

Diagnostic au laboratoire des gammopathies monoclonales. Etude prospective de 14 cas à Dakar, Sénégal.

P. A. Diop (1), D. Haudrechy (2), M. Sylla-Niang (3), A. Diedhiou (3), L. Ngom (4) & P. Lopez-Sall (3)

(1) Professeur agrégé de biochimie, Faculté de pharmacie, Université C.A.Diop de Dakar, Sénégal

(2) Pharmacien biologiste, chef du laboratoire de biochimie de l'Hôpital principal de Dakar, Sénégal

(3) Assistants au laboratoire de biochimie, Faculté de pharmacie, Université C.A.Diop de Dakar, Sénégal.

(4) Etudiante en pharmacie, Laboratoire de biochimie, Faculté de pharmacie, Université C.A.Diop de Dakar, Sénégal.

Manuscrit n° 1845. "Biologie médicale". Accepté le 28/1/98.

Summary: Laboratory Diagnosis of Monoclonal Gammopathies. Prospective Study of 14 Cases.

Key-words: Monoclonal gammopathy - Electrophoresis - Immunofixation - Myeloma - Biochemistry - Diagnosis - Immunoglobulin - Hospital - Dakar - Sénégal - Africa

Monoclonal gammopathies are detected because of clinical symptoms and biological tests confirm their presence.

Wishing to investigate these diseases, we carried out a series of biochemical tests on 14 patients from October 1995 to July 1996: protein, cryoglobulin, electrophoresis of proteins, proteinuria of BENCE JONES, C-reactive protein, weight measuring of immunoglobulins (Ig), immunofixation of Ig, creatinine and calcium.

The results we obtained confirmed the presence of 14 cases of myeloma with:

- 9 IgG myelomas with 6 light chains and 3 light chains
- 4 IgA myelomas with 2 light chains and 2 light chains
- 1 IgG, Ig biconal gammopathy united to a cryoglobulin of class I.

We observed a predominance of the IgG over the others Ig and the over the light chains.

The proteinuria of BENCE JONES was present among 3 patients, hypercalcemia among 4 patients and hypercreatininemia in 1 patient with chronic renal failure.

Résumé :

Mots-clés : Gammopathie monoclonale - Électrophorèse - Immunofixation - Myélome - Immunoglobuline sérique - Biochimie - Diagnostic - Hôpital - Dakar - Sénégal - Africa

Les circonstances de découverte des gammopathies (GM) sont cliniques et presque toujours la confirmation vient des examens biologiques.

Dans le but de dépister ces affections, nous avons réalisé chez 14 malades hospitalisés à Dakar entre octobre 1995 et juillet 1996, une série d'explorations biochimiques: protéinémie, cryoglobulinémie, électrophorèse des protéines, protéinurie de BENCE JONES, protéine C-réactive, dosage pondéral des immunoglobulines (Ig), immunofixation des Ig sériques, créatininémie et calcémie.

Les résultats obtenus ont permis de confirmer 14 cas de myélome dont :

- 9 myélomes à Ig G avec 6 chaînes légères Kappa et 3 chaînes légères Lambda
- 4 myélomes à Ig A avec 2 chaînes légères Kappa et 2 chaînes légères Lambda
- 1 cas de biconalité Ig G et Ig G associée à une cryoglobulinémie de type I.

Nous avons remarqué une prédominance des IgG sur les autres immunoglobulines et des chaînes légères Kappa sur les Lambda. La protéinurie de BENCE JONES était présente chez trois malades, une hypercalcémie chez 4 malades et une hypercréatininémie chez un patient présentant une insuffisance rénale chronique.

Introduction

La fréquence des dysglobulinémies monoclonales (DM) ou gammopathies monoclonales (GM) est de 0,1% dans la population des donneurs de sang et de 1% chez les malades hospitalisés avant 60 ans et de plus de 3 % après 70 ans (7).

Le but de cette étude est de confirmer le rôle du laboratoire de biochimie dans le diagnostic de ces GM et de donner des indications dans leur surveillance et leur évolution.

La GM est due à la prolifération d'un seul clone de cellules B, productrices d'une population monoclonale d'immunoglobulines définie par son homogénéité. Le diagnostic biologique fait appel à des techniques d'électrophorèse donnant un pic étroit et à l'immunofixation donnant une bande dense. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux malades, hospitalisés dans deux services de l'Hôpital principal de Dakar, chez qui on avait suspecté une GM après l'examen clinique et radiologique.

Malades et méthodes d'analyse

Malades

Notre étude porte sur 14 malades qui ont été hospitalisés dans deux services de médecine de l'Hôpital principal de Dakar. Il s'agit de 10 hommes et de 4 femmes, d'âge moyen 50 ans.

Chaque malade a fait l'objet d'un dossier clinique comprenant :

- un diagnostic clinique afin de rechercher des douleurs osseuses, des fractures pathologiques, des adénopathies périphériques, une splénomégalie ;
- un diagnostic biologique comprenant des examens hématologiques complets (NFS, plaquettes, VS, sérologie VIH) et des examens biochimiques (protéines, CRP, créatinine, calcémie, immunoglobulines)
- des examens complémentaires : myélogramme et radiologie (rachis lombaire, thorax, bassin, crâne, abdomen).

Tous les malades de notre étude ont été hospitalisés entre octobre 1995 et juillet 1996, le seul critère d'inclusion étant la découverte d'un pic monoclonal à l'électrophorèse des protéines sériques.

Méthodes d'étude des GM

• Dosage et électrophorèse des protéines

Dosage des protéines sériques - Nous avons utilisé la méthode colorimétrique au réactif de GORMAL. La méthode est adaptée sur autoanalyseur RA1000 (Technicon).

Electrophorèse des protéines sériques - L'électrophorèse du sérum est effectué sur un film de cellogel de la firme Sébia. Les bandes préalablement conservées dans du méthanol 35 % sont séchées, puis trempées pendant 15 minutes dans un tampon Tris + Véronal acide + Véronal sodé à un pH alcalin de 8,8 (7,20 g + 1,84 g + 1,30 g pour 1000 ml d'eau).

Le dépôt des échantillons (40 µl) se fait sur le côté cathodique, la migration des protéines est réalisée sous une tension de 200 volts pendant 40 mn. Après migration, les bandes sont colorées au rouge ponceau, puis lavées et décolorées dans des bains successifs d'acide acétique à 5 % pendant 10 minutes. Les films sont transparisés dans une solution extemporanée: méthanol (75 %) + acide acétique (20 %) + diacétone alcool (25 %). La transparisation est achevée par un séchage à l'étuve à 37° C pendant 30 mn. Les bandes sont ensuite lues au densitomètre type DVS de Sébia.

• Dosage pondéral des immunoglobulines

Il est réalisé par une méthode immunologique réaction antigène/anticorps (Ag-Ac) qui conduit à la formation d'un complexe immun qui précipite. Le précipité ainsi formé est maintenu en suspension dans un tampon polyéthylglycol (PEG) qui permettra la lecture du trouble ainsi obtenu dont l'intensité, appréciée à 340nm, sera proportionnelle à la quantité d'Ag présent dans le sérum. Cette technique turbidimétrique est adaptée sur autoanalyseur RA1000, avec des antisérums anti-Ag fournis par la société américaine INCAR.

• Immunofixation des protéines sériques

Nous l'avons effectuée avec le kit MIDIGEL IFE de Biomidi. Comme toute réaction immunologique de précipitation, nous devons nous mettre dans des conditions analytiques telles que le rapport Ag/Ac se situe dans la zone dite d'équivalence où la réaction de précipitation est au seuil maximum. L'immunofixation se fait en quatre étapes :

Electrophorèse : une électrophorèse de six dépôts d'un même échantillon est réalisée sur gel d'agarose 1 % "Midigel". La migration se fait dans un tampon Tris barbital alcalin pH 8.6. Cette migration dure 35 mn sous une tension de 150 volts.

Immunoprécipitation : à la fin de l'électrophorèse et après séchage, le gel est recouvert d'une matrice de six dépôts. Chaque piste est remplie d'un immunosérum monospécifique (anti-G, anti-M, anti-A, anti-kappa, anti-lambda), une piste est mise en contact avec un réactif fixateur des protéines pour servir de référence, c'est un antisérum polyvalent de l'albumine et des globulines.

Lavage : le lavage du gel est effectué avec du sérum physiologique. Il est suivi d'un rinçage à l'eau distillée puis d'un séchage à l'étuve pendant 24 h pour assurer une dessiccation complète.

Coloration et décoloration : le Midicagel sec est immergé pendant 5 mn dans le colorant (amidoblack : 3,5 g/l, bleu de coomassie brillant : 1,5 g/l). La décoloration est effectuée par des bains successifs dans une solution extemporanée de méthanol à 45 %, d'acide acétique à 10 % et d'eau à 45 %.

Une Ig monoclonale apparaît sous forme d'une bande étroite dense au niveau de la chaîne lourde et de la chaîne légère.

• Etude des protéines urinaires

Dosage de la protéinurie - Nous avons utilisé la technique colorimétrique au bleu de coomassie-sodium dodécyl sulfate. La coloration bleue obtenue (lecture à 600 nm) est proportionnelle à la quantité de protéines contenues dans le milieu.

Electrophorèse des protéines urinaires - Elle est réalisée sur les urines concentrées dans les mêmes conditions que pour le sérum. Les urines sont concentrées jusqu'à 30 g/l à l'aide d'un appareil type "Amicon" qui, grâce à un milieu à fort pouvoir osmotique, permet de déshydrater partiellement les urines. Ces mêmes urines concentrées seront également utilisées pour l'immunofixation.

Recherche des protéines de BENGE JONES - Nous l'avons effectuée sur les urines du matin par la méthode de thermo-coagulation : les protéines de BENGE JONES précipitent entre 50 et 60° C et se redissolvent à 98° C.

Le test, dès qu'il est positif, est accompagné de l'électrophorèse sur acétate de cellulose et de l'identification par immunofixation.

Immunofixation des protéines urinaires - Les urines concentrées sont utilisées selon la même technique que celle des protéines du sérum avec le kit Midigel IFE.

• Détermination des cryoglobulines

Les cryoglobulines sont des Ig monoclonales qui peuvent se complexer à basse température, soit entre elles pour former des cryoglobulines monoclonales (type I), soit avec d'autres Ig sériques pour former des cryoglobulines mixtes (type II) sous la forme d'un précipité.

Le sang est prélevé à jeun dans des tubes secs qui sont ensuite enveloppés dans du coton cardé pour maintenir la température à 37° C. Après coagulation et centrifugation, le sérum est réparti dans deux tubes : l'un est conservé à 37° C et l'autre à + 4° C. Au bout de 48 h, on compare les deux tubes : en présence d'une cryoglobuline, un précipité est observé au niveau du tube conservé à + 4° C. La redissolution du précipité est vérifiée à 37° C et le typage de la cryoglobuline est effectué par immunofixation (3, 4, 9).

Résultats

Dosage et électrophorèse des protéines sériques (tableau I)

Tableau I.

Protidémie et électrophorèse des protéines sériques (sont notés les taux normaux adoptés au laboratoire de biochimie de l'Hôpital principal).
Protidemia and electrophoresis of serous proteins (normal rates adopted at laboratory of biochemistry at the principal Hospital).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
protéines g/l (60 à 80)	82	141	113	95	114	91	100	96	101	108	87	97	82	84
albumine g/l (36 à 48)	42,1	-	36,6	36,3	43,1	37,6	51,6	34,8	26,2	36,9	29,4	27,1	33,5	36,4
1 globuline (1 à 3 g/l)	2,7	2,6	1,8	3,8	2,0	1,5	2,8	3,7	1,5	2,6	2,3	2,1	1,0	5,9
2 globuline (4 à 8 g/l)	7,2	8,2	3,9	11,6	6,6	5,9	5,5	8,7	7,5	6,0	46,5	7,7	4,6	14,2
globulines (5 à 10 g/l)	8,7	6,4	5,0	12,0	7,6	8,4	7,0	7,7	54,9	6,2	3,0	3,2	42,9 (+)	8,4
globulines (7 à 13 g/l)	21,3	56,3	44	32,6	54,7	26,2	33,1	41,1	10,9	37,3	5,8	56,9	42,9	19,1
pic électrophorétique									double		2			

Tableau II.

Résultats du dosage de la calcémie, de la créatininémie et de la protéine C réactive
(sont notés les taux normaux adoptés par le laboratoire de biochimie de l'Hôpital Principal).
Results of calcemia, creatinemia and reactive C protein dosages.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
calcémie mg/l (88 à 103)	82	141	92	95	110	91	96	90	98	108	87	123	89	99
créatininémie mg/l (5 à 12)	340	13	8	9	11	8	10	12	12	12	6	12	11	13
CRP mg/l (< 10)	128	99	42	150	21	100	180	56	72	43	31	-	21	232

Calcium, créatinine et protéine C-réactive (CRP) (tableau II)

Dosage de la protéinurie et recherche des protéines de BENCE JONES (PBJ) (tableau III)

Tableau III.

Résultats de l'étude des protéines urinaires.
Results of urinary proteins survey.

	PBJ	protéinurie
1	+	1,6 mg / 24h
2	0	0,74 mg / 24h
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	440 mg / 24h
10	0	0
11	0	0
12	+	0
13	0	0,58 mg / 24h
14	+	1,2 mg / 24h

L'électrophorèse des protéines urinaires n'a été effectuée que chez deux malades parmi les cinq présentant une protéinurie. Elle a donné les résultats suivants :

pour le premier malade (n°1 avec protéinurie = 1,6 mg / 24 h) :
albumine : 1,1 mg / l,

- globulines : 0,4 mg / l,

- globulines : 0,4 mg / l,

- le pic électrophorétique est situé au niveau des gamma globulines ;

pour le second malade (n°14 avec protéinurie = 1,2 mg / l)

- albumine : 0,8 mg / l,

- 2 globulines : 0,1 mg / l,

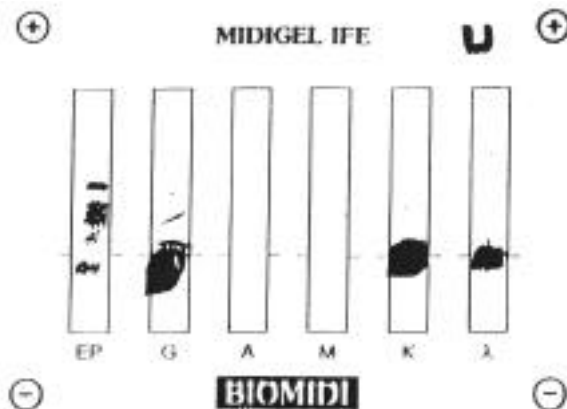
- globulines : 0,2 mg / l,

- le pic électrophorétique est situé au niveau des gamma globulines.

Une immunofixation des protéines urinaires a été effectuée pour un malade (n°9) et a montré qu'il s'agissait d'une double IgG : une IgG kappa et une IgG lambda (voir figure 1).

Figure 1.

Immunofixation des protéines urinaires (sujet n°9).
Immunofixation of urinary proteins (case 9).

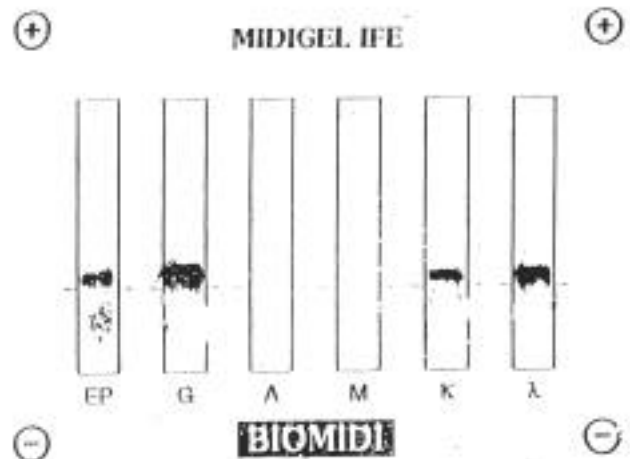


Cryoglobulinémie

Une cryoglobuline est retrouvée chez un malade qui présente aussi une hyperviscosité sanguine. Le typage par immunofixation a montré qu'il s'agissait d'une cryoglobuline de type I (IgG - IgG) (voir figure 2).

Figure 2.

Typage par immunofixation de la cryoglobuline.
Modelization by immunofixation of the cryoglobulin.



Résultat du dosage pondéral des Ig sériques

Il n'a été effectué que chez huit malades. les résultats sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV.

Taux des IG sériques (en µg/l).
Rates of serous IG (µg/l).

	3	4	5	6	9	10	11	13
IgG	82,5	29,70	12,34	27,50	38,40	32,64	7,75	7,75
IgA	0,2	3,45	52,20	0,57	0,59	2,72	21,90	37,7
IgM	0,04	0,61	0,4	0,8	1,49	0,65	0,46	0,17

Immunofixation des protéines

L'immunofixation a été réalisée chez 12 patients.

Les résultats sont représentés au tableau V et sur la figure 3.

L'ensemble de ces résultats a été complété par des examens radiologiques et un myélogramme chez tous les patients.

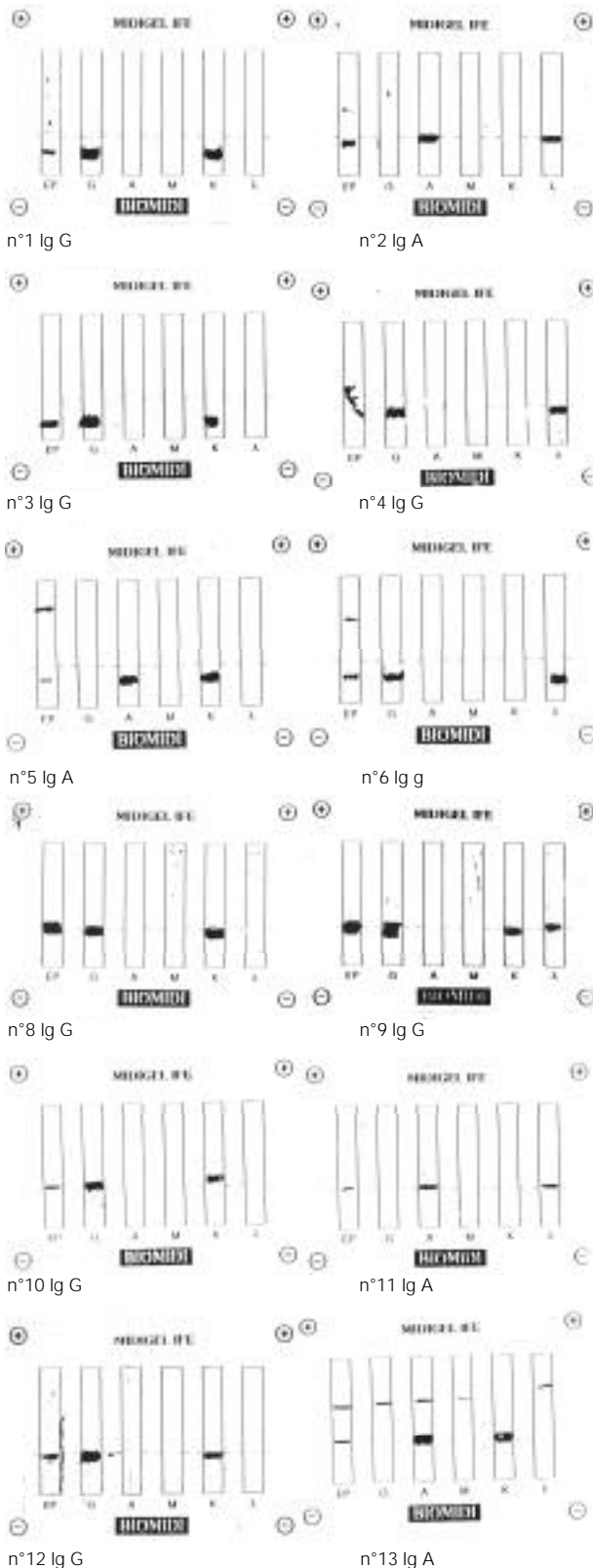
Tableau V.

Résultats d'immunofixation des protéines sériques.
Results in immunofixation of serous proteins.

	constituant monoclonal	chaîne légère
1	IgG	kappa
2	IgA	lambda
3	IgG	kappa
4	IgG	lambda
5	IgA	kappa
6	IgG	lambda
8	IgG	kappa
9	IgG	kappa lambda
10	IgG	kappa
11	IgA	lambda
12	IgG	kappa
13	IgA	kappa

Figure 3.

Immunofixation des protéines chez 13 patients.
Immunofixation of proteins in 13 patients.



Discussion

Entre le mois d'octobre 1995 et le mois de juillet 1996, nous avons trouvé 14 cas de gammopathies monoclonales (GM) essentiellement dominées par le myélome. Selon certains auteurs, une GM est exceptionnelle avant 40 ans. Mais, dans notre série, deux malades (une femme et un homme)

ont moins de 40 ans (7). Cette constatation rejoint celle de ZOURE (17) qui, en 1989, a trouvé à Dakar 10,7 % de malades de moins de 40 ans atteints de myélome. Bien avant lui, SANKALÉ *et al* (15) avaient trouvé dans cette même ville 18,75 % de malades de moins de 40 ans, le plus jeune avait 26 ans. Les études faites sur les grandes séries montrent que le myélome multiple concerne aussi bien l'homme que la femme (7, 14).

Les résultats biochimiques ont été déterminants pour la confirmation du diagnostic clinique. En effet, nous avons eu plusieurs résultats compatibles avec cette maladie :

- les protéines sériques : tous les malades présentent une hyperprotéïnémie (la protéïnémie moyenne est de 99 g/l, les valeurs allant de 82 à 141 g/l). Onze malades présentent un pic monoclonal en gamma avec une valeur moyenne de 38,45 g/l de gamma globulines.

- Deux malades ont un pic monoclonal en bêta dont un double pic qui est confirmé à l'immunofixation comme étant un double IgG kappa lambda (voir figure 3, n° 9). Ce cas de biconalité, associée à une cryoglobuline, a été déjà signalé par d'autres auteurs comme BINGEN-BIDOIS et RICHARD (1). Fait rare, un patient présente un pic monoclonal en alpha2. L'immunofixation a montré qu'il s'agit d'une IgA lambda (voir figure 3, n° 11). Ce cas rare a été également observé par FANCILLON *et al* (6) ;

- l'immunofixation des protéines : elle a été réalisée chez 13 malades et nous n'avons observé que deux types d'immunoglobulines - des IgG et des IgA qui sont réparties comme suit :
 - 9 IgG dont 6 kappa et 3 lambda
 - 4 IgA dont 2 kappa et 2 lambda.

Au total, on a huit chaînes légères kappa et cinq chaînes légères lambda. Cette prédominance des IgG sur les autres et des chaînes légères kappa sur les chaînes lambda est rapportée dans d'autres études africaines (12, 16, 17), mais aussi dans des études européennes (1, 2) ;

- la protéine C-réactive : son taux est, dans tous les cas, largement supérieur à 10 mg / l. C'est une protéine de l'inflammation qui traduirait l'agressivité de la dysglobulinémie monoclonale (5, 11). Elle est utilisée comme élément de pronostic ;

- la fonction rénale : on a noté cinq cas de protéinurie, mais seulement deux électrophorèses ont pu être réalisées. Les deux pics monoclonaux observés sont situés au niveau des gamma globulines (voir figure 1).

La protéinurie de BENCE JONES est présente chez trois malades. L'immunofixation chez l'un des malades, avec une protéinurie de 1,6 mg / 24 h, a montré la présence dans les urines d'une IgG avec les deux types de chaînes légères ; la biconalité s'est donc retrouvée dans les urines.

La créatininémie est dans les limites normales, sauf chez un malade présentant une insuffisance rénale chronique avec hypertension artérielle ;

- la calcémie : Le tableau II montre la présence d'une hypercalcémie chez quatre malades, une hypocalcémie chez deux patients et une calcémie normale chez les autres.

Cette exploration biochimique a permis de confirmer la prédominance du myélome : 14 cas dont 1 biconal IgG kappa - lambda, 9 Ig G et 4 IgA. Les examens complémentaires, comme la radiologie du squelette et le myélogramme, ont contribué à étayer les arguments biologiques, ainsi que le suivi de la maladie.

Dans notre étude, le test VIH et HTLV VI est négatif pour tous les patients. Cependant, d'autres études ont montré une haute prévalence des gammopathies monoclonales chez les patients séropositifs ou atteints de sida (8, 10, 13).

Conclusion

Le diagnostic des dysglobulinémies monoclonales est d'abord évoqué par des signes cliniques (douleurs osseuses, fractures,...) ou radiologiques. La confirmation biologique a montré la prédominance des myélomes. Nous n'avons retrouvé ni la macroglobulinémie de WALDENSTRÖM, ni la leucémie lymphoïde chronique, ni la gammopathie monoclonale de signification indéterminée, ce qui est certainement dû à la petitesse de notre échantillon.

Dans tous les cas, nous avons pu identifier, puis quantifier, l'Ig monoclonale par le dosage des protéines suivi de l'électrophorèse et de l'immunofixation, malgré le coût élevé de cette dernière technique. Dans le cas particulier des myélomes à chaînes légères, la recherche des protéines de BENCE JONES dans les urines permet de les révéler.

La prescription de l'électrophorèse des protéines en cas de vitesse de sédimentation accélérée, d'anémie, d'hypercalcémie ou lors des bilans biologiques systématiques, permet la découverte de plus en plus fréquente de gammopathies monoclonales, surtout chez le sujet âgé.

Références bibliographiques

1. BINGEN-BIDOIS M & RICHARD C - L'immunofixation : application au diagnostic des gammopathies monoclonales. *Tech - nique et biologie*, 1992, **1**, 17-24.
2. BINGEN-BIDOIS M, RICHARD C & TROYON M - La technique d'immunofixation : intérêt dans le diagnostic des gammopathies monoclonales. *L'eurobiologiste*, 1990, **24**, 196-202.

3. BROUET JC - Les cryoglobulinémies. *Presse Méd*, 1983, **12**, 221-237.
4. CLAUVEL JP - Cryoglobulinémie. *Rev praticien*, 1993, **43**, 677-688.
5. D'ANGELO G & GIARDINI C - Le gammopathie monoclonali : inquadramento delle indagini di laboratorio. *Min Med*, 1985, **76**, 49-57.
6. FRANCIILLON C, AUBERT V & SPERTINI F - Gammopathies monoclonales : stratégie, diagnostic. *Méd & Hyg*, 1992, **50**, 2149-2154.
7. HARROUSSA JL - Myélomes : physiopathologie, diagnostic et principes du traitement. *Revue du praticien*, 1992, **42**, 907-910.
8. HERIOT K - Paraproteinemia in patients with AIDS or LAS. *Clin Chem*, 1985, **31**, 1224-1226.
9. LE CARRER D - Gammopathies monoclonales. Mise au point sur leur exploration biochimique en 1991. Première partie : les techniques du diagnostic protéinologique. Principes et limites. *L'eurobiologiste*, 1991, **25**, 203-212.
10. LEFRERE JL & FINE JM - Monoclonal gammopathies in asymptomatic HIV - Seropositive patients. *Clin Chem*, 1987, **33**, 1697-1698.
11. MERLIN M & HELVIG A - Stratégie d'étude des gammopathies monoclonales au laboratoire de biologie clinique en 1991. *L'eu - robiologiste*, 1992, **26**, 89-105.
12. MUKIIBI I & MKWANANJI JB - Multiple myeloma in Zimbabweans. *East Afr Med*, 1987, **64**, 471-481.
13. PAPADOPOULOS NM - Oligoclonal immunoglobulins in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Immunol Immunopathol*, 1985, **5**, 43-46.
14. RENVERSEZ JC - Détection, analyse et signification des cryoglobulines. *Rev Prat*, 1989, **49**, 39-40.
15. SANKALÉ M, FRAMENT T & DIOUF S - La maladie de KALHER dans un service de médecine générale à Dakar. *Méd Afr Noire*, 1972, **19**, 679-684.
16. TOUTOU T - Contribution à l'étude du myélome multiple en milieu africain. Th. Méd. Abidjan, 1981, n°13.
17. ZOURE D - Le myélome multiple (à propos de 28 observations recueillies à l'Hôpital Principal de Dakar). Th. Méd. Dakar, 1989, n°63.