

A propos de l'électrophorèse des protéines sériques, du pic monoclonal, des gammaglobulines et des IgM du dosage pondéral des Ig .

Nous avons probablement tous commencé notre parcours de malade Waldenström avec une électrophorèse des protéines sériques (EPS) dont le verdict a été :

Présence d'un pic monoclonal IgM Kappa ou Lambda de x g/l signant la présence d'une gammopathie monoclonale.

S'en est suivi, entre autres examens, une Biopsie de Moelle Osseuse (BMO) qui a signalé, entre autres : *Présence de x% de cellules lymphoplasmocytaires.* Cela a permis de conclure que cette gammopathie était une Macroglobulinémie de Waldenström (MW).

Par la suite, le terme IgM (Ig pour Immunoglobuline, M pour le type de cette immunoglobuline, immunoglobuline synonyme d'anticorps) apparaît également dans une autre mesure faite dans le cadre d'un suivi de la MW, appelée *dosage pondéral des Ig.*

Si, comme moi, vous étiez béotien en biologie ou en médecine, tous ces termes, électrophorèse, pic monoclonal, IgM kappa (ou lambda), gammopathie, lymphoplasmocytes, vous étaient inconnus et ont dû vous laisser aussi perplexes que moi.

Au cours de diverses discussions, j'ai constaté que ce qu'il y a de commun et de différent entre IgM et pic monoclonal IgM ou entre électrophorèse et dosage pondéral des Ig n'était pas toujours très clair dans l'esprit de mes interlocuteurs et que cela conduisait à des erreurs d'interprétation de leurs résultats ou des articles qu'ils lisaient.

J'ai pensé qu'il pourrait être utile aux nouveaux diagnostiqués Waldenström que je fasse un petit topo sur ce que j'ai compris et retenu sur ces sujets. Cela répond aux questions simples que, moi-même, je me suis posé à la lecture de mes résultats ou de publications diverses.

La première partie de texte est lisible sans trop de difficultés, me semble-t-il, par tous, avec un petit effort, une lecture attentive et, au besoin, une petite recherche sur internet et Wikipédia pour les termes non définis dans le texte . A la rigueur, cette partie peut être sautée pour aller au paragraphe *Conclusions.*

Le paragraphe *Compléments,* en fin de texte, donne des petites infos sur les deux techniques utilisées et justifient les conclusions.

Comment bien lire les résultats de l'EPS et du dosage pondéral des Ig ? Pourquoi «*pic*», pourquoi «*monoclonal*»? Que sont ces *lymphoplasmocytes* dont la présence est anormale dans la BMO ? Pourquoi gammopathie ?

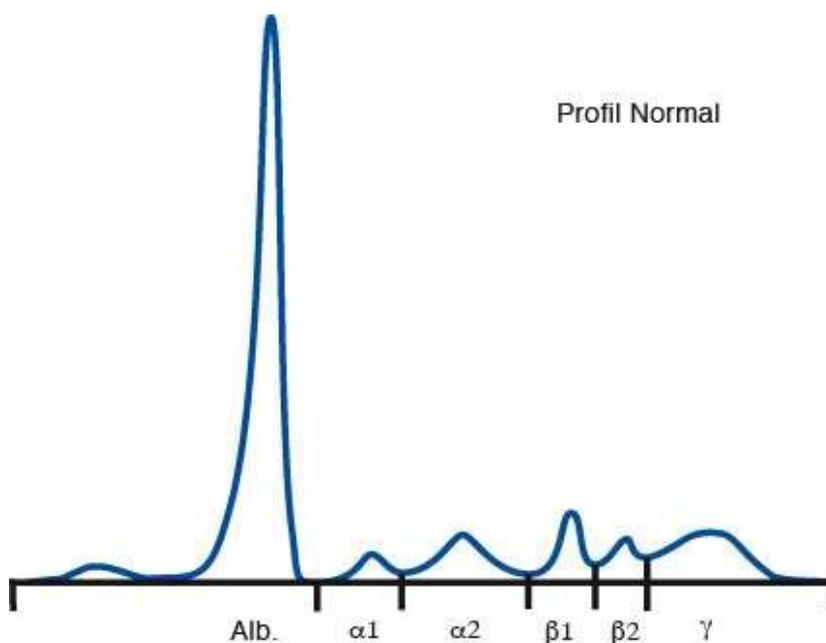
1- ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES

Tout d'abord, qu'est-ce qu'une électrophorèse ?

Une électrophorèse des protéines sériques (EPS) est une technique utilisée en biologie pour la séparation et la caractérisation des protéines du sérum, le sérum étant la partie liquide du sang, celle qui reste quand on a enlevé les cellules et les facteurs de coagulation.

Les protéines sont des molécules complexes qui s'ionisent dans un milieu aqueux lorsqu'il n'est pas neutre. Elles acquièrent alors une charge électrique positive ou négative selon que le milieu aqueux est acide ou basique. Sous l'effet d'un champ électrique (créé par une pile), elles vont se déplacer sur le support sur lequel on les a déposées, plus ou moins vite, en fonction de leur mobilité, celle-ci dépendant de leur charge électrique et pour des charges identiques, de leur taille (pour dire les choses simplement) .

Après un certain temps d'application du champ électrique, les particules seront séparées sur le support selon leur mobilité. On visualise le résultat de la migration de ces protéines par coloration, ce qui donne des raies plus ou moins intenses dont on mesure l'intensité par photométrie. Ci-dessous, un exemple de tracé pour une personne sans pathologie particulière.



La bosse la plus importante, en général à gauche, représente l'albumine, qui, étant une protéine légère, est celle qui se déplace le plus.

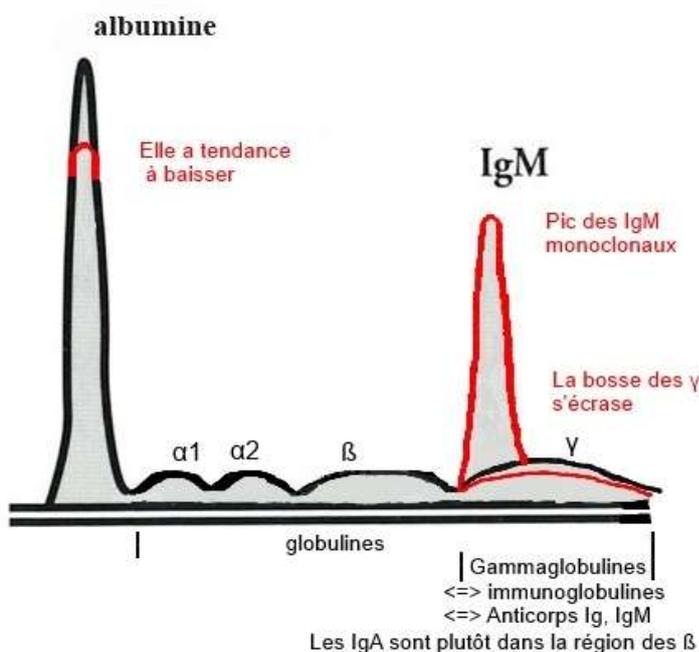
La bosse la plus à droite, dénommée zone ou plage des gammas (pour gammaglobulines), regroupe les immunoglobulines (synonyme d'anticorps). Ces anticorps sont de plusieurs types, IgG, IgA, IgM, IgE, IgD. Les IgE et IgD ne sont toutefois pas visibles sur l'EPS.

Pour un individu en bonne santé, ce sont des immunoglobulines dites **polyclonales** parce que fabriquées par une multitude de petits clones de lymphocytes et plasmocytes produisant des anticorps tous différents les uns des autres pour pouvoir reconnaître les nombreux antigènes auxquels on est susceptible d'être confrontés. (nb : 'clone', ici au sens de la biologie = ensemble de cellules identiques). Comme ces anticorps sont tous différents, ils n'ont pas la même mobilité. Ils s'étalent donc sur le tracé pour donner la bosse dite des « gammas »

Les autres bosses alphas et bêtas correspondent à d'autres protéines.

Pour un malade MW, il va se superposer à la bosse de base des gammaglobulines polyclonales (qui a tendance à s'écraser, par hypogammaglobulinémie), une pointe, le "pic monoclonal", (tracé en rouge sur la figure ci-dessous), présence anormale, signe d'une anomalie pathologique dans les gammaglobulines, une *gammopathie*.

(Je vais expliquer, au paragraphe 2, la présence de cette anomalie en forme de pic dans l'EPS d'un malade MW)



Tracé schématisé d'EPS pour un MW avec environ 30g/l

La description très succincte que je viens de faire de l'EPS montre que ce n'est pas une mesure pondérale . L'axe des ordonnées n'est d'ailleurs pas étalonné . Cette mesure permet toutefois de comparer les surfaces de chaque bosse et du pic à la surface totale sous le tracé global qui, lui, représente toutes les protéines et d'obtenir, ainsi, les pourcentages respectifs de chaque bosse et du pic par rapport aux protéines totales. Le vrai premier résultat de l'EPS est donc un résultat en % des protéines totales.

Comment arrive-t-on à traduire ces résultats en g/l ? Parce que l'on a mesuré, par ailleurs, par une mesure pondérale, la quantité de protéines totales. Il suffit de multiplier les % par le total des protéines (résultat généralement donné avec les résultats de l'EPS , généralement en tête des résultats) .

Les résultats de l'EPS sont généralement donnés pour l'albumine, les alphas, les bêtas, les gammas et le pic, dans une première colonne, en % (des protéines totales, donc).

Une 2^{ème} colonne traduit ces % en g/l, en tenant compte des protéines totales. On passe, donc, d'une colonne à l'autre en multipliant les résultats de la première colonne, en %, par le montant des protéines totales.

Une 3^{ème} colonne donne une fourchette de résultats pour des personnes en bonne santé, en g/l.

Le pic est, normalement, maintenant, toujours donné explicitement en % et en g/l dans les résultats. Sinon, s'il n'est donné qu'en %, il est simple de faire la multiplication soi-même, si on veut connaître son pic en g/l.

Ce calcul de résultats est transparent pour le lecteur, médecin ou patient. En particulier, si le pic est à cheval sur les bêtas et gammas, c'est le logiciel qui calcule le % de protéines à affecter au pic monoclonal et le taux en g/l.

Mais, pourquoi cette forme de pic et pourquoi 'monoclonal' ?

Sa présence et cette forme sont expliquées au paragraphe 2 ci-dessous.

2-PIC MONOCLONAL ET LYMPHOPLASMOCYTES

La MW est un processus de cancérisation. Toute cellule saine a une durée de vie limitée et programmée par son ADN (l'ADN est une molécule qui est présente dans toutes les cellules vivantes et qui renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme).

Un cancer prend naissance quand une cellule, par accumulation de plusieurs mutations de gènes critiques, perd les informations qui régissent sa vie

et sa mort programmée. Elle se reproduit, alors, sans aucune régulation, à l'infini et à l'identique en donnant un clone cancéreux.

Dans le cas de la MW, c'est un lymphocyte B (un des globules blancs) qui devient cancéreux. Il donne naissance à un clone de lymphocytes B et de *lymphoplasmocytes*. Ces lymphoplasmocytes sont des cellules intermédiaires entre le lymphocyte et le plasmocyte parce que les mutations accumulées par ces cellules cancéreuses font que les lymphocytes arrêtent de se développer à un certain stade (appelé « *préswitch* ») et n'évoluent pas vers des vrais plasmocytes bien différenciés, comme cela est le cas normalement en cas d'infection. Les cellules de ce clone et surtout les lymphoplasmocytes produisent un anticorps IgM, à l'identique et en grand nombre, monoclonal parce que provenant en grand nombre d'un même clone, alors que, dans le sang d'un individu sain, sans MW, il y a aussi des anticorps, IgM, IgG ou IgA, normaux, générés par une multitude de petits clones non cancéreux qui génèrent des Ig tous différents, mais en quantité bien moindre.

Les anticorps IgM générés par ce clone cancéreux sont dits IgM **monoclonaux**. Les autres anticorps, les normaux, générés par les différents autres petits clones non cancéreux sont appelés **anticorps polyclonaux**.

Au cours de l'électrophorèse, comme je l'ai déjà dit, les anticorps polyclonaux IgG et IgM qui sont tous différents ont des mobilités différentes et vont donc s'étaler sur le tracé pour former une bosse, celle des gammaglobulines, la plus à droite du tracé.

Les anticorps **IgM monoclonaux** (provenant du clone cancéreux MW), qui sont tous identiques et ont donc la même mobilité, vont, au contraire, se trouver regroupés au même endroit sur le tracé et se rajouter au tracé donné par les IgM polyclonaux. Cela va donner lieu à un tracé en forme de pointe, le pic monoclonal, au-dessus de la bosse arrondie des gammaglobulines qu'on aurait obtenu pour une personne sans pathologie Waldenström. Ce pic est, en général, dans la partie gauche de la bosse des gammas, dans la zone dite des gammas rapides, mais il se peut que, pour certains, le pic soit sur la bosse des bêtas.

3- IMMUNOFIXATION

C'est un terme qui apparaît aussi dans les résultats d'EPS. Pourquoi cette opération supplémentaire?

La MW n'est pas la seule gammopathie à donner des pics monoclonaux. Le myélome, par exemple, peut donner des pics IgG ou des pics IgA, les IgG étant, en général en plein dans la zone des gammas, les pics IgA dans celle des bêtas. Les pics IgM de la MW sont souvent à la limite des gammas, coté bêtas,

mais peuvent être dans les bêtas pour certains (c'était le cas de notre regretté président , Michel) , alors qu'étant nettement plus lourds que les IgG, ils devraient se retrouver les plus à droite de la zone des gammas. Leur mobilité est probablement plus grande parce qu'ils s'ionisent plus fortement. A titre anecdotique, mon tracé (le vrai, pas celui de la figure 2 schématique ci-dessus) montre 2 pics bien séparés, un bien dans les gammas et l'autre dans les bêtas (2 clones peut-être, ou une ionisation qui se fait de 2 façons).

Comme la position sur le tracé ne permet pas de savoir, à coup sur, si le pic du tracé est constitué d'IgM, d'IgG ou d'IgA, on doit faire une opération supplémentaire qui est, en général, une immunofixation . Cela consiste à utiliser des anticorps spécifiques à chaque anticorps pour en identifier le type, IgM kappa ou IgM lambda dans la MW, IgG ou IgA pathologiques du myélome.

Opération qu'il est inutile de répéter quand l'électrophorèse a déjà été faite pour ce malade dans le labo (le type d'IgM ne change pas !!)

4- DOSAGE PONDERAL DES Ig

C'est la 2^{ème} mesure dans laquelle apparaît le terme IgM (non associé à pic et à monoclonal, cette fois).

La mesure la plus utilisée est la néphélométrie.

Elle donne les teneurs en g/l des trois anticorps mesurés, IgA, IgG, IgM. Il s'agit ici des IgA, IgG, IgM polyclonaux.

Dans le cas d'un malade MW, les IgM mesurés comprennent les IgM polyclonaux (les normaux), mais aussi les IgM monoclonaux générés par les lymphoplasmocytes de la MW. Quand le pic est de l'ordre de 30-40 g/l, cela devrait donner un résultat très voisin de celui du pic puisque les IgM polyclonaux normaux sont de l'ordre du g/l . C'est loin d'être toujours le cas .

Un panel d'experts ,réunis en congrès en 2002, a recommandé de ne pas suivre les IgM (en fait ,donc, le pic pour les MW) à travers cette mesure qui est considérée comme moins fiable que l'EPS, mais à travers le résultat de l'EPS.

Conclusions que la SFH reprend dans ses recommandations :

« Le taux d'IgM doit être impérativement mesuré sur l'électrophorèse, la technique néphélométrique de dosage pondéral de l'IgM ne devant jamais être utilisée pour suivre l'évolution de l'IgM (Robert A. Kyle) ».

L'intérêt réel de cette mesure est seulement de vérifier qu'il n'y a pas d'hypogammaglobulinémie IgG ou IgA.

Je signale aussi , au passage, que , quand, dans les publis ou un texte concernant la MW, on parle d'IgM, sans préciser , comme c'est le cas du texte de la SFH ci-dessus, *c'est des IgM monoclonaux et du pic dont il s'agit.*

5- CONCLUSIONS PRATIQUES : INTERET ET LIMITES DU PIC

5-1 Pour un individu donné, le pic monoclonal est représentatif de l'activité et du développement du clone cancéreux qui lui donne naissance. Si le pic augmente, c'est que l'invasion de la moelle par le clone augmente et les signes cliniques liés à cette invasion risquent d'être plus marqués. C'est un marqueur de l'évolution de la masse tumorale.

Par exemple, à ce sujet , Robert A. Kyle (grand spécialiste américain de la MW) a dit dans un Ed forum , il y a quelques années, qu'il avait observé que, pour un malade donné, les signes cliniques, après un traitement , réapparaissent pour la même valeur de pic qu'avant traitement .

5-2 Par contre, les signes cliniques apparaissent à des valeurs très différentes pour différents malades.

Certains signes cliniques tels que les neuropathies, les néphropathies par dépôts de type amyloïde ou les cryoglobulinémies peuvent apparaître pour des pics de quelques g/l chez les plus malchanceux d'entre nous.

(Et cela, parce qu'un pic de 3 ou 4 gr/l, qui peut paraître faible, représente, déjà, une concentration de l'ordre de 100.000 fois plus grande que la concentration d'IgM produite par un clone non pathologique et donc du taux qu'aurait eu le clone MW avant qu'il ne devienne cancéreux. C'est cette forte concentration qui explique que les IgM monoclonaux MW, qui n'ont pas d'effet délétère à la concentration normale initiale, puissent donner certains signes cliniques de la MW, comme les neuropathies, les néphropathies ou les cryoglobulinémies.).

A l'inverse, un signe clinique plus fréquent , l'hyperviscosité, apparaît plutôt, généralement, vers 30-40 g/l, alors que d'autres chanceux vont rester asymptomatiques à 50g/l et même plus . (J'ai eu l'occasion de discuter avec un américain de la liste de discussion américaine qui avait 100g/l , sans signes d'hyperviscositémais, mais ... avec d'autres signes cliniques, bien sur !!!)

Il n'y a pas de règle.

(Et cela, parce que les signes cliniques ci-dessus dépendent, avant tout, de la configuration et des propriétés de l'IgM monoclonale qui est particulière à chaque malade. En somme, nous avons tous une IgM monoclonale, mais elle est

différente d'un malade à l'autre et a donc des propriétés délétères différentes à forte concentration, comme c'est le cas dans la MW)

Les signes cliniques biologiques tels que hémoglobine trop basse, manque de plaquettes ou de globules rouges ou blancs, sont la conséquence, eux, entre autres, des perturbations apportées par l'envahissement progressif de la moelle par le clone cancéreux ou par l'inflammation chronique qu'il crée.

Mais, là encore, on a constaté qu'il n'y a pas de correspondance entre le taux d'envahissement de la moelle, le taux d'IgM monoclonal et les signes cliniques. Le taux d'IgM monoclonal dépend, par exemple, entre autres, de la proportion de lymphoplasmocytes dans le clone MW et de leur pouvoir sécrétant autant que du taux d'envahissement de la moelle.

Donc, pour toutes ces raisons, la valeur du pic n'est pas un critère de traitement en soi. Ce sont les signes cliniques qui priment pour l'initiation d'un traitement.

A ce sujet, la SFH précise, voir lien suivant:

<http://www.oncologik.fr/images/0/09/Waldenstrom.pdf>

Les critères pour initier un traitement sont :

- ♣ *La présence de signes généraux (sueurs, fièvre, altération de l'état général)*
- ♣ *Une activité délétère de l'IgM (syndrome hyperviscosité, cryoglobulinémie, neuropathie périphérique sévère, maladie des agglutinines froides, amylose AL, etc.)*
- ♣ *Une anémie <10g/dl (100g/l) et/ou des plaquettes <100 milliards /l*
- ♣ *Une masse tumorale importante*
- ♣ *Le taux de l'IgM n'est pas un critère thérapeutique, mais une IgM élevée nécessite la recherche d'un syndrome d'hyperviscosité clinique, et l'examen du fond d'œil à la recherche d'hémorragies rétinienne et d'exsudats.*

En l'absence de tels critères une simple surveillance s'impose, « Watch and Wait » (surveiller et attendre.)

Ces réserves faites, les variations du pic IgM donnent, pour un individu donné, une bonne indication de l'évolution de sa maladie et de la masse tumorale.

Voir, de nouveau les recommandations de la SFH: *Pour les patients asymptomatiques, une consultation tous les 6 mois avec examen clinique, une NFS et une électrophorèse des protéines. Pour les patients traités, l'évaluation de la réponse est liée à la disparition des symptômes et du syndrome tumoral et à l'évolution du pic sur l'électrophorèse.*

5.3. Ce suivi de l'évolution du pic ne doit, toutefois, pas se faire "le nez dans le guidon", sur un résultat ponctuel.

En particulier , Robert A. Kyle a fait observer, dans un Ed Forum , que cette valeur du pic pouvait varier de quelques g/l, pour de multiples raisons physiologiques et par exemple, pour quelque chose d'aussi banal que boire une grande quantité d'eau, quelques heures avant la mesure. (Essayez si vous voulez vous faire plaisir et voir votre pic baisser !!).

Pour s'affranchir des erreurs dues à la mesure, qu'elles soient systématiques ou accidentelles, et des variations physiologiques évoquées par R.Kyle, le mieux est de mettre ses résultats sur un petit graphique qui permet de déceler si la dernière mesure est dans la continuité de la courbe. Si elle sort nettement du prolongement du tracé de la courbe pour la première fois , inutile de s'inquiéter tout de suite (ou de sabler le champagne , si le pic a baissé !!!) . Attendre avec stoïcisme (si on peut !) la prochaine mesure pour voir si la tendance à la hausse se confirme : tant que l'on n'a pas de signes cliniques, il n'y a pas le feu !!!

Depuis mon diagnostic en 2004, je mets sur un graphique mes résultats de mesure du pic, réalisés toujours par le même labo des Hôpitaux de Lyon et toujours dans les mêmes conditions, dans la matinée, après le même petit déjeuner (je suis un peu routinier !!) . Les points se distribuent assez bien, à un ou deux g/l près, autour d'une courbe assez régulière, ascendante (presque une droite) jusqu'en 2011, puis, depuis, avec une nette diminution de la pente (pourvu que cela dure !!). Ce qui montre que, dans mon cas, les résultats de ce labo sont assez fiables, à un ou deux grammes près.

C'est probablement le cas, je pense, de la plupart des labos.

5-4 Par contre ,il ne faut pas comparer les valeurs données par des labos différents. Pourquoi ??

La valeur du pic IgM donnée par une électrophorèse est le résultat d'une mesure indirecte sophistiquée, comme décrit succinctement ci-dessus.

Les labos n'ont pas tous les mêmes appareils de mesure et les mêmes conditions de mesure.

Les résultats de l'EPS pour un échantillon de sérum donné peuvent différer jusqu'à 20 %, selon les labos, s'ils utilisent des techniques d'EPS différentes (en particulier la différence est marquée entre EPS sur gel et EPS capillaire, plus de détails au paragraphe 6 "compléments", ajouté en fin de texte).

Par contre , pour un labo , on peut considérer que la mesure est fidèle , au sens de la métrologie , c.à.d. que, si l'on répète les mesures sur le même échantillon et le même appareil (l'appareil et la méthode , gel ou capillaire, sont en général précisés dans les résultats du labo) , l'erreur de mesure est inférieure à quelques %, .

5-5 La mesure dite pondérale ne doit pas être utilisée pour suivre les IgM monoclonaux, (voir citation de la SFH plus haut).

Cette mesure n'est utile que pour vérifier qu'il n'y a pas déficit trop important des IgA et IgG.

6- COMPLEMENTS

6-1 Sur l'électrophorèse :

Les déplacements des protéines au cours de l'EPS dépendent d'un grand nombre de facteurs :

Il existe 2 techniques d'EPS très différentes, sur gel ou capillaire.

Pour les EPS sur gel, il existe 2 gels différents comme support, agarose ou acétate de cellulose, le pH de la solution dans laquelle baigne le support peut être différent. Il y a, de plus, de nombreux fabricants qui chacun préconise sa propre méthode et ses propres méthodes de réalisation d'EPS.

Il existe une procédure de contrôle qualité des appareils d'électrophorèse en France par des organismes ad hoc. Les labos qui déclarent faire des EPS et les fabricants d'appareils d'EPS reçoivent, une fois par an, des échantillons témoins de sérum avec une immunoglobuline monoclonale pour qu'ils puissent s'assurer que leurs appareils donnent des résultats fiables. Sur le rapport que j'ai vu, datant de 2006, l'échantillon contenait une IgG monoclonale, à identifier et à quantifier.

La consultation de ce rapport m'a bien fait bien comprendre pourquoi il ne faut pas comparer des résultats venant de labos différents.

Pour présenter le tableau des résultats, les labos (plus de 2000) ont été regroupés par type d'appareil utilisé et méthode associée et les résultats calculés séparément pour chaque groupe. Le tableau avait plus de 35 lignes qui différaient par le fabricant (4 ou 5), par la génération d'appareil de chaque fabricant, chaque fabricant ayant décliné plusieurs générations, par la méthode, deux méthodes d'EPS différentes: sur gel ou capillaire, par deux supports différents pour les gels, agarose et acétate de cellulose (5%), par les colorants différents, 3 , noir amide (71%), bleu acide et rouge ponceau.

Pour chaque ligne du tableau, on donnait la moyenne et les écarts types par rapport à cette moyenne pour albumine, alphas, bêtas et gammas.

Pour les gammas (donc, en gros, le pic), les moyennes s'échelonnaient de 28 à 36 (exprimés en % des protides totaux), donc un écart énorme de 25 % entre les 2 moyennes extrêmes.

Les écarts entre labos , à l'intérieur d'une catégorie, étaient souvent de l'ordre de 5,6 %, jusqu'à 10 % pour une ligne.

Donc, des écarts pouvant être très importantes ,sur le même échantillon , entre labos qui n'utilisent pas les mêmes appareils ou les mêmes méthodes, justifiant la règle de ne pas comparer des résultats venant de labos différents.

6-2 Sur la mesure pondérale des immunoglobulines :

La technique la plus couramment utilisée est la néphélobimétrie. On marque chaque type d'anticorps avec un élément fluorescent différent, puis on compte le nombre des divers anticorps qui passent devant une cellule ad hoc. En multipliant par la masse de chaque anticorps compté, on a donc la quantité d'IgA, IgG et IgM, en g/l dans l'échantillon analysé.

Il est à noter qu'il y a, pour un MW, dans le décompte des IgM donnés par cette méthode, les IgM « *normaux* » (les polyclonaux) et les IgM monoclonaux « *anormaux* » de la MW. Bien qu'indirecte, cette mesure est bien une mesure pondérale. Elle est pourtant considérée comme moins fiable que l'électrophorèse (voir plus haut, les recommandations SFH).

Mario Ferrari