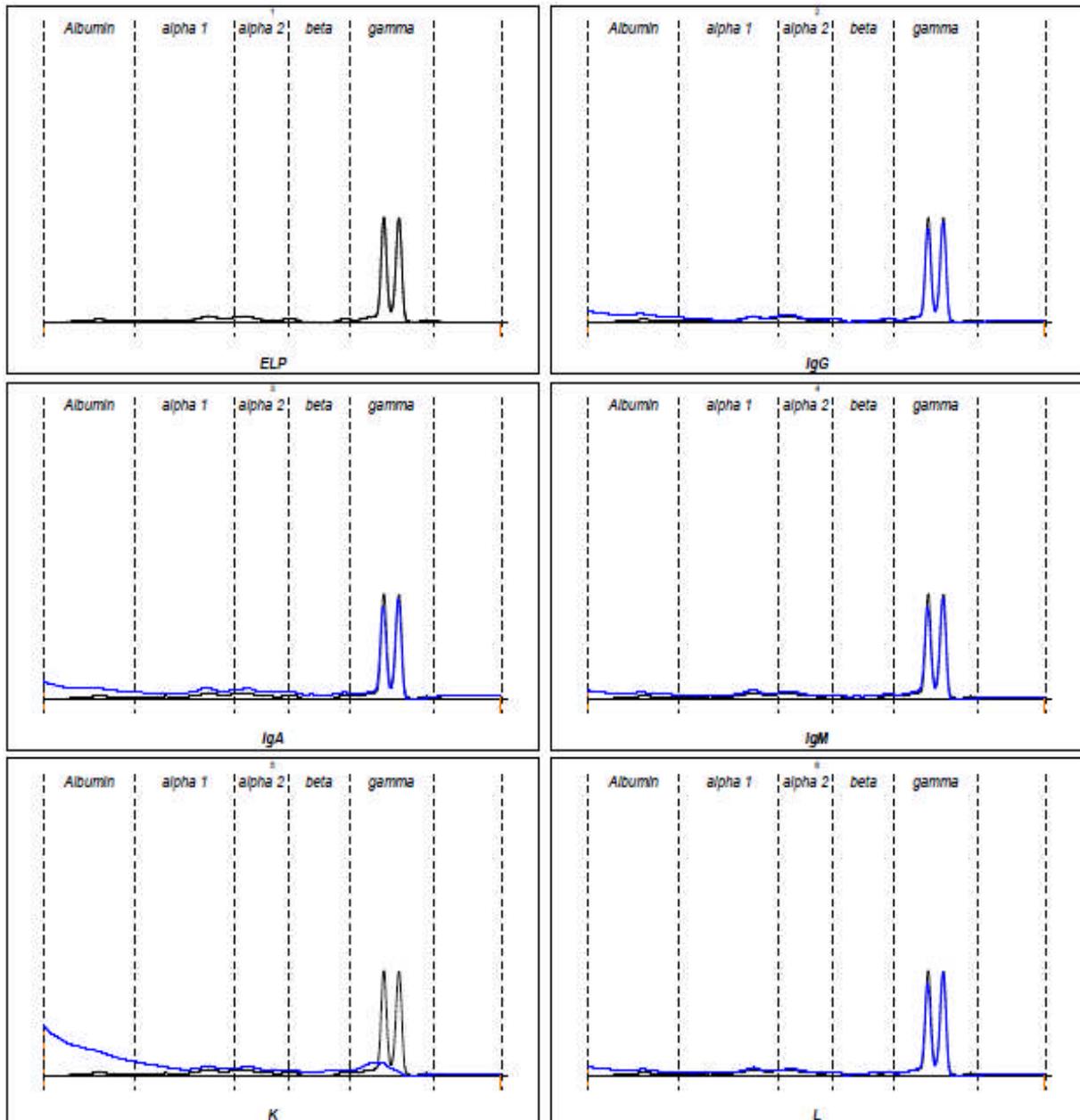


Figure 14 : Résultat de l'immunotypage urinaire par immunosoustraction sur le Capillarys révélant des chaînes légères de type kappa réalisé au laboratoire de Biochimie de CHU de Tizi-Ouzou.

II.7. Traitement par β -mercaptoéthanol :

Une des difficultés rencontrée dans l'interprétation, est la polymérisation des Igm qui se manifeste par le dédoublement du pic révélé sur le profil de l'EPS. Pour pallier à ce problème, on traite le sérum du patient par le β -mercaptoéthanol dilué à 1% pendant 10 min à température ambiante.

Sachant que le β -mercaptoéthanol est un composé chimique de formule C_2H_6OS , « hybride » de l'éthylène glycol et de l'éthanedithiol. A la température ordinaire, c'est un liquide à l'odeur nauséabonde. La présence de la fonction thiol -SH fait du β -mercaptoéthanol un réducteur très utilisé en biochimie pour protéger les protéines contre l'oxydation. Il est communément employé pour réduire les ponts disulfures présents dans les protéines et peut jouer un rôle d'antioxydant biologique. Il est aussi utilisé du fait de son groupe hydroxyle, qui le rend miscible dans l'eau et diminue la volatilité (donc l'odeur) du thiol.

II.7. Outils statistiques :

Les données ont été saisies et traitées par le logiciel Excel 2007. Les résultats ont été exprimés par la moyenne \pm écart type pour les variables continues et par pourcentage (effectif) pour les variables discontinues. Ils sont reportés dans des tableaux, ou représentés sous formes d'histogrammes, de secteurs ou de barres, ...

RESULTATS :**I. Caractéristiques de la population étudiée :****I.1. Répartition des GM selon le sexe :**

Notre population étudiée comprend 29 patients de sexe masculin et 22 de sexe féminin, soit respectivement 56,86% et 43,14% de l'ensemble des cas. Le sexe-ratio est de 1,32.

Le graphique ci-dessous montre la répartition des cas de notre population selon le sexe :

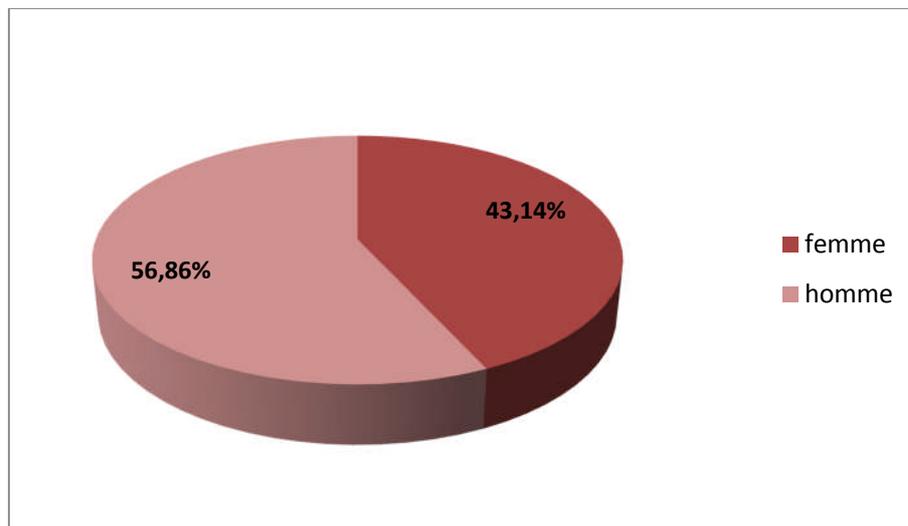


Figure 16 : Représentation graphique de la répartition des patients selon le sexe.

I.2. Répartition selon l'âge :

L'âge au moment du diagnostic des cas du GM de la population étudiée varie entre 29 et 84 ans, avec une moyenne de $58,91 \pm 10,31$ ans. Un maximum de fréquence est observé dans la tranche d'âge comprise entre 60 et 70 ans.

Tableau II : Répartition des cas de GM selon les tranches d'âge.

Age	Patients	%
< 50	8	15,69
50-60	17	33,33
60-70	20	39,21
>70	6	11,76

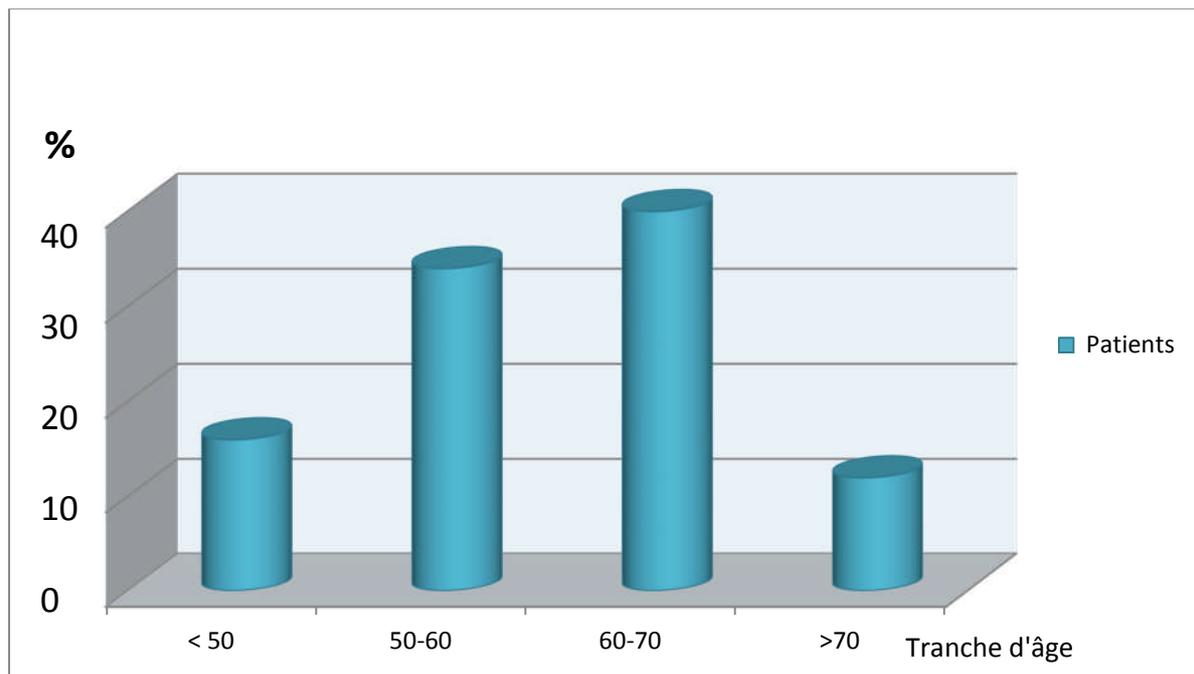


Figure 17 : Répartition des cas de GM selon les tranches d'âge.

I.3. Répartition selon le service d'admission:

Tableau III : Répartition des patients selon le service d'admission.

Service	Patients	%
Hématologie	28	54,9
Externe	10	19,61
Médecine interne	4	7,84
Néphrologie	3	5,88
Sanatorium	2	3,92
PU médicale	1	1,96
Infectieux	1	1,96
Neuro-chirurgie	1	1,96
PU chirurgie	1	1,96

La plupart des patients sont suivis au niveau du service d'hématologie (54,9%). Les patients consultant à titre «externes» représentent 19,61% de l'ensemble des patients de l'étude.

La répartition des patients selon le service d'admission est illustrée dans le graphique suivant :

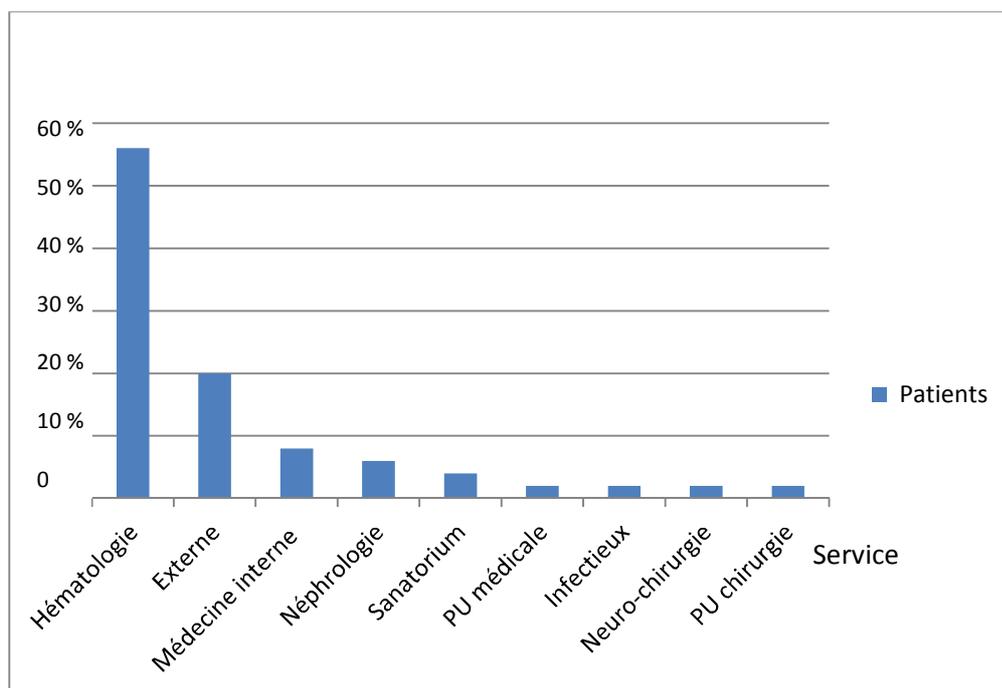


Figure 18 : Répartition des patients selon le service d'admission.

I.4. Répartition selon le type de GM:

Tableau IV : Répartition selon le type de GM.

Type de GM	Patients	%
Maligne	31	60,78
Bénigne	20	39,22

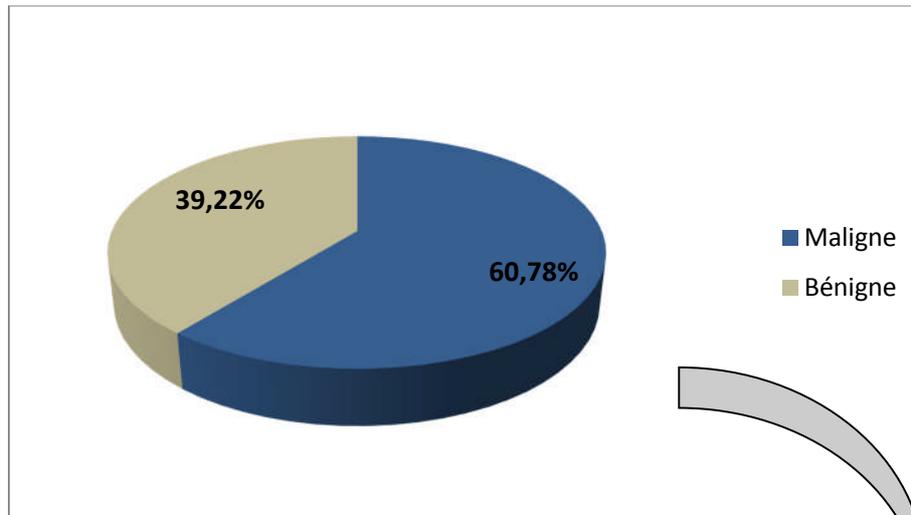


Figure 19 : Répartition selon le type de GM.

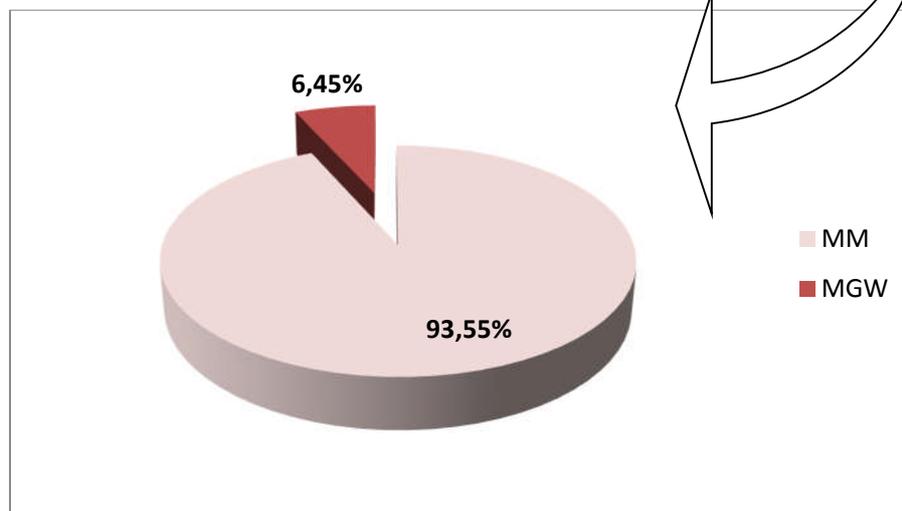


Figure 20 : Répartition étiologique des GM.

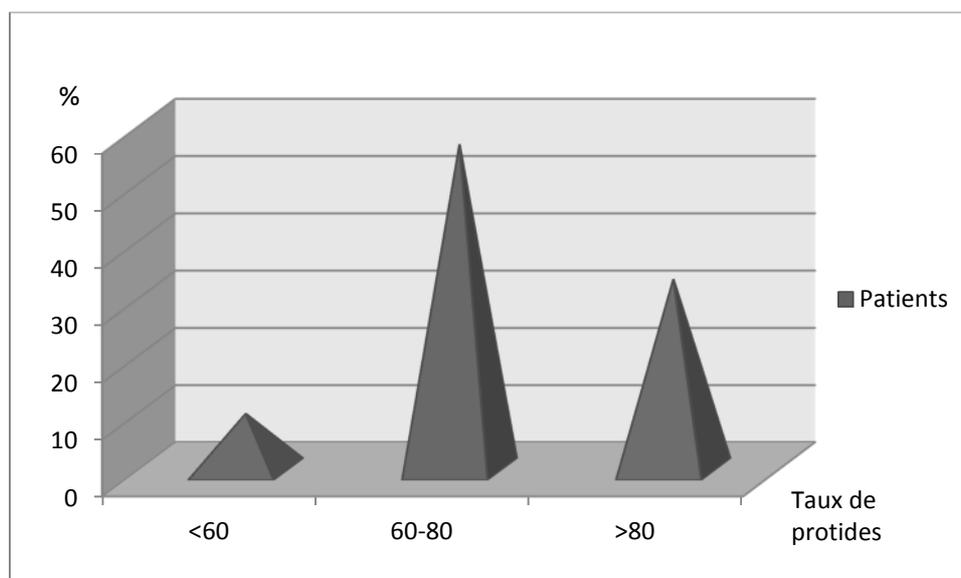
Notre population se répartit, comme l'illustre bien la figure 19, en deux grandes catégories : les gammopathies monoclonales malignes (60,78%) et les gammopathies monoclonales bénignes (39,22%).

La figure 20 représente la répartition des cas de GM maligne selon le type d'hémopathie maligne en cause. On note la plus forte prédominance du MM qui représente à lui seul plus de 90% des cas. La MGW occupe la seconde position avec près de 7 % des cas (2 cas).

II. Résultats du dosage de la protidémie :**Tableau V :** Répartition selon le taux de protide.

TP	Patients	%
<60	5	9,8
60-80	29	56,86
>80	17	33,33
Total	51	100

Les résultats du dosage de la protidémie sont illustrés dans le graphique suivant :

**Figure 21 :** Répartition selon le taux de protides.

D'après les résultats du dosage de la protidémie chez les patients de notre étude, on constate que plus de la moitié de cette population présente un taux de protide normal. L'hyperprotidémie est retrouvée chez 33,33 % des cas. Par ailleurs, l'hypoprotidémie n'est constatée que chez 9,8 % des patients.

III. Résultats de l'EPS :

III.1. Répartition des CM selon la zone de migration :

Tableau VI : Répartition des CM selon la zone de migration

Zone	Nombre de CM	%
Gamma	36	70,59
Bêta	15	29,41

Le graphique ci-après montre la répartition des composants monoclonaux selon la zone de migration.

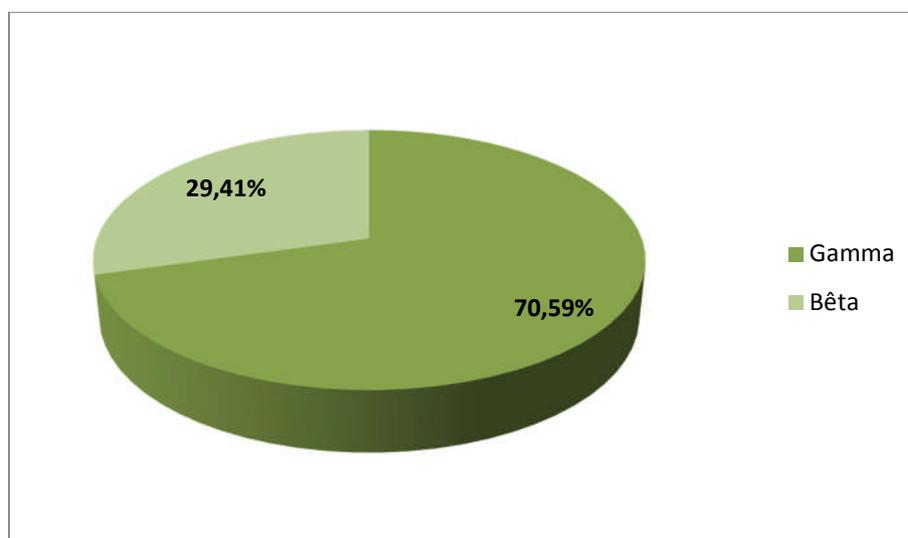
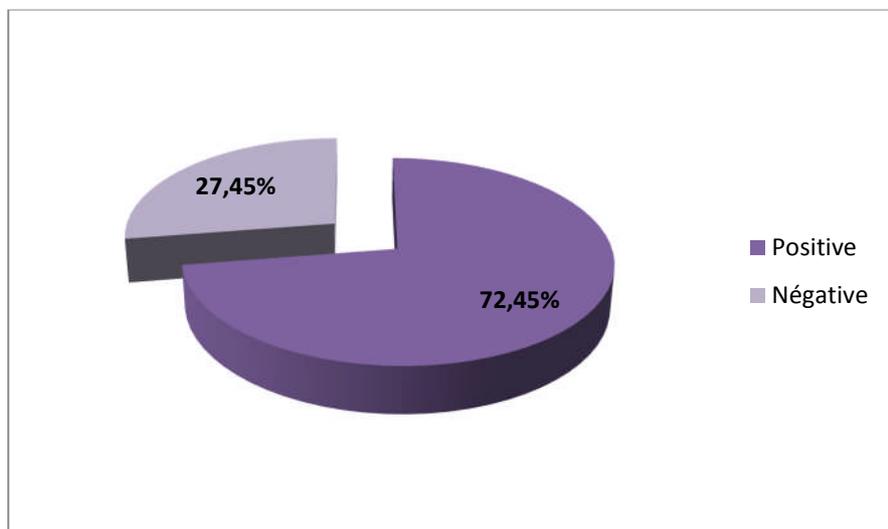


Figure 22 : Répartition des CM selon la zone de migration.

Dans notre étude, on a trouvé que les immunoglobulines migrent le plus souvent dans la zone des γ -globulines (70,59%) et un peu moins dans la zone des β -globulines (29,41%).

III.2. Répartition selon l'hypogammaglobulinémie polyclonale:**Tableau VII :** Répartition selon l'hypogammaglobulinémie polyclonale.

Hypogammaglobulinémie Polyclonale	Nombre de patients	%
Positive	37	72,45
Négative	14	27,45
Total	51	100

**Figure 23 :** Répartition des patients selon l'hypogammaglobulinémie.

D'après les résultats obtenus par EPS, la plupart des patients présentent une hypogammaglobulinémie polyclonale (72,45%).

III.3. Répartition selon la concentration du CM :

Tableau VIII : Répartition des patients selon la concentration du CM.

Concentration du CM (g/l)	Patients	%
< 8	17	36,17
[8-20]	15	31,91
> 20	15	31,91

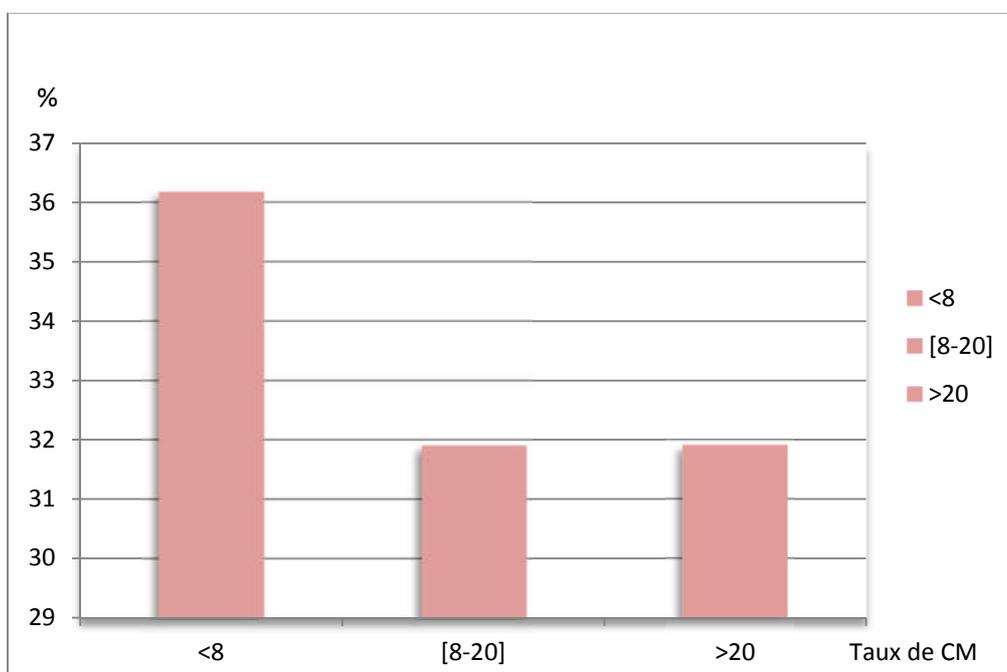


Figure 24 : Répartition selon la concentration du CM.

On constate que la plus part des composants (36,17%) ont une concentration inférieure à 8g/l, par ailleurs on note 31,91% des cas présentent une concentration entre 8-20g/l et de même pour ceux qui présentent une concentration supérieur à 20g/l. Notant que quatres cas présentent des profils oligoclonaux qui sont inquantifiables.

IV. Résultats de l'immunotypage :

IV.1. Répartition des GM selon le type de composant monoclonal CM:

Tableau IX : Répartition des GM selon le type de CM.

Type du CM	Nombre de patients	%
IgG	27	52,94
IgA	13	25,49
oligoclonal	4	7,84
IgM	3	5,88
Biclonal	3	5,88
CCL κ	1	1,96
totale	51	100

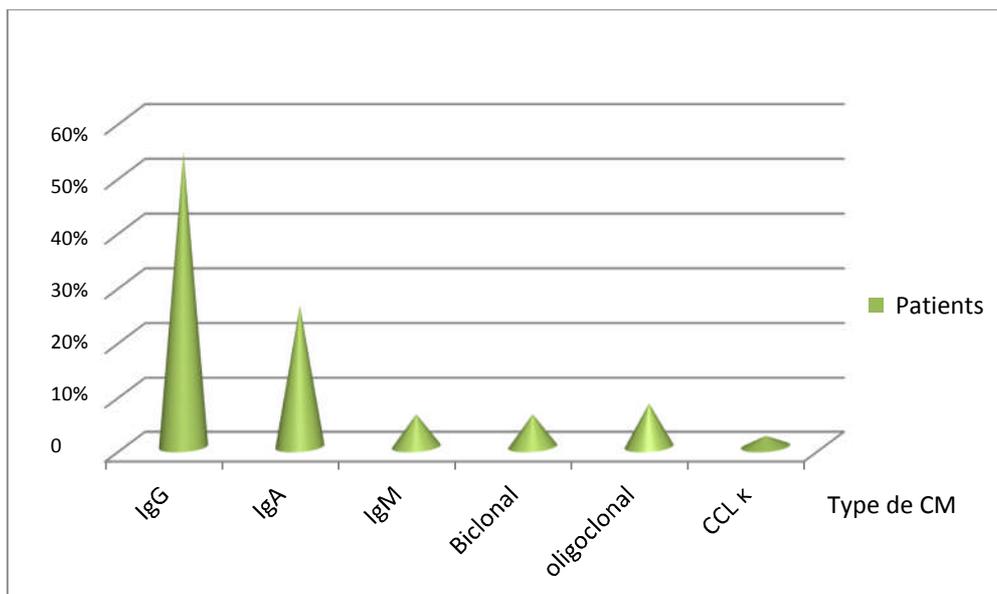


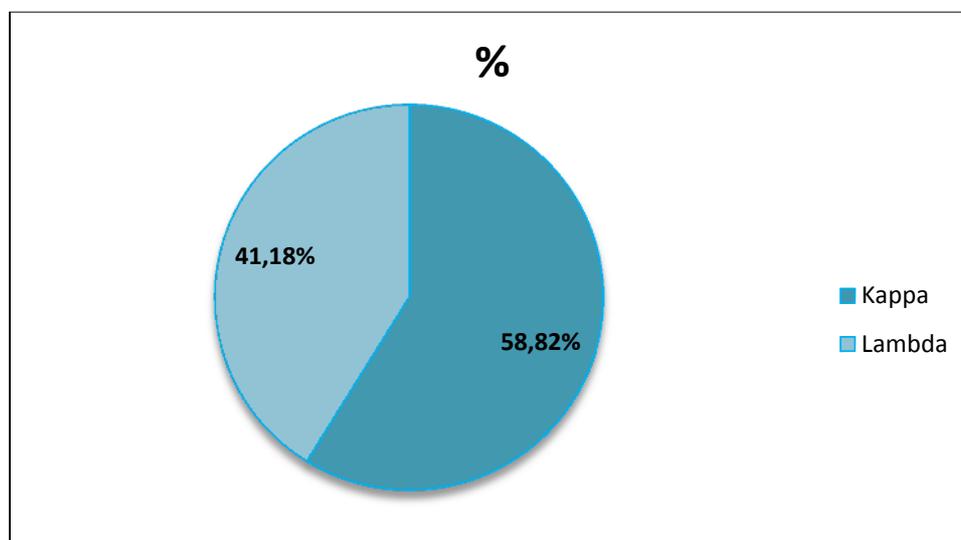
Figure 25 : Répartition des GM selon le type de CM.

Les résultats montrent une prédominance des IgG avec un pourcentage supérieur à 50%, devant les IgA qui sont représentées avec un taux supérieur à 20 % suivi par les profils oligoclonaux, qui sont représentés par 7,84%. Pour les IgM et les profils biclonaux, ils sont représentés par un taux égal (5,88 %). Concernant les chaînes légères libres kappa, elles sont représentées par un seul cas.

IV.2. Répartition des CM selon le type de la chaîne légère :**Tableau X :** Répartition des CM selon le type de la chaîne légère.

CM	Nombre de CM	%
Kappa	30	58,82
Lambda	21	41,18
Total	51	100

Le graphe ci-dessous, montre la répartition des CM selon le type de la chaîne légère :

**Figure 26 :** Répartition des CM selon le type de la chaîne légère.

La répartition est proche à celle que l'on retrouve physiologiquement avec un ratio 2/3 de kappa (58,82%) et 1/3 de lambda (41,18%).

I. Résultats de la protéinurie de Bence Jones :

La PBJ a été recherchée chez 8 sujets de la série étudiée, par la technique d'immunosoustraction urinaire, au moment du diagnostic.

Elle s'est révélée positive chez 5 patients, soit 62,5 %, négative dans 3 cas, soit 37,5%.

Comme le montre le tableau IX.

Tableau XI : Résultat de la protéinurie de Bence Jones.

	PBJ négative	PBJ positive		Total
		CLL Kappa	CLL Lambda	
Nombre	3	3	2	8
Pourcentage	37,5	60	40	100

DISCUSSION :**I. Répartition des cas de GM selon le sexe et l'âge :****I.1 Sexe ratio :**

Notre étude est en faveur d'une prédominance masculine (56,86% chez l'homme contre 41,14% chez la femme) avec un sexe ratio de 1,32 (H/F). Ce résultat semble être en accord avec les résultats d'autres travaux, qui présentent une légère prédominance masculine (Guerin, 2008 ; Saleun, 1982 et Makni, 1990).

Nous pouvons confirmer ces résultats avec les données de la littérature sur le myélome : ratio de 1,4 (Dispenzieri et Kyle 2005) et sur la maladie de Walenström : prédominance masculine (Dimopoulos et Anagnostopoulos 2005).

Tableau XII : Distribution selon le sexe dans différentes séries de GM.

Série	Femme %	Homme %	Sexe ratio %
Guerin (2008)	39	61	1,56
Saleun (1982)	38,92	71,86	1,80
Makni (1990)	39,39	60,6	1,53
Notre étude	41,14	56,86	1,32

I.2 Age :

Dans la présente étude, l'âge moyen du diagnostic est de 58,91 ans. Ce chiffre est en accord avec d'autres séries publiées, telles que les deux études tunisiennes (Makni 1990 et Mseddi 2005) et l'étude espagnole (Giraldo 1994) qui présentent une moyenne d'âge jeune, autour de 62 ans.

Il ya plus de 30 ans, Dugue (Dugue, Rousselet *et al.* 1971) a remarqué que les myélomes à IgA et à chaînes légères touchaient des patients jeunes (à partir de 45 ans), que la maladie de Waldeström (à partir de 55 ans).

Nos résultats permettent de conforter les données de la littérature selon lesquelles les GM sont majoritairement des maladies de la personne âgée puisque un maximum de fréquence est observé chez les patients qui ont plus de 60 ans.

II. Répartition selon le type de GM :

Les GM constituent un groupe très hétérogène de maladies d'étiologies différentes. Il ressort de notre série que les GM malignes sont prédominantes (58,82%) par rapport aux GM bénignes (41,18%).

En comparant ces résultats à ceux rapportés dans la littérature, nous constatons que la prédominance de GM malignes dans notre série est comparable à deux séries tunisiennes (Makni 1990 et Mseddi 2005), une série marocaine (Sadouk 2008) et deux autres séries françaises (Youinou 1977 et Fine 1985). Cependant, les MGUS sont prédominantes dans d'autres grandes séries (Kyle 1989 et Yvette 1996) avec des proportions allant de 58% à 70 % de toutes les GM (Tableau XII).

Cette prédominance de GM maligne s'explique par un recrutement fondé le plus souvent sur des malades hospitalisés généralement symptomatiques. En effet, les séries internationales, en particulier européennes et américaines comportent une bonne partie de sujets asymptomatiques qui font régulièrement des bilans systématiques pour un check-up, ce qui expliquerait la fréquence élevée des MGUS dans ces séries.

Par ailleurs les résultats peuvent être influencés par les techniques d'analyse. Entre les études les plus anciennes qui utilisaient l'acétate de cellulose et l'IEP et les plus récentes qui utilisent l'agarose ou le capillaire et l'IF ou l'IS, il existe de grande différence. En effet, certains pics peu importants ou de migration très proches étaient plus difficiles à visualiser avec les techniques anciennes, d'où une sous-estimation probable. Dans les GM malignes particulièrement le MM qui représente à lui seul la plus forte proportion (54,9 %). La faible fréquence de la MGW dans notre série (3,9%) est retrouvée dans la plupart des séries de la littérature ou elle représente de 2% à 4,8%. Seuls Youinou *et al.* et Fine *et al.* en France rapportent une proportion relativement importante de la MGW allant de 11,8 % jusqu'au 21,7%.

Tableau XIII : Répartition étiologique des GM selon les séries.

Étiologie % Séries	MGUS	MM	MGW	Plasmocytome	Lymphome	Amylose primitive	Chaînes lourdes	Autres
Youinou 1977Brest (152 cas)	25,7	61,8	11,8	0	0	0	0	0,7
Fine 1985 Paris (1182 cas)	20,1	56,3	21,7	0	0	0	0	1,9
Kyle 1989 Mayo- clinic (873 cas)	64,2	15,6	2,4	1,5	5,8	8	0	2,5
Makni 1990 Tunis (198 cas)	22,7	58,1	2	0	0	0	17,2	0
Yvette 1996 Hong- Kong (157 cas)	59,6	28,8	2,7	1,4	5,5	-	-	-
Mseddi 2005 Sfax (270 cas)	27	58,2	4,8	1,1	3,4	1,8	2,2	-
Sadouk 2008 Rabat (214 cas)	37,8	49,5	3,7	0,9	4,2	0	0	3,9
Notre étude	41,1	54,9	3,9	-	-	-	-	-

III. Exploration biochimique :

IV.1. Protidémie :

Dans la présente étude, le taux moyen des protides sériques variant entre 38 et 125 g/l. Il est augmenté dans 33,33% et diminué dans 9,8 % des cas, ce qui permet de souligner l'intérêt voir la nécessité de le compléter par une électrophorèse et une IS dans les deux cas de figures.

L'hyperprotidémie est en rapport avec l'augmentation de la masse protéique totale circulante due à l'Igm.

L'hypoprotidémie est liée à la diminution de la synthèse des Ig polyclonales et de l'albumine (notamment dans les cas de MM).

Dans le groupe de MGUS, la protidémie moyenne est retrouvée normale dans 60 % des cas. Néanmoins, dans 54,84 % des cas de GM malignes, la protidémie est normale et cela ne permet pas d'exclure le diagnostic d'une GM maligne.

IV.2. Electrophorèse des protéines sériques EPS :

Dans la série étudiée, l'EPS s'est révélée positive (montrant un pic monoclonal) dans 74,07% des cas. Cependant, dans 11 cas de GM (21,57%), l'EPS n'a pas montré de pic monoclonal. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés dans la série tunisienne (Mseddi 2005). Le pic objectivé était principalement situé au niveau de la zone des γ -globulines (72,22% des cas), moins souvent dans la zone des β -globulines (27,78% des cas).

Les résultats de cette répartition vont de pair avec ceux de la littérature qui confirment une migration prédominante de l'Igm dans la zone des gammaglobulines (migration privilégiée des IgG et des IgM dans la zone des γ -globulines et des IgA dans la zone des β -globulines).

La présence majoritaire d'hypogammaglobulinémie (72,45%) dans notre série est expliquée par la répression de synthèse des Ig polyclonales, essentiellement dans les cas de MM.

Concernant le taux du CM évalué par électrophorèse oscillait entre 1,8 et 77,5 g/l dans les GM malignes, intégrant les cas extrêmes d'hypo et d'hypergammaglobulinémie. Ces valeurs étaient significativement plus élevées par rapport aux MGUS. D'ailleurs, un taux faible de l'Igm représente également un des critères différentiels de diagnostic biologique entre les GM malignes et les MGUS. Seule l'électrophorèse, permet en règle générale, lorsque le pic est bien individualisé, de quantifier de façon fiable une Igm après balayage densitométrique et intégration.

IV.3. Immunotypage :

IV.3.1. Répartition selon le type de l'Ig :

Concernant, la distribution isotypique, le type IgG est prédominant, suivi des IgA, des profils oligoclonaux et en suite les IgM.

La place prépondérante (52,94 %) qu'occupent les IgG dans notre série est retrouvée également dans toutes les séries internationales (**tableau XIV**).

Tableau XIV : Distribution isotypique des GM selon les séries.

Auteur	N	G (%)	A (%)	M (%)	Oligoclonale (%)	Biclonale (%)	D (%)	K ou λ (%)
Kyle-USA 1989	808	61,62	10,54	20,07	/	/	0,12	7,62
Makni-Tunisie (Tunis) 1990	198	57,31	18,29	4,26	/	/	3,65	15,85
Giraldo Espagne 1994	1203	63,3	17,8	9,5	/	3,8	0,25	5,53
ONG Pay-Bas 1997	503	64,41	10,93	21,07	/	/	0,79	2,78
Mseddi-Tunisie (Sfax) 2003	288	53,98	21,73	14,20	/	/	1,08	14,13
Pontet 2005 Paris	3007	57	16	14	/	6	/	7
Nantes 2008	-	40,7	31,8	7,7	+10,4	7,9	0,07	1,4
Notre étude	54	52,94	25,49	5,88	7,84	5,88	/	1,96

N : nombre total des cas dans la série.

Les IgA occupent la deuxième place dans notre série (25,49 % des cas), ce résultat est aussi rapporté dans l'autre série tunisienne de Makni *et al.* et dans les séries espagnoles de Giraldo *et al.* où les IgA représentent plus de 17% de cas.

Les profils oligoclonaux occupent la troisième place avec un pourcentage de 7,84% (4 cas). Ce résultat est trouvé dans l'étude nantaise en 2008 (voir annexe 04).

Les IgM occupent la quatrième place dans notre série (5,88%). Alors que, dans d'autres séries internationales, les IgM occupent la seconde place avec une proportion qui dépasse 20% (Kyle 1989 et ONG 1997). Ces différences peuvent en partie être expliquées par la plus forte prévalence de la maladie de Waldenström en Europe de l'Ouest par rapport au bassin méditerranéen. D'autres facteurs génétiques et environnementaux non encore parfaitement connus devraient intervenir (BERGSAGEL, 1995).

En ce qui concerne le type de chaînes légères, environ 60% des chaînes légères (libres et liées) sont d'isotype kappa et 40% sont d'isotype lambda. Or, physiologiquement, les chaînes κ sont synthétisées en excès par rapport aux chaînes λ , le ratio κ/λ est proche de 2. Il paraît donc tout à fait cohérent de retrouver une telle proportion au sein des GM.

IV.4. Protéinurie de Bence Jones :

La recherche de cette protéinurie fait partie de la démarche diagnostique d'une GM, particulièrement dans le myélome à chaînes légères car, elle est généralement positive et reste un des moyens de détection les plus simples. Il est plus souvent possible de les détecter dans les urines que dans le sang.

Physiologiquement, on ne retrouve pas de CLL dans l'urine puisque près de 99% sont réabsorbées par le tube proximal. En revanche dans les GM malignes, elles sont synthétisées en excès, s'accumulent au niveau sérique et commencent à être éliminées dans l'urine lorsque le seuil de réabsorption est dépassé, ce qui constitue la PBJ (SADOUK, 2008).

Dans notre série, la PBJ caractérisée par la technique d'IS s'est révélée positive chez 5 patients (presque 63%) des cas des GM malignes avec une prédominance des CLL de type kappa (60%). Selon les données de la littérature, la PBJ est présentée dans 2/3 des cas de myélome, ce qui explique la fréquence de l'atteinte rénale dans ce type de GM malignes. Elle est cependant moins souvent retrouvée dans la MGW ou du moins présente à un taux faible (SADOUK, 2008).

IV. Intérêt et limites de la technique de l'EC et de l'IS dans la caractérisation des CM :

L'EPS est la seule méthode permettant de mettre en évidence la monoclonalité d'une immunoglobuline. L'EC sur automate *Capillarys 2 Flex Piercing* présente une technique d'actualité très performante grâce à son automatisation complète qui va de la préparation des échantillons, à l'obtention des électrophorégrammes après analyse simultanée de 8 échantillons par portoire. Elle permet un chargement initial de 8 portoirs (64 échantillons) et un chargement continu des portoirs pendant l'analyse. Cela, rend cette technique plus rapide et sécurisée que d'autres techniques électrophorétiques.

L'électrophorèse capillaire présente une meilleure résolution par rapport à la technique sur gel par la bonne séparation des fractions β_1 et β_2 , ce qui améliore la possibilité de détecter un pic monoclonal situé dans ces zones (assez fréquent avec des IgA). Le système capillarys est bien adapté à la détection et à la caractérisation des profils oligoclonaux.

De plus, la caractérisation du CM peut être réalisée par immunosoustraction également automatisable. Cependant, cette identification n'est possible qu'en présence de pic étroit « individualisable » à l'EPS. Aussi, toute Igm migrant en dehors de la zone gamma peut être méconnue. De même, la présence d'Igm en faible quantité dans le sérum peut passer inaperçue.

L'IS est moins sensible et moins flexible que la technique d'immunofixation en gel et elle n'est pas adaptée ni à la caractérisation des IgD, des IgE ni celles des chaînes légères libres monoclonales ; c'est le cas n°42 dans notre série où l'IS a révélée une chaîne légère kappa. Dans ce cas, une immunofixation complémentaire doit être effectuée à l'aide des antisérums spécifiques (anti-IgD, anti-IgE, anti-K libres et λ libres) avant de poser un diagnostic définitif.

L'EPS présente certaines difficultés d'interprétation, comme dans le cas où l'électrophorégramme révèle un dédoublement de pic due soit à la polymérisation des Igm, soit à la présence de deux CM différents à confirmer par un traitement au β -mercaptoéthanol. Dans notre étude, 4 sérums ont été traité par β -mercaptoéthanol. Tous les résultats ont montré une disparition de dédoublement du pic qui est due à la polymérisation des Ig, ainsi le traitement au β -mercaptoéthanol a permis de couper les ponts disulfures des Ig polymérisées et d'obtenir une molécule monomérique et finalement d'homogénéiser leurs mobilités électrophorétiques. Un exemple de profils électrophorétiques obtenus avant et après traitement au β -mercaptoéthanol est illustré dans la figure suivante.

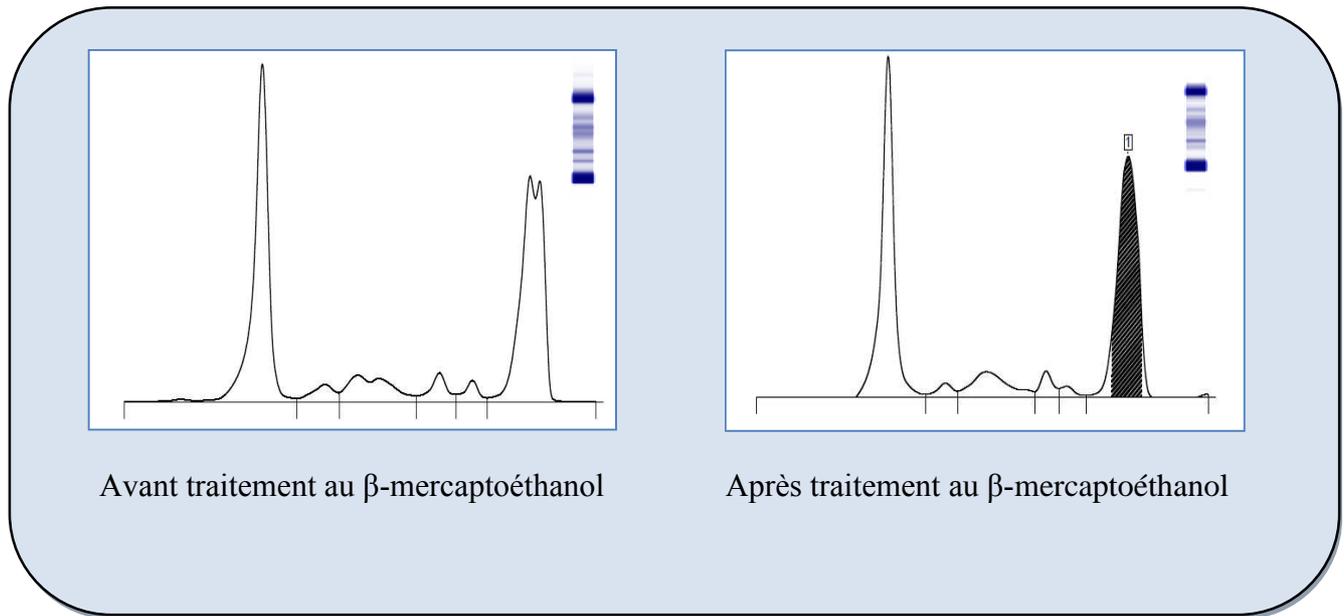


Figure 15 : Exemple de profils électrophorétiques obtenus avant et après traitement au β -mercaptoéthanol.

Conclusion

Les gammopathies monoclonales, groupe très hétérogène de maladies, représentent un problème fréquent en pratique clinique.

Cette étude prospective et descriptive a été l'occasion pour exploiter des données épidémiologiques et étiologiques des GM, recueillies pendant une période de 4 mois, et de les comparer avec les résultats de nombreuses autres études menées dans le même cadre. Ainsi ce travail, mené sur une population de 51 cas de GM, nous a permis de confirmer certaines particularités :

- La forte prévalence des GM chez le sujet âgé avec une prédominance masculine ;
- La prédominance de l'isotype IgG/κ dans les MM, pathologie la plus fréquente dans le groupe des GM malignes ;
- L'absence de pic monoclonal à l'électrophorèse des protéides qui ne doit nullement faire écarter le diagnostic d'une GM ;
- La nette augmentation du taux moyen de l'Igm dans les GM malignes, en particulier le myélome, comparativement aux MGUS.

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

- La faible fréquence de la macroglobulinémie de Waldenström par rapport au MM;
- La fréquence relativement élevée des profils oligoclonaux.

L'électrophorèse capillaire constitue une technique analytique nouvelle très performante. En effet, grâce à son pouvoir de séparation remarquable, sa rapidité de réalisation et son automatisation, elle représente une alternative intéressante dans la détection et la quantification des CM. De plus, elle est bien adaptée au typage des Igm par immunosoustraction. Cependant, cette dernière n'est pas encore aussi sensible que l'immunofixation en gel pour l'identification d'un CM. L'intérêt de l'EPS et de l'IS est majeur dans le diagnostic et le suivi des GM.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AIT MEBAREK M. (2012). Nouvelles approches méthodologiques pour l'obtention d'anticorps monoclonaux humains. Thèse de doctorat, université Paris-sud, France.

AMOUZOU K. (2013). Quand adresser le patient atteint d'une gammopathie monoclonale de signification indéterminée à l'hématologue. Diplôme d'état de docteur en médecine, Université du droit et de la santé Faculté de médecine Henri Warembourg, Lille 2, France.

AMRANI HASSANI M., FILALI BABA A., ALAMI M. et LAHLOU H. (2010). Éléments du diagnostic biologique et pronostique du myélome multiple : Place d'une étude Marocaine. *Cahiers Santé*, 4 (20), 209-213.

AUDIGIE CL., DUPONT G. et ZONZAIN F. (1995). Principe des méthodes d'analyse biochimique. Ed. Bioscience et Techniques, Paris, 39-43.

BEAUVILLAIN C., JEANNIN P., RENIER G. et CHEVAILLER A. (2011). Immunoglobulines monoclonales : méthodes diagnostiques en 2011. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 433, 55-62.

BERGSAGEL D. (1995). The incidence and epidemiology of plasma cell neoplasms. *Stem Cells*, 13(2), 1-9.

BLESSUM C., JEPSSON J.O., AGUZZI F., BERNON H. et BIENVENU J. (1999). L'électrophorèse capillaire : principe et applications au laboratoire de biologie clinique, 6(57), 643-657.

BOSSUYT X. et BOGAERTS A. (1998). Detection and classification of paraproteins by capillary immunofixation/ subtraction. *Clinic Chemistry*. 44 (4), 760-4.

BOUATAYA A., HIZEMA S., BEN YOUSSEF Y., SAYARIA F., BRAHAMA N., KHÉLIF A. et KORTASA M. (2013). Myélome multiple : Aspect clinique, diagnostic biologique et pronostic. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 28, 30-35.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BROUET J.-C. et FERMAND J.-C. (1986). Macroglobulinémie de Waldenström ; in : « Hémopathies malignes ». Ed. Flammarion Médecine- Sciences. France, 539-551.

BURGOT G. et BURGOT J.-L. (2011). Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications. 3^{ème} Ed, Lavoisier, Paris, 185-195.

CAIROLI A. et ANDRE DUCHOSAL M. (2013). Myélome multiple: diagnostic et perspectives thérapeutiques. *Forum Med Suisse*. 13(38), 746-751.

CASASSUS PH. et LE ROUX G. (1991). Décision en hématologie. Ed. Vigot, Paris, 245-263.

CHAÏBI P., MERLIN L., MARTIN Y. et PIETTE F. (2000). Myélome et dysglobulinémie monoclonale. *La Revue de Gériatrie*, Tome 25, 4, 251-261.

CLAUVEL J.-P., SOLAL-CELIGNY P. et DELAUCHE M.-C. (1986). Myélome multiple ; in : « Hémopathies malignes ». Ed. Flammarion Médecine-Sciences. France, 519-533.

CLAUVEL J.-P. et DUBREUIL-LEMAIRE M.-L. (1994). Hématologie (précis des maladies du sang). Ed Ellipses, Paris, 145-149.

COLOMBAT PH. (1995). Les Lymphomes et les syndrômes lymphoprolifératifs ; in : « Biologie Médicale. Hématologie ». Ed. Technique et Documentation, Paris, 189-201.

COTTON F., GULBIS B. et VERTONGEN F. (2006). Electrophorèse capillaire et hémoglobinopathies : immuno-analyse et biologie spécialisée. *Science directe*, 21, 45-50.

DAUNIZEAU A. (2003). Eléctrophorèse des protéines du sérum ; in : « Cahier de Formation-Immunoglobulines monoclonales ». Ed. *Bioforma*, Paris, 42-45.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DECAUX O., HULIN C. et GROSBOIS B. (2007). Traitement du myélome multiple. *mt*, 6 (13), 437-449.

DECAUX O., RODON P., RUELLAND A., ESTEPA L., LEBLAY R. et GROSBOIS B. (2007). Épidémiologie descriptive des gammopathies monoclonales. Expérience d'un centre hospitalier général et d'un service de médecine interne de centre hospitalier et universitaire. *La revue de médecine interne*, 28, 670–676.

DIMOPOULOS M-A., MOULOPOULOS L-A., MANIATIS A. et ALEXANIAN R. (2000). Solitary Plasmacytoma of Bone and Asymptomatic Multiple Myeloma. *Blood*, 96, 2037-44.

DIMOPOULOS M-A., et ANAGNOSTOPOULOS A. (2005). Waldenstrom's macroglobulinemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, 18(4), 747-765.

DISPENZIERI A. et KYLE R-A. (2005). Multiple myeloma : clinical features and indications for therapy. *Best Pract Res Clin Haematol*, 18(4), 553-568.

DORA B., BELABER S., SMAILI F. et BOUZID K. (1992). Hématologie clinique. Ed. Office des Publications Universitaires, Alger, 408-411.

DUC J. et BOGAERTS B. (1988). Identification of Monoclonal Gammopathies : a Comparison of Immunofixation, Immunoelectrophoresis and Measurements of Kappa and Lambda Immunoglobulin levels. *J Clin Lab Immunol*, 26(3), 141-6.

DUGUE M., ROUSSELET F., KAHN M-F. et GIRARD M-L. (1971). Etudes biologiques sur 559 cas de paraprotéinemies. *Clin. Chim. Acta*, 33, 75-86.

FERMAND J.P. (2003). Immunoglobulines monoclonales : aspects cliniques ; in : « Cahier de Formation-Immunoglobulines Monoclonales ». Ed. *Bioforma*, Paris, 11-25.

FEUILLOLEY G.J M., MERIEAU A. et ORANGE N. (1999). Applications biomédicales de l'électrophorèse capillaire. *Médecine Sciences*, 12(15), 1419-1426.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FILALI MOUHIM S. (2011). Myélome multiple des Os : Analyse épidémiologique et biochimique d'une cohorte de 144 cas, Thèse du Doctorat en Pharmacie, Université Mohammed V faculté de médecine et de pharmacie, Rabat, Maroc.

FINE J-M. et LAMBIN. (1975). Distribution of heavy chain classes and light chain types in 757 cases of monoclonal gammopathies. *Biomedicine*, 23(8), 323-327.

FINE J-M. et MARNEUX M. (1985). Données récentes sur les gammopathies monoclonales. *Revue Française de transfusion et immuno-hématologie*, 6, 560–591.

FRANCOIS BACH J. et LESAVRE PH. (1981). Immunologie. Ed. Flammarion Medecine Science, France, 48-62.

GASTINNE T., FACON T., MOREAU A.-S. et LELEU X. (2007). Actualités dans le traitement du myélome multiple. *Hématologie*, 13, 9-16.

GHOBRIAL I.M., FONSECA R., GERTZ M.A., PLEVAK M.F., LARSON D.R. and THERNEAU T.M. et al. (2006). Prognostic model for disease-specific and overall mortality in newly diagnosed symptomatic patients with Waldenstrom Macroglobulinaemia. Full text via Cross Ref | View Record in Scopus | Cited By in Scopus 158–164.

GIRALDO, P. et RUBIO-FELIX D. (1994). Incidence, clinic-biological characteristic, and clinical course of 1203 monoclonal gammopathies (1971-1992). 39(5), 343-350.

GUERIN A. S. (2008). Etude rétrospective sur les gammopathies monoclonales à Nantes depuis 25 ans (cohorte de 7500 patients). Diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Nantes faculté de pharmacie, Nantes, France.

GUIS L., CHAUMIER A., LE GALL V. et HAVREZ S. (2013). Intégration du capillarys 2 flex piercing (Sebia) dans un laboratoire de biologie médicale spécialisée. *Revue Francophone des Laboratoires*, 449, 47 – 56.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

HILLMAN S. R., AULT A. K. et RINDER M. H. (2000). Hématologie en pratique clinique: Guide de diagnostic et de traitement. Ed. Flammarion Medecine-Science, Paris, 301-314.

HILLMAN S. R., AULT A. K. et RINDER M. H. (2007). Hématologie en pratique clinique : Guide de diagnostic et de traitement. Ed. Flammarion Médecine-Science, Paris, 301-314.

HORN F., LINDENMEIER G., GRILLHÖSL CH., MOC I., BERZHOLD S., SHNADEIR N. et MÜNSTER B. (2005). Biochimie humaine. Ed. Flammarion Medecine-Science, Paris, 569-575.

KYLE, R. A. (1978). Monoclonal gammopathy of indetermined significance. Natural history in 241 cases. *Am J Med*, 64 (5), 914-26.

KYLE, R. A. et P. R. GREIPP (1978). The laboratory investigation of monoclonal gammopathies. *Mayo Clin Proc*, 53(11), 719-39.

KYLE RA. (1989). Monoclonal gammopathy of undertemined significance and sonoldering multiple myeloma. *Eur J Haematol*, 43(51), 70–5.

KYLE. A. (2008). La gammopathie monoclonale de signification indéterminée et la macroglobulinémie de Waldenström indolente. *International Waldenstrom's macroglobulinemia foundation torch*, 1-2.

LEBLOND V. et TOURNILHAC O. (2005). La maladie de Waldenström ou Macroglobulinémie. *Hématologie*, 11 (6), 16-408.

LE BRICON T. et TRIVIN F. (2003). Nouvelles techniques d'électrophorèse : Application aux protéines et l'ADN. *Science directe*, 18, 11-22.

LE CARRER D. et BACH-NGOHOU K. (2005). L'électrophorèse capillaire automatisée en biologie clinique. *Spectra Biologie*, 146, 47-52.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LEVY J-P., VARET B., CLAUVEL J-P., LEFIERE F., BEZZAUD A. et GUILLIN M-C. (2008). Hématologie et transfusion. 2^{ème} Ed. Elsevier Masson, Paris, 288-296.

MAKNI S., ZOUARI R., BARBOUCH M-R., AYED K., MOALLA M. et ZAKRAOUI L. (1990). Gammopathies monoclonales en Tunisie. *Rev. Fr. Transfus. Hemobiol.*, 33, 31–8.

MANIER S. et LELEU X. (2011). Stratégies d’exploration fonctionnelle et de suivi thérapeutique. Myélome multiple : diagnostic clinique et perspective de traitement. Recommandations de l’International Myeloma Working Group (IMWG). *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*. 26, 125-136.

MARLIN A. (1995). Laboratoire de biochimie médicale. Ed. Ellipses, Paris, 217-219.

MARSHALL J. W. et BANGERT K. S. (2005). Biochimie médicale : physiopathologie et diagnostic. Ed. Elsevier, Paris, 231-235.

MEHTA B.A. et HOFFBRAND A.V. (2003). Hématologie. Ed. De Boeck, Paris, 112-114.

MENDHAM, BARNES et THOMAS. (2006). Analyse chimique quantitative de VOGEL. Ed. De boeck, Bruxelles, 267-271.

MONCONDUIT M. (1994). Hématologie : précis des maladies du sang. Ed. Ellipses, Paris, 129-137.

MOREAU A-S., FACON T., LEBLOND V. et LELEU X. (2007). Maladie de Waldenstrom. *Hématologie*, 13, 17-23.

MSEDDI-HDIJI S., HADDOUK S., BENAYED M., TAHRI N., ELLOUMI M., BAKLOUTI S., HACHICHA J., KRICHEN M.S., BAHLOUL Z. et MASMOUDI H. (2005). Gammopathies monoclonales en Tunisie : analyse épidémiologique, immunochimique et étiologique d’une série de 288 cas. *Pathologie Biologie*, 53, 19–25.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ONG F., HERMANS J., NOORDIJK E-M., WIJERMANS P-W., SEELEN P-J. et DE KIEVIET W. (1997). A population-based registry on paraportéinaemia in the netherlands. *British Journal of Haematology*, 99, 914–920.

LOUDART J-B., MAQUART F-X. et RAMONT L. (2012). Synthèse sur la prise en charge des gammopathies monoclonales en Biochimie : des recommandations à la pratique quotidienne. *Annal Biologie Clinique*, 70 (3), 61-251.

PETITJEAN P., HENIN O., ELLIAS S. et GRUAU G. (2001). Application de l'électrophorèse capillaire au dosage des cations et des anions majeurs en solution dans les eaux douces naturelles. *Cahiers techniques de Géosciences Rennes*, 2, 2-59.

PONTET F. (2005). A data base for 3000 monoclonal immunoglobulin cases and a new classification. *Clin. Chim. Acta*, 355, 13-21.

RENE CAQUET S. H. (2004). 250 Examens de laboratoire : prescription et interprétation. 9^{ème} Ed. Masson, Paris, 232-297.

RETORNAZ F., POTARD I., FRANQUI C., BENEZECH L., HALFON P., ROUSSEAU F., MERLIN M. et MOLINES C. (2010). Conduite à tenir devant la découverte d'un pic monoclonal à l'électrophorèse des protéines. *Annales de Gériatriologie*, 1(3), 15-21.

ROUESSAC F. et ROUESSAC A. (1992). Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales. 7^{ème} Ed. Dunod, Paris, 139-153.

SADOUK K. (2009). Les immunoglobulinopathies monoclonales : Etude épidémiologique, biochimique et étiologique d'une cohorte de 214 cas. Thèse de doctorat en pharmacie, université V de Rabat, Maroc.

SALEUN J-P., VICARIOT M., DEROFF P. et MORIN J-F. (1982). Monoclonal gammopathies in the adult population of Finistere, France. *J Clin Pathol*, 35(1), 63-68.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

SINE J-P. (2003). Séparation et analyse des biomolécules. Ed. Ellipses, Paris, 161-171.

SZYMANOWICZI A., CARTIER B., COUAILLAC J-P., GIBAUD C., POULIN G., RIVIERE H. et LE CARRER D. (2006). Proposition de commentaires interprétatifs prêts à l'emploi pour l'électrophorèse des protéines sériques. *Annales de Biologie Clinique*, 4(64), 367-380.

SZYMANOWICZI A., NEYRONI M-J. et DENISI I. (2006). Proposition de textes interprétatifs prêts à l'emploi pour l'électrophorèse des protéines urinaires. *Spectra Biologie*, 155, 41-51.

WENSIERKI S. (2010). Mise au point d'un dosage des chaînes légères canines par la méthode de L'ELISA SANDWICH et applications cliniques. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Créteil, France.

YOUINOU P., LE GOFF P., SALEUN JP., JOUQUAN J., TYMEN G. et LE MENN G. (1977). Les gammopathies monoclonales (Revue critique de 219 dossiers colligés en 3 ans). *Path Biol*, 25(8), 517-521.

YVETTE I-L., CHOW J. et WICKHAM NW. (1996). Monoclonal gammopathy of unknown significance and malignant paraproteinemia in Hong Kong. *American Journal of Clinical Pathology*, 106(4), 449-56.

ZITTOUN R., SAMANA M. et MARIE J.P. (1992). Manuel d'hématologie. 4^{ème} Ed. Doin, Paris, 394-411.

ANNEXE : 01

Tableau I: Classification ISS (<i>International Staging System</i>) (OUDART <i>et al.</i>, 2012)			
Stade I	Albumine $\geq 35\text{g/l}$	Bêta-2 microglobuline $\leq 3.5 \text{ mg/l}$	Survie médiane : 62 ans
Stade II	Albumine $< 35\text{g/l}$ et Albumine $\geq 35\text{g/l}$ et	bêta-2 microglobuline $\leq 3.5 \text{ mg/l}$ ou bêta-2 microglobuline 3.5-5.5 mg/l	Survie médiane : 44 mois
Stade III		bêta-2 microglobuline $\geq 5.5 \text{ mg/l}$	Survie médiane : 29 mois

ANNEXE : 02

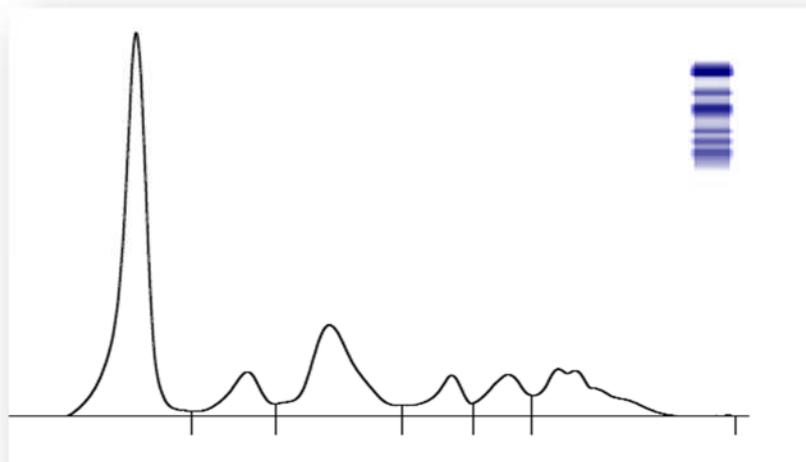
Tableau II : Classification selon Durie et Salmon (CHAÏBI <i>et al.</i>, 2000)	
Stade I	Absence d'anémie significative (Hb $\geq 100 \text{ g/l}$) Absence d'hypercalcémie (Ca ⁺⁺ $\leq 3 \text{ mmol}$) Radiographies normales ou ne montrant qu'un plasmocyte unique M-protéine : IgA $\leq 30 \text{ g/l}$, IgG $\leq 50 \text{ g/l}$, Bence-Jones $\leq 4 \text{ g/24h}$
Stade II	Stade intermédiaire entre I et II
Stade III	Anémie $\leq 85\text{g/l}$ Hypercalcémie $\geq 3 \text{ mmol/l}$ Radiographies montrant de multiples lésions lytiques osseuses M-protéine : IgA $> 50 \text{ g/l}$, IgG $>70 \text{ g/l}$, Bence-Jones $>12 \text{ g/24h}$
Le stade selon Durie et Salmon est libellé A ou B (B si créatinine sérique $> 117 \mu\text{mol/l}$).	

ANNEXE : 03

Tableau III : Quelques domaines d'application de l'EC (BURGOT et BURGOT, 2011).

Domaine d'application	Quelques exemples
Agroalimentaire	<ul style="list-style-type: none">- analyse des vitamines- analyse des additifs alimentaires- analyse des acides organiques
Hydrologie	<ul style="list-style-type: none">- analyses des ions minéraux (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^-, SO_4^{2-}) et des pesticides.
Pharmaceutique	<ul style="list-style-type: none">- mise en évidence des impurités des produits de dégradation dans les matières premières- dosage de principes actifs- contrôle de la pureté optique
Biologie clinique	<ul style="list-style-type: none">- électrophorèse des protéines sériques (détection des composants monoclonaux, détection des hémoglobinopathies...etc)- électrophorèse des protéines urinaires (dosage des CLL)- électrophorèse des lipoprotéines : LDL et HDL- électrophorèse des glycoprotéines et des glycolipides- électrophorèse des acides nucléiques- dosage de médicaments dans le cadre de situations cliniques thérapeutiques et toxicologiques.

ANNEXE : 04



Exemple de profils électrophorétiques d'aspect oligoclonale.