



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم: بيولوجيا الحيوان Département Biologie animale
Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Immunologie et oncologie

Intitulé :

Gammopathie monoclonale et myélome multiple : Approches épidémiologique et technique.

**Présenté et soutenu par : BOULAHIA ASMAË
FAR SIHEM**

Le : 09/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : M^{elle} ELOUAR. I (Maître de Conférence A- UFM Constantine).

Rapporteur : Mme AGGOUN .C (Maître de Conférences B- UFM Constantine).

Examinatrice : M^{elle} BENLATRECHE. M (Maître assistante A- UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 – 2016*

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier tout d'abord 'ALLAH 'pour le peu de savoir que nous avons acquis A travers ce modeste travail. Nous adressons nos très sincères remerciements, À Mme «Aggoun Cherifa» pour son encadrement pendant toute cette période ; les conseils qu'elle nous a prodigués et ces nombreux encouragements furent très précieux pour l'accomplissement de ces travaux. Elle n'a jamais compté le temps qu'elle nous a accordé.

Nos plus vifs remerciements s'adressent à la présidente du jury Melle Elouar Ibtissem Et au membre de jury Melle Benlatrèche

Moufida a d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer notre travail.

Ensuite, nous remercions tous les professeurs et Enseignants qui ont collaboré à notre formation depuis notre premier cycle d'étude jusqu'à la fin de notre cycle universitaire.

Enfin, nous remercions nos familles infiniment et plus particulièrement nos parents, nos Amis et toutes ces personnes qui ont un jour nous ont toujours encouragés.

SIHEM ET ASMAÂ

DEDICACE :

*Avant toute chose, nous remercions Allah,
Le tout puissant, pour nous avoir donnée la force, la volonté, et la patience durant
toutes nos années d'étude. A nos chers parents qui sont la source éternelle de notre
bonheur,*

*Qui nous ont aidé à être ce que nous sommes aujourd'hui, avec tant d'amour et
d'affection.*

Que Dieu les gardes en bonne santé toujours.

A nos chères sœurs pour leur Aide et leur soutien moral.

A nos frères adorés pour leur compréhension.

*A toute nos familles, nos amis, et à tous ceux qui ont contribué un jour à notre
éducation.*

SIHEM ET ASMAÂ

Table de matière :

Introduction	1
--------------------	---

I. Revue bibliographique :

1. Les Immunoglobulines :

1.1. Définition.....	4
1.2. Structure.....	5
1.3. Les anomalies des Immunoglobulines.....	6
1.4. Protéine monoclonale « Immunoglobuline monoclonale ».....	6

2. Gammopathie :

2.1. Définition.....	8
2.2. Gammopathie monoclonale.....	9
2.2.1. Découverte et caractérisation.....	9
2.2.2. Techniques de révélation.....	10
a. Electrophorèse.....	10
b. Immunifixation.....	12
2.2.3. Types de GM.....	13

3. Myélome multiple

3.1. Histoire de myélome multiple.....	15
3.2. Définitions du myélome multiple.....	16
3.3. Les aspects phénotypiques des plasmocytes normaux et tumoraux.....	16
3.4. Etiologie.....	19
3.5. Physiopathologie du myélome multiple.....	20
3.6. Le diagnostic du myélome multiple.....	23
3.7. Le myélome multiple en Algérie.....	28
3.8. La prise en charge des patients qui atteignent le MM.....	28

II. Partie pratique

i. Patients et méthodes

1. Présentation de l'étude.....	32
2. Méthode.....	33
2.1. Dosage des protéines totales.....	33
2.2. Révélation des composants monoclonaux.....	34
2.2.1. Obtention de l'échantillon sérique.....	34
2.2.2. La technique immunochimique.....	35
a. L'électrophorèse.....	35
b. L'immunofixation.....	40
2.3. Le myélogramme.....	45
ii. Résultats et discussion.....	49

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

La liste des figures :

Figure 1 : structure des immunoglobulines	5
Figure 2 :Structure tridimensionnelle d'une IgG	5
Figure 3 : Structure d'une immunoglobuline monoclonale.....	7
Figure 4 : Représentation d'un résultat normal d'électrophorèse des protéines sériques d'un sérum normal.....	10
figure 5: tracé électrophorétique anormal.....	11
Figure 6 : représentation d'un résultat anormale d'électrophorèse des protéines sériques	13
figure7: L'immunofixation	13
Figure 8 : Plasmocytes de moelle osseuse humaine normale après coloration au MGG	17
Figure 9 : Plasmocytes matures au cours du myélome multiple.....	19
Figure 10 : La différenciation plasmocytaire.....	20
Figure 11 : l'adhésion de la cellule de myélome à la cellule stromale de la moelle osseuse	23
Figure 12 : Complexe entre le cuivre alcalin et les liaisons peptidiques.....	33
Figure 13 : le prélèvement sanguin.....	34
Figure 14 :le principe de la centrifugation	35
Figure 15 :la centrifugation	35
Figure 16 : protéinogramme d'électrophorèse.....	36
Figure 17: Application des échantillons « sérum »	37
Figure 18 :Préparation de l'automate pour la migration électro-phorétique	37
Figure 19 : Préparation du gel et le plateau de migration.....	38
Figure 20 :Préparation des séquences de traitement du gel.....	39
Figure 21 : Tracé électrophorétique anormal	40
Figure 22 : Le dépôt du sérum.....	41
Figure 23: Préparation de la migration.....	42
Figure 24: Préparation de la migration.....	43
Figure 25: élimination des réactifs et pompage de gel.....	44
Figure 26: séchage, lavage, coloration et décoloration du gel.....	45
Figure 27 :la zone du prélèvement.....	46
Figure 28: l'étalement	47
Figure 29 : La coloration MGG.....	48
Figure 30: Répartition des patients selon les tranches d'âge	50
Figure 31 :Répartition des patients selon les isotypes du CM.....	51
Figure 32: La Répartition des patients selon le sexe.....	52
Figure 33 : Répartition des patients selon le taux de protéines totales.....	53
Figure 34: examen visuel (membrane du gel d'agarose) après migration (14 patients + 1 témoin).....	54
Figure 35 :protéinogramme humain normal (analyse densitométrique)	55
Figure 36: membrane de gel d'agarose après migration (29 patients + 1 témoin).....	55
Figure 37: protéinogramme sur agarose d'un profil pathologique (immunoglobuline monoclonale) ..	56
Figure 38: membrane après électrophorèse d'un échantillon normal	57
Figure 39 : résultat d'une immunofixation d'un sujet malade (IgG λ).....	58
Figure 40 :résultat d'une immunofixation (IgM λ)	58
Figure 41 :résultat d'une immunofixatin d'un sujet malade (IgA k)	59
Figure 42 : Résultat d'une immunofixation d'un sujet malade (λ)	59
Figure 43: observation microscopique d'un frottis médullaire normal (Gx100).....	61

Figure 44 :observation microscopique d'un frottis médullaire au cours d'un myélome multiple(Gx100)	62
Figure 45 : comparaison entre un cliché crânien d'un sujet malade et sain	63

Liste des tables :

Tableau 1 : les types d'Immunoglobulines monoclonales	8
Tableau 2 : Présentation clinique du MM	24
Tableau 3 :Diagnostic des différents myélomes	27
Tableau 4: composition des colorants, décolorants et le tampon de lavage	39
Tableau 5 :description des réactifs	43
Tableau 6 :Valeurs d'un profil électrophorétique normal	54

La liste des abréviations :

BCR: B cell receptor

CD: Cluster of differentiation

EPS : l'électrophorèse des protéines sériques

EPU : L'électrophorèse des protéines urinaire

FNS : Formule Numération Sanguine

GM : gammopathies monoclonales

GMM :gammopathies monoclonales malignes

H : Heavy

HLA-DR : Humain Leukocyte Antigen-antigen D Related

IFX : l'immunofixation

Ig : Immunoglobulines

IGF-1R : Récepteur de type 1 du facteur de croissance de type insuline

L : Light

La protéine-M : protéine monoclonale

Les critères majeurs : CMj

Les critères mineurs : CMi

MGG: May Grunwald et Giemsa

MGUS : gammopathies monoclonales de signification indéterminée

MM: myélome multiple

SMM: Smoldering multiple myeloma

VDJ: variable

VS : vitesse de la sédimentation

INTRODUCTION

Introduction

Les armes que l'évolution a forgées pour défendre notre organisme contre les infections nous sont a priori d'un secours pour lutter contre le cancer. Pourtant, des observations laissent penser que le système immunitaire peut nous protéger, au moins partiellement, contre le développement des tumeurs malignes. Autrement dit contre la prolifération incontrôlée, non pas de virus ou de bactéries, mais de nos propres cellules. (*Amigorena.,2012*)

Parmi ces cellules du soi, on note les plasmocytes qui produisent des protéines appelées immunoglobulines (Ig). Ces dernières jouent un rôle prépondérant dans le système immunitaire pour la défense contre les antigènes en provoquant leur destruction. Chez le sujet normal, les quantités d'immunoglobulines sont stables et leur production est régulée. Dans différentes circonstances, il existe un dérèglement de cet équilibre où on distingue les gammopathies monoclonales (GM).

Dans la littérature, la présence d'une GM témoigne de la prolifération incontrôlée d'un clone de plasmocytes producteur d'une Ig monoclonale caractérisée par un seul type de chaîne lourde (H) et un seul type de chaîne légère (L) ; cette Ig est parfois incomplète, représentée seulement par sa chaîne H ou L. (*Mseddi-Hdiji et al.,2005*)

En effet, Les GM sont associées à un groupe très hétérogène de maladies. D'une part, les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS) liées à certaines pathologies connues bénignes ou malignes. D'autre part les gammopathies monoclonales malignes (GMM) constituées par la maladie de Waldenström, les maladies des chaînes lourdes, l'amylose, autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques B et essentiellement par le myélome qui est défini par une prolifération maligne des plasmocytes, initialement localisée à la moelle osseuse. (*Mseddi-Hdiji et al., 2005*)

Des études épidémiologiques ont montré que les gammopathies monoclonales sont des pathologies du sujet âgé avec une prédominance du sexe masculin et d'isotype IgG. (*Mseddi-Hdiji et al.,2005, Decaux.,2007*)

La révélation des gammopathies monoclonales par différentes techniques immunologiques, nous permettra de confirmer la présence ou l'absence du composant monoclonal par l'électrophorèse des protéines sériques (EPS), et ensuite d'identifier la nature d'Ig monoclonale par l'immunofixation (IFX). En cas de suspicion de myélome, un myélogramme est demandé pour confirmer ce doute.

Actuellement, les rapports de la littérature concernant la GM sont très pauvres. En Algérie peu d'étude est portée sur cette pathologie, elle reste quasiment inconnue.

Ainsi les objectifs de ce travail sont d'une part, d'explorer la GM au sein d'une population algérienne et ceci dans un cadre d'une étude rétrospective portée sur 109 cas pendant une période de six ans, allant de 2016 à 2010. Et d'autre part de présenter les techniques de révélation de cette anomalie et de même du myélome comme étant une des maladies les plus associées aux GM.

Le manuscrit est scindé en deux parties ; une partie bibliographique consiste à centrer la pathologie. Et une autre pratique comportant une description du matériel et méthodes suivie par une présentation de résultats et leurs discussions. Et finalement une conclusion générale.

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

1. Les IMMUNOGLOBULINES

1.1. Définition :

Les Immunoglobulines sont des glycoprotéines dont la fonction principale c'est la reconnaissance de l'antigène « Immunité humorale ». Se sont Synthétisés tout au long de la lymphopoïèse B (intracytoplasmique, Ig de surface, Ig sécrétées) et Sécrétées par les plasmocytes. Elles sont représentées sous 5 classes: IgA, IgG, IgM, IgE, IgD. (Roitt.,2002)

1.2. Structure :

Les immunoglobulines sont des molécules symétriques formées de quatre chaînes polypeptidiques homologues 2 à 2 et reliées par des ponts disulfures: deux chaînes lourdes (H pour heavy) et deux chaînes légères (L pour light), Et partie Fab et Fc.

- *Chaînes lourdes :*

Il existe cinq types de chaînes lourdes, désignées par les lettres grecques γ (gamma) , α (alpha), μ (mu), δ (delta), ϵ (epsilon) qui définissent les cinq classes d'immunoglobulines, respectivement IgG, IgA, IgM, IgD, et IgE. Certaines classes sont divisées en sous classes comme pour les IgG (IgG1 à IgG4) et les IgA (IgA1 et IgA2).

- *Chaînes légères :*

Il existe deux types de chaînes légères, appelées κ (kappa) et λ (lambda) qui peuvent se combiner avec n'importe quel type de chaîne lourde. Pour une immunoglobuline donnée, les deux chaînes légères sont toujours identiques pour une même Ig. (Batteux et al .,2007)

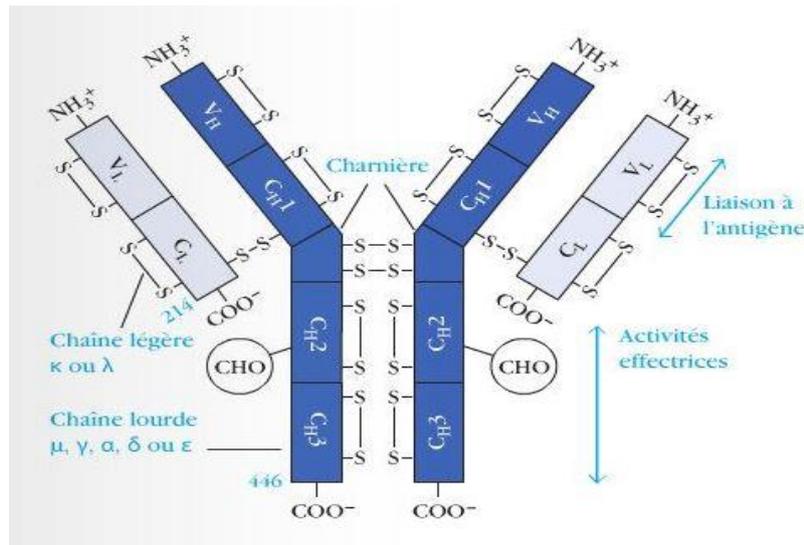


Figure 1 : structure des immunoglobulines (Kuby et al.,2014)

- *La partie Fab et Fc :*

L'association VH-VL constitue le site de fixation de l'anticorps pour l'antigène. On appelle 'Fragment antibody' (Fab) l'association entre les domaines VH-VL-CH1-CL. Chaque monomère d'immunoglobuline comporte donc deux Fab. La partie constante des deux chaînes lourdes associées comportant les domaines CH2- CH3, voire CH4) constitue le Fc. Cet acronyme désigne historiquement la capacité de cette structure à cristalliser lorsque des immunoglobulines sont digérées par de la papaïne. (fig.2) (Batteux et al .,2007)

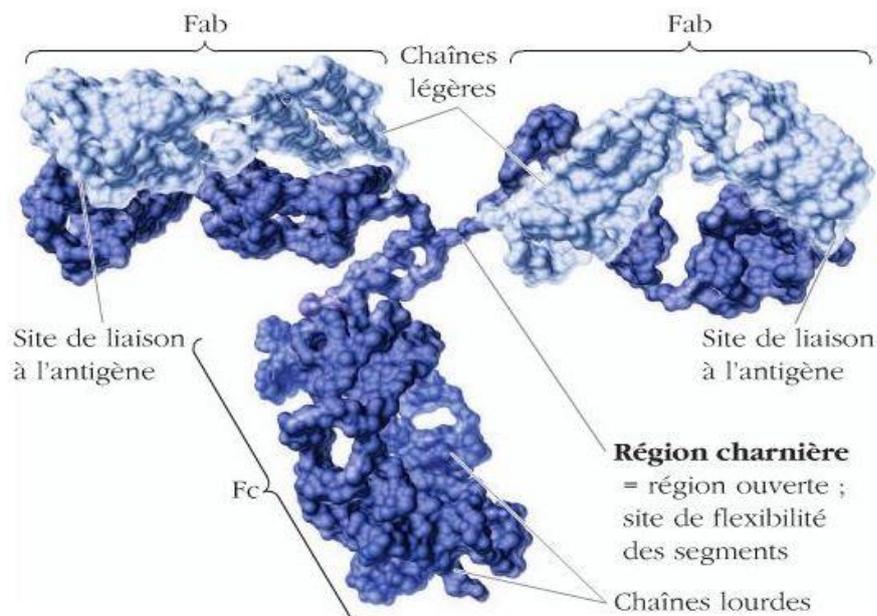


Figure 2 :Structure tridimensionnelle d'une IgG.(Kuby et al.,2014)

1.3. Les anomalies des Immunoglobulines :

Le taux d'immunoglobulines du sérum est constitué de l'association des produits de multiples clones. Il existe un équilibre fortement régulé de ces taux d'Ig sous l'action combinée d'une synthèse de novo d'immunoglobulines et d'un catabolisme.

Dans différentes circonstances, il existe un dérèglement de cet équilibre on distingue différentes situations :

- Stimulation de la production de très nombreux clones responsable d'une hypergammaglobulinémie polyclonale
- Stimulation de la production de quelques clones : oligoclonalité
- Production excessive d'un seul clone : immunoglobuline monoclonale (Roitt.,2002)

1.4. Protéine monoclonale « Immunoglobuline monoclonale » :

Les protéines monoclonales sont des immunoglobulines «Ig» ou une partie d'immunoglobuline qui est présentée lors à l'électrophorèse d'un pic étroit. (sebia.,2011)

Le Larousse médicale nous indique que : « Immunoglobuline monoclonale est un Anticorps issu d'une seule lignée de cellules, ce qui leur confère une homogénéité anormale.

✓ Origine :

Les plasmocytes normaux produisent des immunoglobulines, qui sont des anticorps nécessaires pour combattre une infection.

Les plasmocytes anormaux présents chez les patients atteints de gammopathie, ne produisent pas d'anticorps en réponse à une infection. Ils produisent en fait une immunoglobuline monoclonale qui ne fonctionne pas comme un anticorps. Cette immunoglobuline peut être composée de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères (Fig 3) ; de chaînes légères uniquement ; ou de fragments/combinaisons de cette molécule d'immunoglobuline qui sont uniques chez chaque patient atteint de gammopathie.

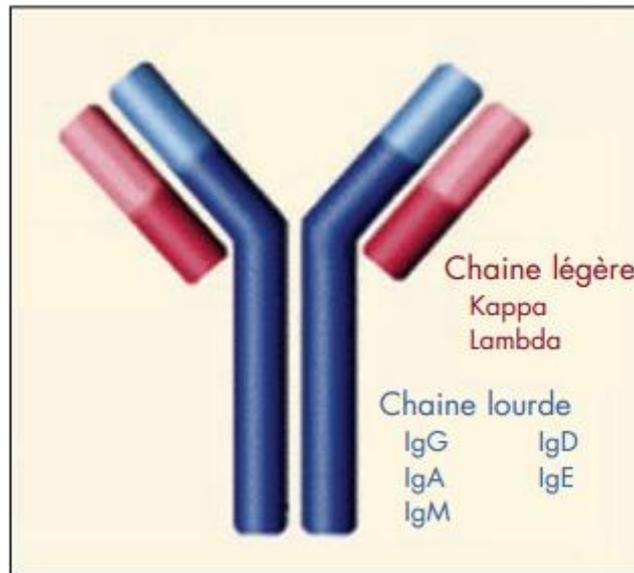


Figure 3 : Structure d'une immunoglobuline monoclonale (*sebia.,2011*)

Les plasmocytes produisent séparément des chaînes lourdes et des chaînes légères, et ces chaînes sont par la suite assemblées pour former une immunoglobuline complète.

Pour certaines raisons, les plasmocytes produisent une quantité plus importante de chaînes légères que de chaînes lourdes. Ainsi, après l'assemblage de l'immunoglobuline complète, il reste quelques chaînes légères en excès. Ces chaînes sont appelées « chaînes légères libres CCL » (les chaînes légères qui entrent dans la composition de l'immunoglobuline complète sont appelées « chaînes légères liées », car elles sont associées aux chaînes lourdes). (*Sebia.,2011*)

L'excès des CCL passe dans la circulation sanguine et est par la suite filtré par les reins « CCL filtrées à travers le glomérule rénal puis réabsorbées par le tubule proximal ». (*Rivier.,2012*)

Les reins sont ensuite capables de réabsorber ces CCL et de les recycler en acides aminés (éléments de base permettant la construction de toutes les protéines du corps).

Cependant, en présence d'une protéine monoclonale dans le sérum d'un individu, la quantité de CCL devient trop importante pour que les reins puissent en réabsorber la totalité. Dans ce cas, les chaînes légères libres monoclonales peuvent être présentes dans les urines ; elles sont alors appelées Protéines de Bence Jones « PBJ » (du nom du médecin qui les a décrites pour la première fois). (*Sebia., 2011*)

Il existe 2 types des Ig monoclonales :

Tableau 1 : les types d'Immunoglobulines monoclonales.

Ig monoclonale complète (95%)	Ig monoclonale incomplète (5%)
<ul style="list-style-type: none"> - Deux chaînes lourdes de même classe et sous-classe. - Deux chaînes légères de même type :IgG(70%), IgM(12%) ,IgA(15%), plus rarement IgD et E ,Biclonale (3%) .(Deconinck.,2010) 	<ul style="list-style-type: none"> - Chaînes légères libres monoclonales de type K ou λ (Pic monoclonal invisible à l'électrophorèse). - Chaînes lourdes monoclonales (rares) de type α, δ ou μ(Pic monoclonal inconstant). .(Deconinck.,2010)

2. GAMMAPATHIE :

2.1 Définition :

Une gammopathie qu'on appelle également dysglobulinémie désigne une anomalie qualitative ou quantitative des globulines, et aussi une maladie bénigne ou maligne, produisant de façon clonale une Ig identique. Elles ont tendance à augmenter en fréquence avec l'âge et sont souvent asymptomatiques. (Glavey. ,2016)

- Il existe 2 types de Gammopathie : polyclonale et monoclonale

La gammopathie polyclonale (GP) qui s'appelle aussi: hypergammaglobulinémie diffuse. Elle se traduit par une augmentation des γ -globulines dite en « dôme » (on notera parfois que la migration se fait également sur les β -globulines avec le typique bloc β - γ). Il s'agit d'une stimulation polyclonale des lymphocytes B quel qu'en soit le mécanisme, qui peut être en rapport avec des pathologies infectieuses chroniques, des hépatites chroniques, des maladies auto-immunes, et lors de certains cancers. (Andrès.,2013)

2.2. La gammopathie monoclonale :

Une gammopathie monoclonale (GM) est définie par la présence dans le sérum et/ou les urines d'une immunoglobuline monoclonale caractérisée par un seul type de chaîne lourde surtout IgG et IgM, plus rarement IgA voire IgD et IgE, et un seul type de chaîne légère (Kappa ou Lambda) parfois incomplète.

La présence d'une GM témoigne de la prolifération d'un clone de plasmocytes producteur d'une Ig monoclonale. Elle peut être révélatrice d'une hémopathie maligne, mais le caractère monoclonal n'est pas synonyme de malignité. (*Andrès.,2013*)

2.2.1 Découverte et caractérisation :

La découverte d'une GM, par rapport aux GP, a été introduite pour la première fois en 1960 par Jan Waldenström qui distinguait ainsi, parmi les patients présentant une hypergammaglobulinémie ceux chez qui on observait une bande étroite à l'électrophorèse des protéines sériques (EPS).

Cet examen permet la détection des GM sous la forme d'une bande étroite migrant habituellement dans la région des gammaglobulines, parfois dans la région des bêta-globulines, ou exceptionnellement dans celle des α_2 -globulines. L'électrophorèse en gel d'agarose est la technique de référence. Une quantification est possible sur l'EPS.

L'immunofixation permet de confirmer l'existence d'une Ig monoclonale et de la caractériser en affirmant le type de chaîne lourde (IgG, IgM... IgE) et de chaîne légère (Kappa ou Lambda). (*Andrès.,2013*)

De façon globale, 70 % des Ig monoclonales sont des IgG, 15 % des IgA et 15 % des IgM. Une gammopathie bi- voire tri-clonale peut être exceptionnellement rapportée, sans que cela préjuge de son étiologie. La chaîne légère est de type Kappa chez 60 % des sujets et de type Lambda chez 40 %. (*Andrès.,2013*)

2.2.2 Les techniques de révélations :

La détection du composant monoclonal se fait par la technique d'EPS, et l'identification de sa nature par immunofixation (IFX)

a. L'électrophorèse des protéines :

✓ Définition :

L'électrophorèse des protéines est une analyse de laboratoire basée sur la séparation de protéines dans un champ électrique. Pour faire ce test, les laboratoires peuvent utiliser un milieu solide (tel que le gel d'agarose) ou des tubes de silice extrêmement fins remplis de liquide, appelés : capillaires. Lorsqu'un échantillon contenant un mélange de protéines différentes est déposé sur un gel ou injecté dans un capillaire, les différentes protéines du mélange seront séparées en fonction de leur charge électrique (fig.4). (Sebia.,2011)

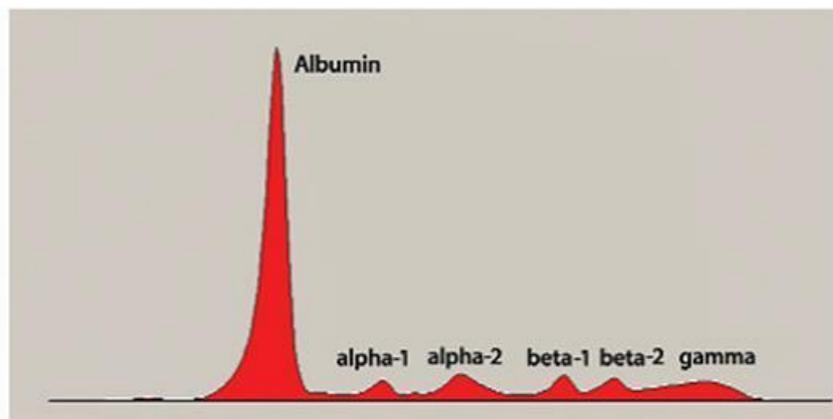


Figure 4 : Représentation d'un résultat normal d'électrophorèse des protéines sériques d'un sérum normal. (Sebia.,2011)

Pour rechercher une protéine monoclonale, les laboratoires analysent le sérum et les urines par électrophorèse des protéines qui est le seul test permettant de confirmer la monoclonalité sans aucune ambiguïté. (Sebia.,2011)

Il existe 2 types d'électrophorèse :

✓ Electrophorèse des protéines sériques:

C'est une technique de séparation des protéines sériques en cinq ou six fractions « Albumine, Alpha-1, Alpha-2, Bêta (qui pourra être séparée en Bêta-1 et Bêta-2) et Gamma » selon la méthode de L'EPS utilisée par le laboratoire capillaire ou bien sur gel.

Les immunoglobulines normales (polyclonales) présentes dans le sérum diffèrent légèrement les unes des autres dans leur structure et leur charge électrique. Par conséquent, après l'électrophorèse, elles forment une large zone diffuse et symétrique sans aucune déformation visible (zone Gamma).

Par contre, Les protéines monoclonales « sont produites par un seul clone de plasmocytes », Elles sont identiques entre elles et possèdent exactement la même charge électrique. C'est pour cette raison qu'elles migrent en formant un pic sur le tracé d'électrophorèse. Dans la plupart des cas, le pic se trouve au niveau de la zone Gamma (fig5), cependant, il est possible de le trouver dans la zone Bêta-2 (fig 6), Bêta1 voire même dans la zone Alpha-2 (ce dernier cas reste rare). (Sebia.,2011)

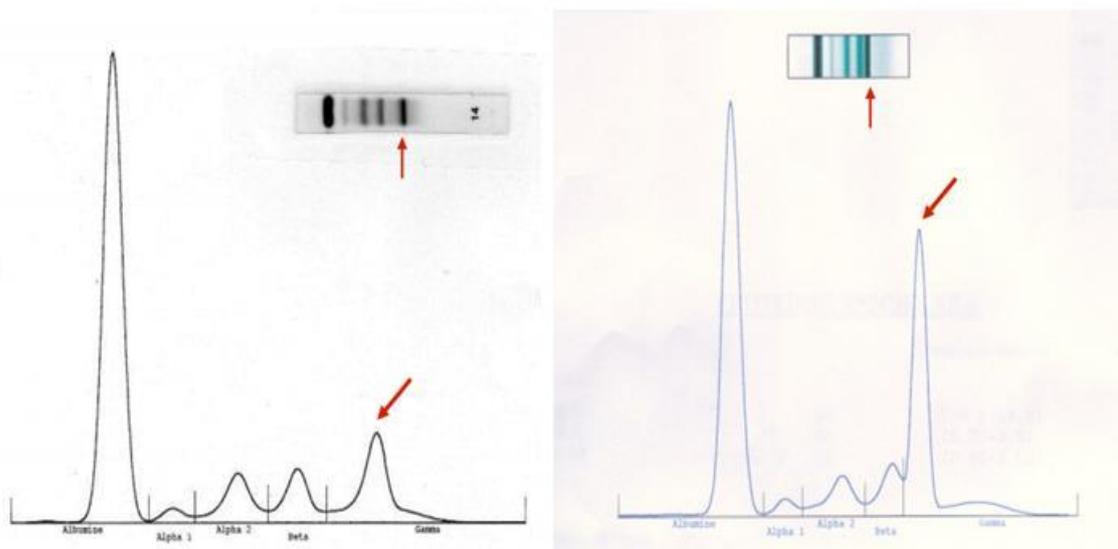


Figure5 : tracé électrophorétique anormal

L'EPS peut être utilisée pour rechercher une protéine monoclonale mais aussi dans le suivi du patient pour quantifier la protéine monoclonale.

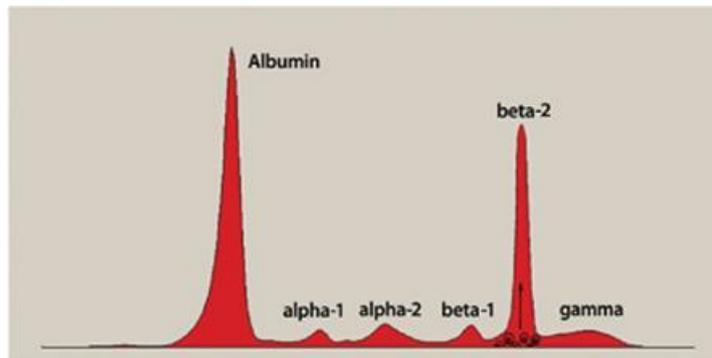


Figure 6 : Représentation d'un résultat anormal d'électrophorèse des protéines sériques
(*sebia.,2011*)

✓ **Electrophorèse des protéines urinaires:**

Lorsqu'une protéine monoclonale est présente dans le sérum, un excès de chaînes légères libres sera souvent présent dans l'urine, appelé protéine de Bence Jones. Elles seront visibles sous forme d'un pic étroit, le plus souvent dans la zone Gamma ou Bêta.

L'électrophorèse des protéines urinaire(EPU) est utilisée dans le but de rechercher une protéine de Bence Jones et de suivre sa concentration dans le temps. Cette technique peut également permettre l'évaluation des lésions rénales qui représentent une complication fréquente du myélome multiple.

Le résultat de l'électrophorèse des protéines urinaires ressemble alors à celui du sérum avec cinq ou six fractions visibles. (*Sebia.,2011*)

b. L'immunofixation :

Lorsqu'un pic étroit est détecté sur le tracé de l'électrophorèse des protéines, la présence d'une protéine monoclonale est suspectée. Il est alors nécessaire de confirmer sa présence et de déterminer la nature en identifiant le type de chaînes lourdes et légères qui la composent. La connaissance du type de la protéine-M est importante à la fois pour poser un diagnostic et suivre le patient.

L'immunofixation (IFX) est une technique complémentaire de l'électrophorèse. Elle est effectuée à l'aide des antisérums monospécifiques permet l'identification des bandes monoclonales dépistées par électrophorèse. (fig.7) (*guide sebia.,2010*)

Les techniques d'IFX sont plus sensibles que les méthodes d'électrophorèse des protéines. Elles peuvent détecter de faibles bandes monoclonales qui ne sont pas visibles à l'électrophorèse. (Sebia.,2011)

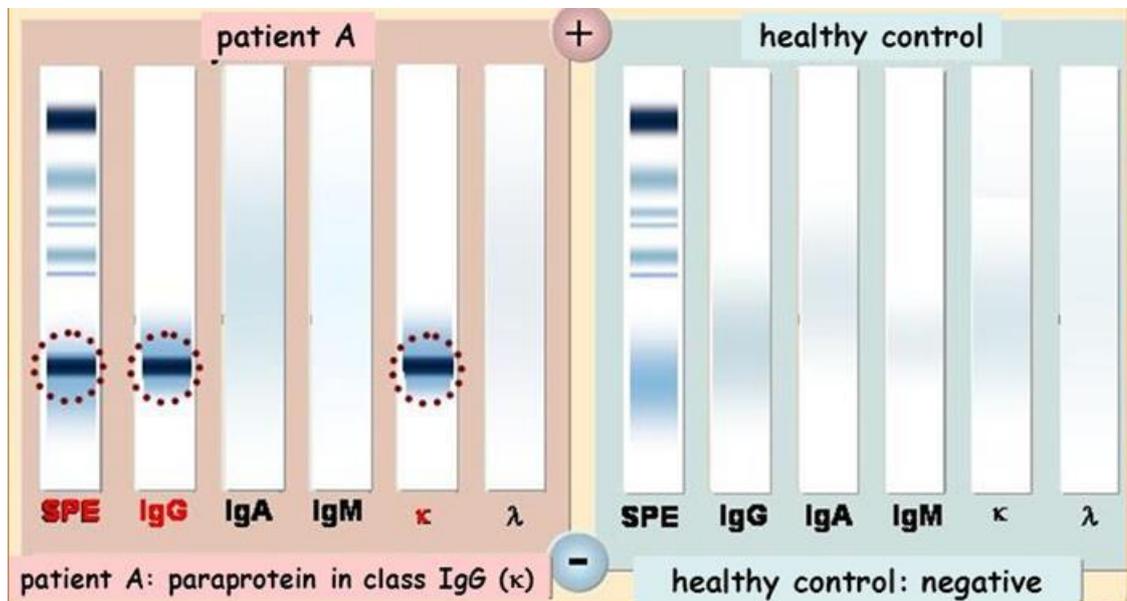


Figure7 : L'immunofixation (Séve.,2012)

2.2.3 Types de GM :

Les GM sont très variées mais peuvent être classées en 3 catégories :

Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), Hémopathies malignes, essentiellement myélome multiple et macroglobulinémie de Waldenström, Gammopathies associées à diverses pathologies « non lymphoïdes » non Malignes. (Andrès.,2013)

a. Gammopathie monoclonale de signification indéterminée :

La gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) est une GM sans aucun signe clinique ou biologique des hémopathies malignes, elle est définie par la présence d'une immunoglobuline (Ig) monoclonale dans le sérum à une valeur inférieure à 30 g/l en l'absence de lésions osseuses, d'anémie, d'hypercalcémie ou d'insuffisance rénale liée à une prolifération de plasmocytes monoclonaux et moins de 10% de plasmocytes médullaires monoclonaux. Il s'agit d'un état précédant potentiellement l'apparition d'un myélome ou d'un syndrome lymphoprolifératif. (Glavey.,2015)

Le terme souvent employé de GM « bénigne » est inapproprié. En effet, les MGUS sont considérées comme des états pré-néoplasiques, une partie d'entre-elles évoluant vers une hémopathie maligne. Le risque évolutif est « faible », estimé à 1% par année de suivi. Dans une grande série de GM suivies 20 ans, 25% des sujets porteurs d'une MGUS développeront une hémopathie maligne. (*Glavey.,2015*)

b. GM associées à diverses pathologies "non lymphoïdes" (non Malignes) :

Diverses affections « non lymphoïdes » ont été associées à l'apparition de GM : Infections, Maladies auto-immunes, Hépatopathies chroniques, Déficits immunitaires... Elles sont le plus souvent à l'origine d'une augmentation polyclonale des Ig .

Toutes les infections : virales (EBV, CMV, VIH), bactériennes (endocardite, ostéomyélite, tuberculose) ou parasitaires (leishmaniose, paludisme, toxoplasmose) peuvent être associées à une GM.

Toutes les maladies auto-immunes :(polyarthrite rhumatoïde, Sjögren, LEAD...) peuvent être responsables de GM.

Toutes les hépatopathies chroniques : quelle qu'en soit l'étiologie (auto-immune, virale [VHB, VHC], toxique...), peuvent s'accompagner d'une GM.

Un déficit immunitaire : le plus fréquent étant le déficit immunitaire commun variable (DCIV), peut être paradoxalement responsable de l'apparition d'une gammopathie monoclonale. (*Andrès.,2013*)

C. Hémopathies malignes :

La présence d'une Ig monoclonale est le témoin de la prolifération d'un clone lymphoplasmocytaire (lignée lymphocytaire B). En cas de monoclonalité, ce dernier peut correspondre à une prolifération maligne à type de myélome multiple, macroglobulinémie de Waldenström, leucémie lymphoïde chronique ou lymphome malin non hodgkinien. (*Coffer.,2011*)

✓ **Maladie de Waldenström :**

Pour les GM à IgM, le principal diagnostic est la maladie de Waldenström définie par :

- la sécrétion d'une dysglobuline monoclonale de type IgM(>5 g/L)
- une infiltration lympho-plasmocytaire « une prolifération lympho-plasmocytaire clonale médullaire »
- une lymphocytose sanguine clonale, non systématique

Elle peut associer à une hypertrophie ganglionnaire, splénique ou hépatique, des signes généraux (amaigrissement, sueurs), une anémie de mécanismes divers.

L'Ig peut être responsable d'un syndrome d'hyperviscosité avec céphalées, vertiges, d'une activité auto-immune (cryoglobulinémie, Anti-myéline avec neuropathie, hémolyse).
(Coffer.,2011)

✓ **Leucémie lymphoïde chronique :**

La leucémie lymphoïde chronique correspond à une prolifération monoclonale de lymphocytes B matures, de siège médullaire et sanguin. Les lymphocytes sont le plus souvent normaux morphologiquement, mais anormaux au plan fonctionnel.

3. Myélome multiple :

3.1 Histoire de myélome multiple :

Le myélome multiple est une maladie connue depuis longtemps ; voici les dates les plus marquantes à propos cela :

- le 20 avril 1844 à Londres : le décès de Sarah Newbury, le premier cas de MM à l'âge de 39 ans.
- 1873 : le terme de *multiple myeloma* apparaît pour la première fois sous la plume du Dr Von Rustistky.
- Juillet 1879 : La maladie a été également connue comme la maladie de Kahler, après l'un des premiers cas les plus remarquables.
- 1960 : le melphalan. L'association melphalan + corticoïde comme premier traitement efficace de MM

- Depuis la fin des années 1990 : plusieurs molécules ont démontré leur efficacité (thalidomide, bor-tézomib, lénalidomide) ouvrant la page d'une nouvelle ère thérapeutique alliant recherche transrationnelle et progrès cliniques.(Moreau et al., 2010)

3.2 Définitions du myélome multiple :

Le myélome multiple (MM) ou maladie de Kahler est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération clonale incontrôlée de plasmocytes médullaires envahissant la moelle osseuse et sécrétant le plus souvent une immunoglobuline monoclonale complète (IgG, IgA, IgM et rarement IgD et IgE) ou un fragment de cette immunoglobuline (chaîne légère kappa ou lambda). (Wainsten.,2012, *Référentiel Onco-hématologie.*,2014, Touaoussa .,2015 ,Wainstenet al.,2012)

Cette maladie doit son nom au médecin autrichien Otto Kahler qui l'a décrite pour la première fois il y a une centaine d'années. Le myélome multiple représente 80 % des gammopathies monoclonales malignes et environ 10 % à 15% des cancers hématologiques, ce qui le situe au deuxième rang par ordre de fréquence après les lymphomes. (*International Myeloma Foundation.*,2008/2009)

3.3 Les aspects phénotypiques des plasmocytes normaux et tumoraux :

En situation physiologique, les plasmocytes sont des cellules rares qui ne représentent que 0,14 à 0,3 % des cellules médullaires. Au plan morphologique, Les plasmocytes normaux et réactionnels sont faciles à identifier sur les frottis de moelle osseuse humaine car le plasmocyte normal est de forme ovale ou ellipsoïde et son diamètre varie entre 15 à 30 µm.

Les plasmocytes normaux présentent un petit noyau excentré à chromatine mature très compacte déporté à un pôle, parfois ovalaire à grand axe perpendiculaire à celui de la cellule dont le nucléole n'est pas visible et un cytoplasme abondant et fortement basophile après coloration de MGG. Leur cytoplasme est presque totalement rempli par de longs profils parallèles de réticulum endoplasmique rugueux et par un volumineux appareil de Golgi (correspondant à l'archoplasme de la microscopie optique), montrant que leur fonction principale est la synthèse et l'excrétion protéique, dans le cas présent une immunoglobuline (Ig).(fig.8)

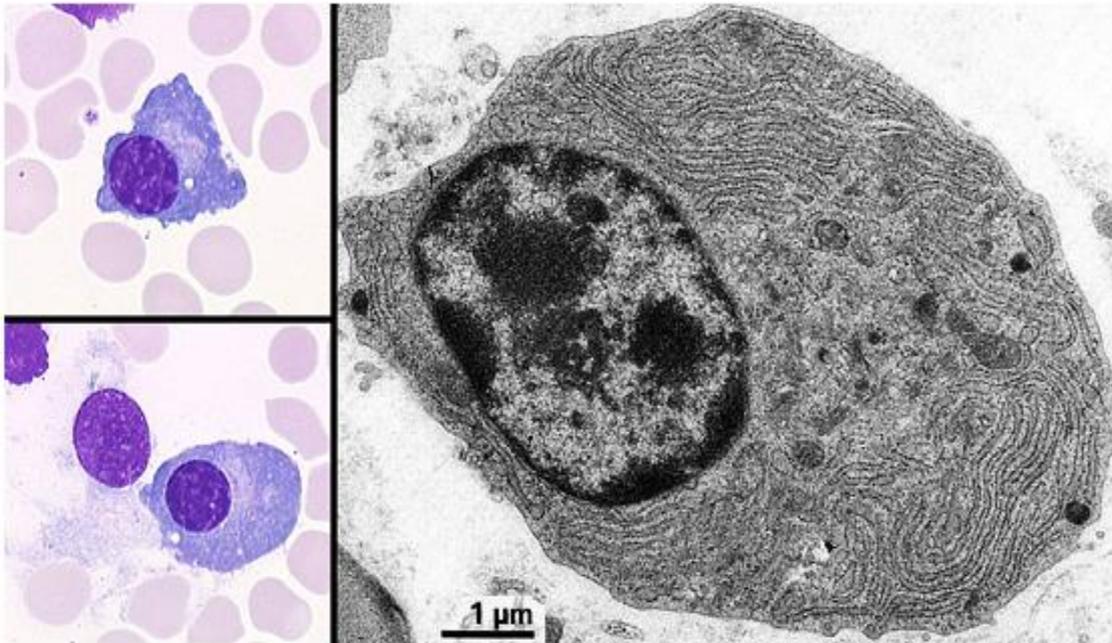


Figure 8 : Plasmocytes de moelle osseuse humaine normale après coloration au MGG (à gauche, $\times 400$, à droite : microscopie électronique, contraste au citrate de plomb et acétate d'uranyle). (Ribourtout *et al.*, 2015)

Le plasmocyte malin peut être cytologiquement proche de la forme non tumorale ou, au contraire, s'en distinguer très nettement. Le plasmocyte malin présente des caractères d'immaturation comme en témoigne la présence de nucléoles dans le noyau. La microscopie électronique met en évidence un asynchronisme nucléo-cytoplasmique (noyau immature et cytoplasme mature). L'existence de nombreuses mitoses est aussi un signe de malignité. (Moreau *et al.*, 2010)

Le phénotype du plasmocyte tumoral est un intermédiaire entre le stade plasmablastique et plasmocytaire mature : son index de prolifération est notamment inférieur à celui des plasmablastes (moins de 1%), par ailleurs, il sécrète des taux d'Ig très inférieurs aux plasmocytes matures. (Sprynski, 2009)

L. Terstappen souligne *l'hétérogénéité du phénotype* des plasmocytes normaux d'un individu à l'autre et chez un même individu. Dans le milieu médullaire, il coexiste deux groupes de plasmocytes (*San Miguel et al.,2008*). Ils ont en commun l'expression du CD38, une immunoglobuline (Ig) de surface et l'absence d'expression du CD15 et du CD16. Les CD10, CD11, CD13, CD14, CD19, CD20, CD22, CD33, CD35, CD45 et le HLA-DR (Human Leukocyte Antigen - antigen D Related) sont variablement exprimés. (*Moreau et al.,2010*)

Dans le MM, le plasmocyte malin peut exprimer le CD56 et le CD28 (*Dimopouloset al.,2007*). Pour J. San Miguel, les plasmocytes peuvent être considérés comme normaux s'ils expriment le CD38 fortement mais pas le CD56, le CD20, le CD28, le CD33 ni le CD117. (*Ludwig et al.,2004*)

Comme leur contrepartie normale, les plasmocytes malins ont un profil phénotypique hétérogène d'un patient à l'autre et au sein de la population tumorale d'un même patient. R. Garcia-Sanz a démontré que plus de 70 % des patients ont des plasmocytes tumoraux qui exprimaient le CD56 et que 30 à 70 % des patients expriment le CD13, le CD117, HLA-DR mais seulement 17 % des cas expriment le CD20. Moins de 10 % des cas expriment le CD15 et le CD10. (*Aapro et al.,2007*)

Le plasmocyte malin est donc une cellule complexe avec une diversité morphologique, phénotypique mais aussi cytogénétique. Il faut donc retenir qu'il existe des marqueurs phénotypiques qui signent la malignité du plasmocyte et que la population tumorale n'est pas homogène. Ainsi, le niveau d'expression du CD45 permet de distinguer, au sein de la population tumorale, deux populations distinctes sous la dépendance de deux facteurs exogènes majeurs dans la physiopathologie de la maladie : l'interleukine-6 (IL-6) et le récepteur de type 1 du facteur de croissance de type insuline (IGF-1R). (*Dimopouloset al.,2007*)

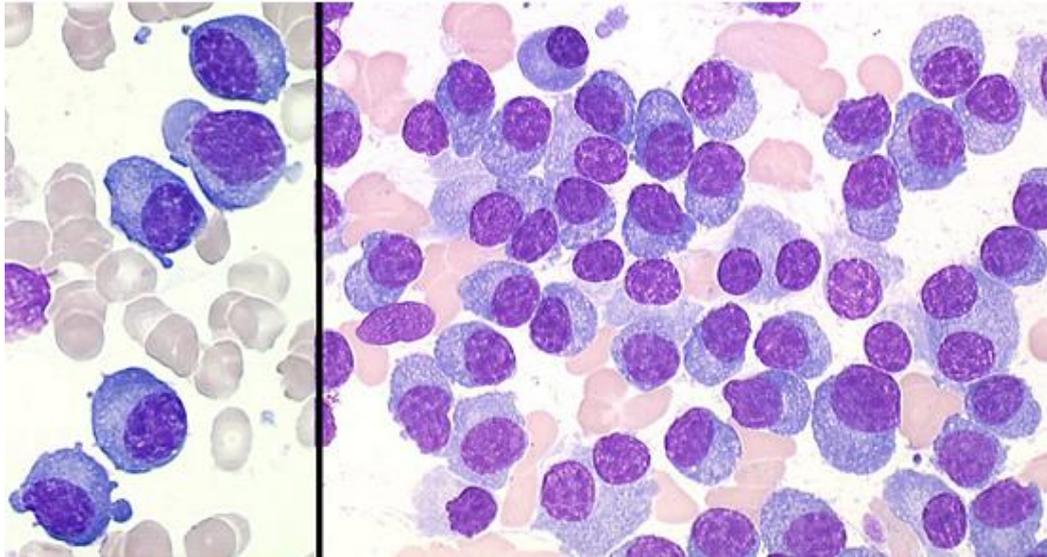


Figure 9 :Plasmocytes matures au cours du myélome multiple. (À droite× 250, à gauche× 400, coloration MGG). (Ribourtout et al., 2015)

3.4 Etiologie :

L'étiologie du MGUS, SMM et du MM demeure incertaine, et elle est sujette d'enquêtes récentes qui ont révélé la contribution de plusieurs facteurs parmi lesquels on trouve : la Race qui semble-t-il joue un rôle étant donné la prévalence des MGUS chez les Afro-Américains et les Noirs d'Afrique et qui est selon certaines études deux à trois fois supérieure à celle de la population générale aux Etats-Unis.

D'autres facteurs de risque identifiés pour MGUS incluent l'âge avancé, le sexe masculin, l'exposition aux pesticides, et des antécédents familiaux de MGUS ou MM. Des études plus récentes confirment le rôle de facteurs génétiques et environnementaux dans le développement du myélome multiple et ses Etats précurseurs.

Bien que les causes exactes de MM demeurent insaisissables, notre compréhension des événements cellulaires qui sous-tendent son développement est de plus en plus claire. Cela a été facilité par des décennies de recherche et l'amélioration des techniques scientifiques qui ont permis la dissection des changements qui se produisent au cours de la genèse du MGUS, SMM et MM. (Touaoussa.,2015)

3.5 Physiopathologie du myélome multiple :

3.5.1 Rappel Physiologique :

Les cellules B précurseur (pro-B puis pré-B), présentes dans la moelle osseuse, subissent des réarrangements des gènes du locus de la chaîne lourde des IgH (segments VDJ) et de ceux de la chaîne des IgL, ce qui conduit à des cellules B immatures. Les cellules exprimant un BCR fonctionnel de type IgM (cellules B matures) quittent la moelle osseuse et vont dans la circulation périphérique jusqu'aux organes lymphoïdes.

Après contact avec un antigène, ces cellules vont soit se différencier en plasmocytes à courte durée de vie ou soit former un centre germinatif où seulement les lymphocytes B de forte affinité seront sélectionnés (mécanismes d'hypermutation et de sélection des antigènes). A l'issue de ce processus, les lymphocytes sélectionnés vont se différencier soit en lymphocytes B mémoires soit en plasmablastes qui rejoindront la moelle osseuse où ils termineront leur différenciation en plasmocytes à longue durée de vie. (Kuehl et al.,2002)

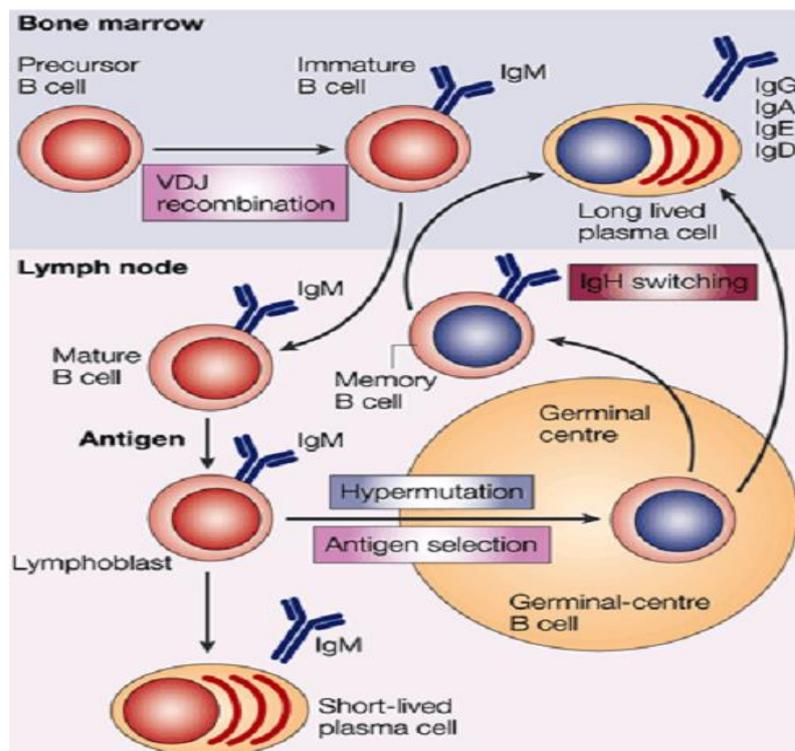


Figure 10 : La différenciation plasmocytaire. (Kuehl et al.,2002)

3.5.2 Origine de l'évènement transformant : anomalies cytogénétiques :

Les translocations chromosomiques en 14q32 sont caractéristiques des hémopathies malignes de la lignée B.

Elles intéressent le locus codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines (IgH). On pense que cette erreur de recombinaison du locus IgH survient dans un lymphocyte B mémoire, activé dans les centres germinatifs ganglionnaires ou spléniques, lors de l'hypermutation somatique ou surtout de la commutation de classe.

Ces translocations vont aboutir à mettre les gènes partenaires sous dépendance des enhanceurs du locus IgH, et donc à les hyperexprimer. (CHAÏBI *et al.*,2002)

Et voilà Au cours du MM, de multiples anomalies cytogénétiques s'accumulent. Elles peuvent être détectées par des techniques d'hybridation in situ (FISH) sur des cellules non proliférantes. (Sprynski.,2009)

3.5.3 Les différentes phases de transformations :

Selon Bergsagel et son équipe, on peut considérer trois étapes dans l'évolution du MM :

✓ La phase initiale :

Des erreurs intéressant l'ADN, se produisent lors des réarrangements VDJ, des hypermutations somatiques ou lors de la commutation isotypique. Ces erreurs entraînent le dysfonctionnement de certains oncogènes par leur juxtaposition avec l'enhancer (activateur) du gène IGH (immunoglobulin heavy locus (human)) et plus rarement avec IGL (immunoglobulin light locus).elles interviendraient principalement dans l'immortalisation des plasmocytes. (Touaoussa.,2015)

✓ La phase secondaire chronique dite active :

Tous ces remaniements génétiques provoquent une instabilité chromosomique. D'autres mutations sont alors observées, comme le dérèglement des oncogènes ras (N-RAS et K-RAS). Ces mutations sont rencontrées dans 40% des cas et provoquent l'indépendance des cellules à IL6 et le blocage des phénomènes d'apoptose. (Touaoussa.,2015)

✓ La phase fulminante ou accélérée :

Jusqu'à cette phase, les plasmocytes restent intra-médullaires ; un envahissement extramédullaire caractérise la progression de la maladie. Le gène suppresseur de tumeur p53 est muté dans 5 à 10% des cas et empêche l'apoptose des plasmocytes. Des translocations secondaires plus complexes et parfois indépendantes du gène IgH sont détectées, comme la dérégulation du gène C-MYC positionné en 8q24 qui serait impliqué dans l'immortalisation du clone tumoral. (*Touaoussa.,2015*)

3.5.4 Mécanismes de signalisation dans les cellules myélomateuses : Stimulation par l'environnement :

Le myélome multiple est caractérisé par une accumulation de plasmocytes tumoraux dans la moelle osseuse. Ces plasmocytes présentent de nombreuses anomalies cytogénétiques qui ne sont pas suffisantes pour induire leur survie et leur croissance. Ces plasmocytes tumoraux restent dépendants de l'environnement médullaire. Ce microenvironnement exprime des molécules d'adhésion et synthétise des cytokines indispensables à la croissance du clone myélomateux. (*Géraldine.,2006*)

3.5.5 Rôle des molécules d'adhésion, cytokines, et du celluesstromales de la MO dans le MM :

L'adhésion des plasmocytes malins au cours du MM aux cellules stromales de la moelle osseuse déclenche la sécrétion de cytokines à médiation cellulaire nommés (cytokine-mediated tumour cell growth), qui favorisent la survie, et la migration des plasmocytes. (*Géraldine.,2006*)

Les cytokines secrétées à la fois par les cellules stromales et par les plasmocytes malins (préalablement stimulées par les cellules stromales) vont activer plusieurs voies de signalisation cellulaire qui restent des cibles thérapeutique potentielles (*Géraldine.,2006*)(la voie JAK/STAT, MAPK , PI-3K/Akt , NF-kB).

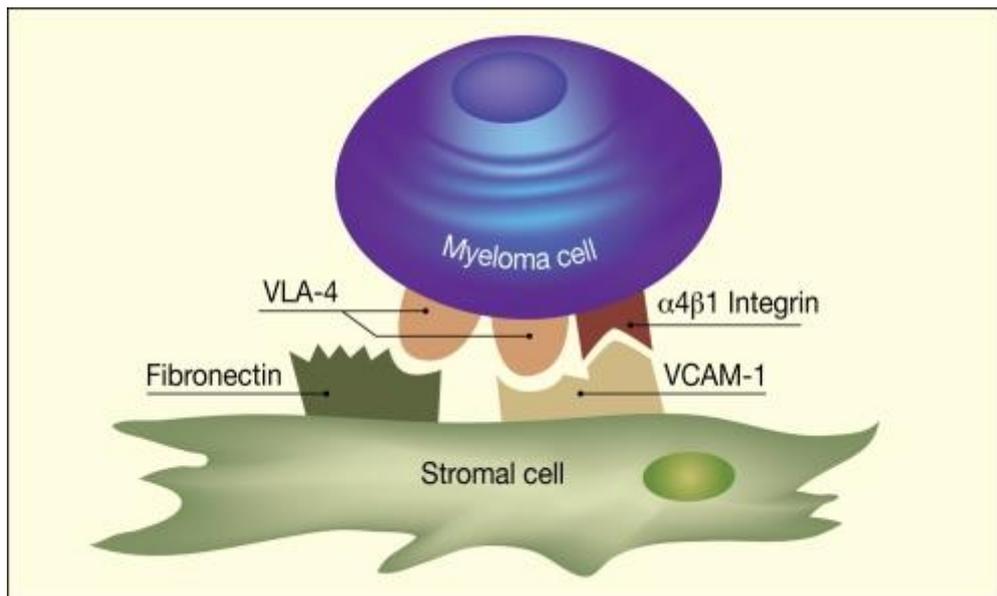


Figure 11 : l'adhésion de la cellule de myélome à la cellule stromale de la moelle osseuse (Touaoussa.,2015)

3.6 Le diagnostic du myélome multiple :

Le diagnostic de MM est basé sur l'association d'une plasmocytose médullaire supérieure à 10 %, d'une immunoglobuline monoclonale sérique et/ou urinaire à titre significatif et de signes cliniques en rapport avec la prolifération plasmocytaire maligne. Bien qu'il reste à ce jour incurable, le MM a connu, ces dernières années, des progrès permettant une amélioration de la prise en charge des patients. (Bouatay et al.,2012)

3.6.1 Présentation clinique :

Quelques présentations cliniques sont décrites sur le tableau suivant :

Tableau 2 : Présentation clinique du MM

Présentation clinique	Description
État général	- L'altération de l'état général représente un des signes les plus fréquents au diagnostic.
Un syndrome anémique	- Une anémie
Manifestations osseuses	- des douleurs osseuses sont très fréquentes ; localisées ou diffuses (le rachis, le gril costal, le bassin... - des fractures pathologiques - des tassements vertébraux - des déformations (gibbosité : une déformation du thorax, scoliose: déformation de la colonne vertébrale) - Sur le plan radiologique l'aspect le plus caractéristique est celui des géodes.
Insuffisance rénale	- la précipitation de cylindres, formés de chaînes légères d'immunoglobulines et de protéines de Tamm-Horsfall, dans les tubules distaux (chez 50 % des patients).(<i>S. Manier.,2011</i>)
Syndrome infectieux	- un déficit de l'immunité humorale en lien avec une hypogammaglobulinémie, parfois profonde.
Risque thromboembolique	- plusieurs raisons : la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les plasmocytes tumoraux, la présence d'une immunoglobuline aux propriétés prothrombotiques.(<i>Gyan.,2014</i>)
Syndrome d'hyperviscosité	- Il s'observe lorsque le taux du composant monoclonal sérique (IgA ou IgG) est très élevé.(<i>Gyan.,2014</i>)

3.6.2 Signes biologiques :

Signes hématologiques :

La production des cellules sanguines au sein de la moelle osseuse peut être diminuée, les plasmocytes anormaux se développant au détriment des autres cellules. Le myélome multiple peut donc être associé à une anémie (baisse du nombre de globules rouges). (*La Société Française d'Hématologie.,2009*) Et par conséquent les modifications de l'hémogramme.

Anomalies biochimiques :

La vitesse de sédimentation (VS) : est très augmentée, souvent supérieure à 100 mm la 1ère heure. Dans certains cas, la VS est peu ou pas élevée : myélome à chaîne légère ou au cours du myélome non sécrétant.

Une augmentation de la protidémie est fréquente parfois il peut être supérieure à 100 g/l.

Le dosage pondéral des diverses classes d'immunoglobulines montre une augmentation de l'immunoglobuline sécrétée par le clone plasmocytaire malin et une diminution, voire un effondrement des autres classes d'immunoglobulines. Il apporte surtout une information pronostique, puisque son taux est pris en compte dans la définition des stades de Durie et Salmon.

L'étude de la protéinurie des 24 heures est faite à la recherche de la protéinurie De Bence-Jones. Elle correspond au passage dans les urines des chaînes légères libres caractérisée pour la première fois en 1848 par le médecin anglais Henry Bence Jones. (Touaoussa.,2015)

3.6.3 Bilan diagnostic :

Le bilan initial doit comprendre :

- FNS, plaquettes,
- Ionogramme, créatinine, calcémie, bilan hépatique, sérologies virales.
- Électrophorèse des protéines sériques et urinaire et immunoélectrophorèse (immunofixation) des protéines sériques et urinaires
- Protéinurie des 24 H, avec quantification de la chaîne légère urinaire par électrophorèse
- Dosage pondéral des immunoglobulines
- LDH, Béta 2 microglobuline, protéine C-réactive
- Éventuellement dosage des chaînes légères libre sériques (myélome non sécrétant, myélome à chaînes légères, amylose, plasmocytome,...)
- **Myélogramme** (biopsie ostéo-médullaire si moelle pauvre ou plasmocytome solitaire)
- **Caryotype** sur moelle avec FISH

•**Bilan radiologique osseux** de l'ensemble du squelette axial (crâne, rachis complet, bassin avec fémurs) + radiographie de thorax standard ± autres radiographies osseuses orientées par la clinique

•**IRM**

Cette classification est selon l'IMWG (Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Br J Haematol. 2003)(Gyan.,2014)

3.6.4 Diagnostic des différents myélomes:

Au myélome multiple on parle de deux types de critères qui orientent son diagnostic (selon CRAB) :

Les critères majeurs « obligatoires » (CMj) :

- Plasmocytes médullaires dystrophiques >10%
- Pic monoclonal >30 g/L

Les critères mineurs (CMi):

- Hypercalcémie (C)
- Insuffisance rénale (R)
- Anémie(A)
- Lésions osseuse (B)

Voilà une table qui montre les critères de diagnostic du différent myélome:

Tableau 3 : Diagnostic des différents myélomes

Types de myélome		myélome multiple symptomatique	myélome multiple asymptomatique	MGUS
Les critères				
CMj	Le composant monoclonal sérique	Présence d'un CM sérique et/ou urinaire et/ou d'un rapport de chaînes légères libres du sérum (CLL) anormal.	sérique \geq à 30 g/l et/ou urinaire \geq 1 g/24h	Taux du composant monoclonal < 30 g/l
	Plasmocytes médullaires dystrophiques	Plasmocytose clonale dans la moelle osseuse et/ou une lésion plasmocytaire extra osseuse documentée	Et / ou \geq à 10 % de plasmocytes dans la moelle	Plasmocytose médullaire < 10%
CMi	Hypercalcémie	Hypercalcémie \geq 11,5 mg/dl (ou 2,65 mmol/l)	Pas d'hypercalcémie : calcémie \leq 11,5 mg/dl ou 2,65 mmol/l	Absence
	Insuffisance rénale	avec créatininémie \geq 20 mg/L	Pas d'insuffisance rénale avec créatininémie \geq 20 mg/L	Absence
	Anémie	Anémie avec Hémoglobine \leq 10 g/dl ou \geq 2 g/dl en dessous de la limite inférieure de la normale,	Absence	Absence
	Lésions osseuses	Lésions lytiques osseuses ou ostéopénie,	Absence	Absence

3.7 Le myélome multiple en Algérie :

Selon les statistiques de l'année 2013, près de 2.000 Algériens souffrent de myélome multiple, avec une incidence de 1.1% pour 100.000 habitants, selon les résultats d'une enquête nationale, exposée lors du 10ème congrès maghrébin d'hématologie, organisé du 23 au 25 mai 2013 à Oran.

L'étude rétrospective, effectuée sur 6 ans (2006-2012), a relevé 1.938 patients atteints de myélome multiple. Environ 500 patients ont été diagnostiqués à l'est du pays, soit (26%), 1.054 (54.4%) dans la région centre et 388 patients à l'ouest, a-t-on indiqué, de même source. La moyenne d'âge des malades est de 63 ans, avec des limites entre 22 et 96 ans, a-t-on ajouté.

Probablement, en raison de l'utilisation répétée des pesticides, les travailleurs de la terre sont les plus touchés, avec 13%, les maçons viennent en deuxième place, avec près de 9%. Les médecins, les dentistes et les infirmiers sont touchés à moins de 1%, relève la même étude.

L'étude signale, selon l'oratrice, une augmentation du nombre d'atteints de cette affection diagnostiqués. Par rapport à la première, effectuée sur 12 ans, qui a décelé 1.515 malades, cette étude, sur six ans, a montré une augmentation du nombre de malades. Néanmoins, il reste inférieur au taux enregistré dans les pays occidentaux, estimé entre 4 à 7% sur 100.000 habitants. En outre, il a été relevé, dans cette enquête, l'apparition de la maladie chez un jeune de 22 ans, a indiqué Mme Saïdi. (*Santé MAG.*, 2013)

3.8 La prise en charge des patients qui atteignent le MM :

Un traitement n'est pas systématiquement débuté dès le diagnostic d'un myélome multiple. En effet, lorsque la maladie ne s'accompagne d'aucun symptôme, il a été montré au cours d'études qu'un traitement n'apporte pas de bénéfice sur l'évolution de la maladie. Une simple surveillance en consultation est alors suffisante, avec des bilans sanguins, urinaires et radiologiques réguliers.

Lorsque le myélome s'accompagne de symptômes, un traitement est nécessaire. Celui-ci prend en compte de nombreux paramètres, notamment l'âge et les antécédents du patient et les caractéristiques de la maladie (par exemple l'existence ou non d'une insuffisance rénale).

Le traitement du myélome multiple repose essentiellement sur la chimiothérapie. Les médicaments principaux sont les agents alkylants, les corticoïdes, les inhibiteurs de l'angiogénèse et les inhibiteurs du protéasome. D'autres médicaments sont volontiers associés, pour protéger l'os (bisphosphonates), prévenir ou traiter l'anémie (agents stimulant de l'érythropoïèse ou ASE), prévenir ou traiter les infections, lutter contre la douleur. (*société française d'hématologie.,2009*)

Diverses associations et séquences de traitement sont utilisées. Très schématiquement:

✓ **Pour les malades de moins de 65 ans:**

Le traitement commence par une chimiothérapie dite d'induction, d'environ quatre mois, qui a pour but de faire régresser rapidement les signes de la maladie et de permettre la collecte dans le sang de cellules souches qui seront utilisées ultérieurement. Ensuite, un traitement intensif, supporté par une autogreffe de cellules souches sanguines, est programmé. L'objectif est d'administrer une chimiothérapie (un alkylant) à forte dose, afin de détruire le maximum de cellules cancéreuses.

L'inconvénient du traitement intensif est qu'il entraîne une diminution très importante du nombre des cellules normales sanguines (ce que l'on appelle une aplasie). L'organisme se retrouve alors sans défense contre les infections. Pour limiter la durée de l'aplasie et faire en sorte que les cellules sanguines se reconstituent rapidement, on pratique une autogreffe. Cela consiste à prélever chez le patient, avant la chimiothérapie intensive, des cellules souches capables de produire toutes les cellules normales du sang. Celles-ci sont recueillies au cours d'une cytophérèse, un procédé qui consiste à faire passer le sang dans un appareil qui ne retient que les cellules souches, puis elles sont congelées. Une fois le traitement intensif terminé, elles sont décongelées et réinjectées au patient afin de renouveler la population de cellules du sang. Cette procédure nécessite une hospitalisation de plusieurs semaines. La durée globale du traitement de première intention est habituellement de six à huit mois. (*société française d'hématologie.,2009*)

✓ **Pour les malades de plus de 65 ans:**

La chimiothérapie intensive avec autogreffe est rarement indiquée car trop risquée. Le traitement consiste à administrer une chimiothérapie classique sur une durée plus longue (douze à dix-huit mois).

Ces traitements permettent généralement d'obtenir une rémission, c'est-à-dire une absence de signes de la maladie, associée à une diminution de l'immunoglobuline monoclonale dans le sang et/ou les urines, et la prise des médicaments peut être interrompue. Une surveillance régulière est alors mise en place, avec des examens sanguins, urinaires et radiologiques.

Les traitements actuels ne permettent pas, dans la grande majorité des cas, d'obtenir une guérison. Après un temps variable selon les personnes, le myélome multiple tend à réapparaître. Un nouveau traitement, le plus souvent différent du premier, devra alors être mis en œuvre. (*société française d'hématologie.,2009*)

Partie pratique :

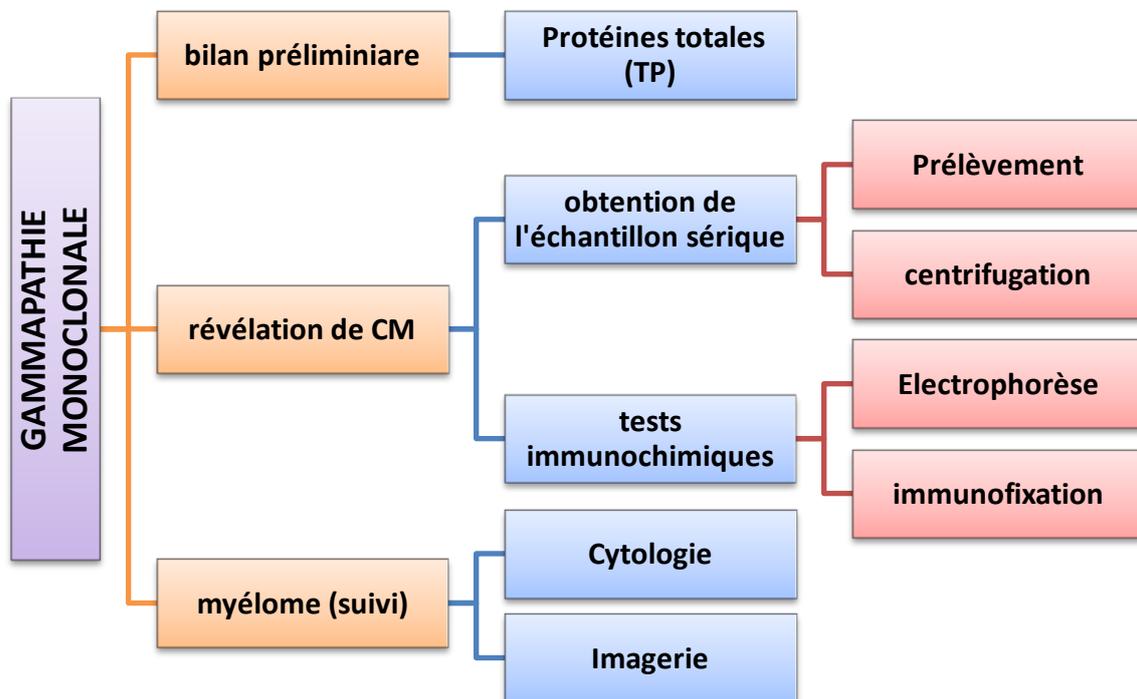
Patients et méthodes :

1. Présentation de l'étude :

Il s'agit d'une étude rétrospective, descriptive et analytique qui s'est déroulée au sein du laboratoire d'immunologie de l'Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine (HMRUC) entre 10 février et 10 mars 2016 et à l'établissement hospitalier universitaire (EHU) d'Oran pour le suivi de quelques cas de myélome multiple.

Quelles qu'en soient les circonstances, la découverte d'une immunoglobuline monoclonale justifie une démarche en quatre étapes:

- 1- Bilan préliminaire :
- 2- Révélation des composants monoclonaux
- 3- La cytologie (suivi en cas de suspicion d'un myélome)
- 4- Imagerie



2. Méthode :

2.1 Dosage des protéines totales :

✓ Principe :

Pour déterminer la concentration totale de protéines dans un mélange complexe par spectrophotométrie d'absorption, des méthodes colorimétriques sont souvent employées. L'une de ces méthodes est la méthode de Biuret, basée sur la réaction d'agents chromophores avec les liens peptidiques ou avec certains acides aminés des protéines. Cette réaction donne lieu à une coloration (dans la région visible) dont l'intensité (l'absorbance) est directement proportionnelle à la concentration de la protéine. Le réactif de coloration utilisé est le réactif de Gornall.

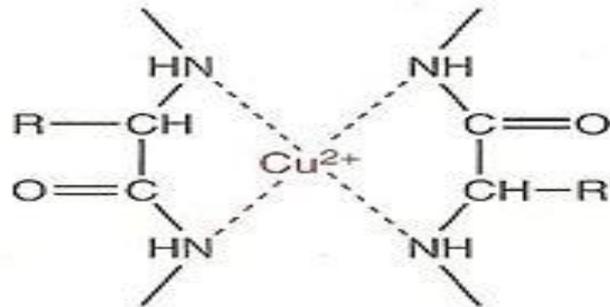


Figure 12 : Complexe entre le cuivre alcalin et les liaisons peptidiques

✓ Mode opératoire :

Le protocole à suivre pour réaliser un dosage par la méthode du biuret est le suivant : mélanger 3 mL du réactif de Gornall à 2 mL de différentes solutions protéiques de concentrations connues. Incuber ensuite à 37 °C pendant 10 min à l'obscurité. Laisser refroidir puis mesurer les absorbances des solutions à 540 nm. Ceci permet d'obtenir une gamme étalon et de tracer la courbe étalon afin de déterminer la concentration en protéines d'une solution inconnue traitée de la même manière.

2.2 Révélation des composants monoclonaux :

Elle se déroule en trois étapes :

2.2.1 Obtention de l'échantillon sérique :

a. Le prélèvement sanguin :

On procède d'abord par l'enregistrement de la demande de l'examen. Puis, L'échantillon sanguin du patient est prélevé par ponction veineuse au pli du coude en respectant un jeûne lipidique de 12 heures et recueilli sur un tube sec préalablement étiqueté avec des codes-barres contenant les renseignements du patient (figure 13).



Figure 13 : le prélèvement sanguin

b. La Centrifugation :

✓ Principe:

La centrifugation est une technique qui utilise le principe de la force centrifuge pour séparer les composants du sang.

Pendant la centrifugation certains éléments sanguins vont sédimenter et se déposer au fond du tube en formant ce qu'on appelle « le culot sanguin : les cellules sanguines plus un agrégat compact de fibrine ». Ils sont ensuite séparés du surnageant «sérum» par aspiration de ce dernier.

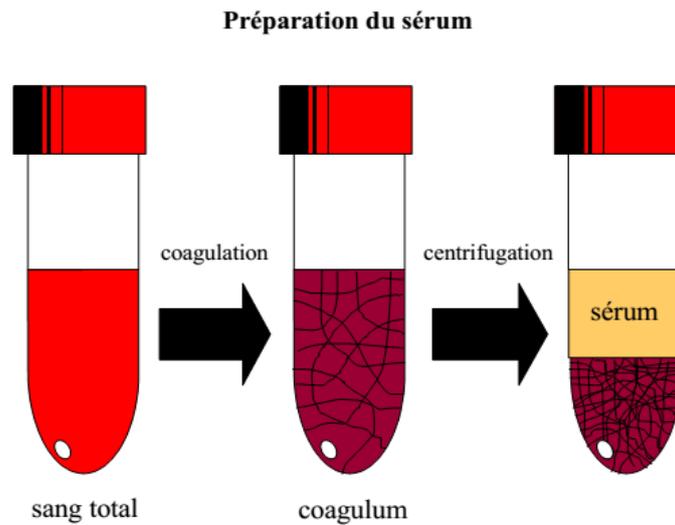


Figure 14 : le principe de la centrifugation

✓ **Manipulation :**

Le sang des patients recueilli sur tubes secs (fig.15.A), est centrifugé à 3000 rotations par minute (rpm) pendant 3 à 5 min (fig.15.B). Le sérum obtenu est conservé à une température de 4°C.

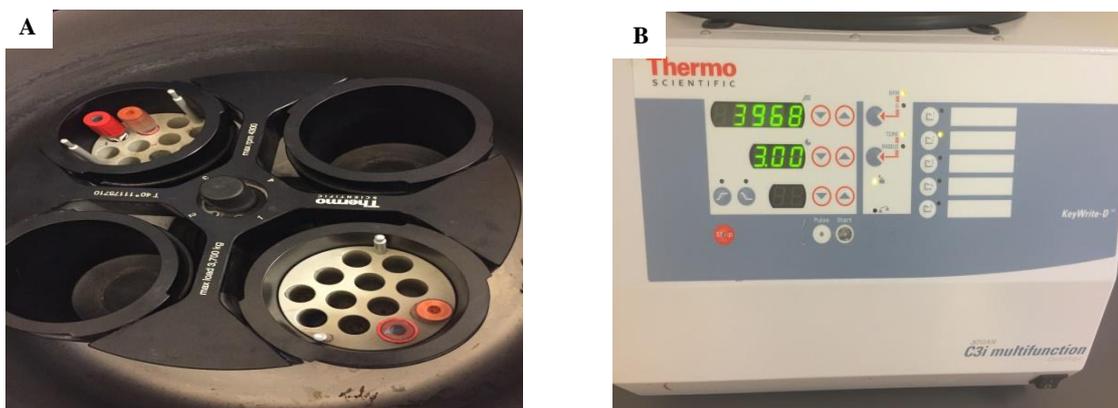


Figure 15 : la centrifugation

2.2.2 La technique immunochimique :

a. L'électrophorèse :

✓ **Le principe :**

L'électrophorèse des protéines sériques est une analyse de laboratoire basée sur la séparation de protéines du sérum dans un champ électrique en utilisant le caractère amphotère des protéines radicaux amines et carboxyliques.

Cette analyse est faite sur un milieu solide : gel d'agarose à l'aide de l'appareil SEBIAHYDRAGEL. Lorsqu'un échantillon contenant un mélange de protéines différentes est déposé sur le gel, les différentes protéines du mélange seront séparées en fonction de leur charge électrique dont La vitesse de migration est en fonction de la taille des particules, force ionique et porosité du support.

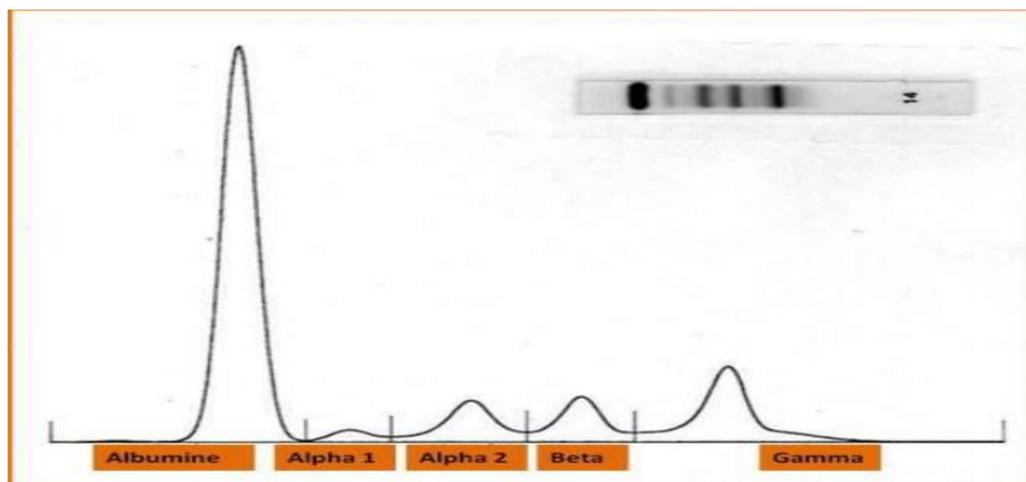


Figure 16 : protéinogramme de l'électrophorèse

En outre les immunoglobulines normales présentes dans le sérum diffèrent légèrement les uns des autres dans leur structure et leur charge électrique. Par conséquent, après l'électrophorèse, elles forment une large zone diffuse et symétrique sans aucune déformation visible. (fig.16)

✓ Manipulation :

➤ Application des échantillons « sérum » :

Le sérum est d'abord homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 15s (fig.17.A). Puis 10µl de sérum sont déposés dans chaque puits de l'applicateur (HYDRAGELPROTEIN(E) 15/30) (Fig.17.B). Ce dernier est placé dans une chambre humide (Fig.17.C) pendant 5 min à fin d'activer la diffusion.

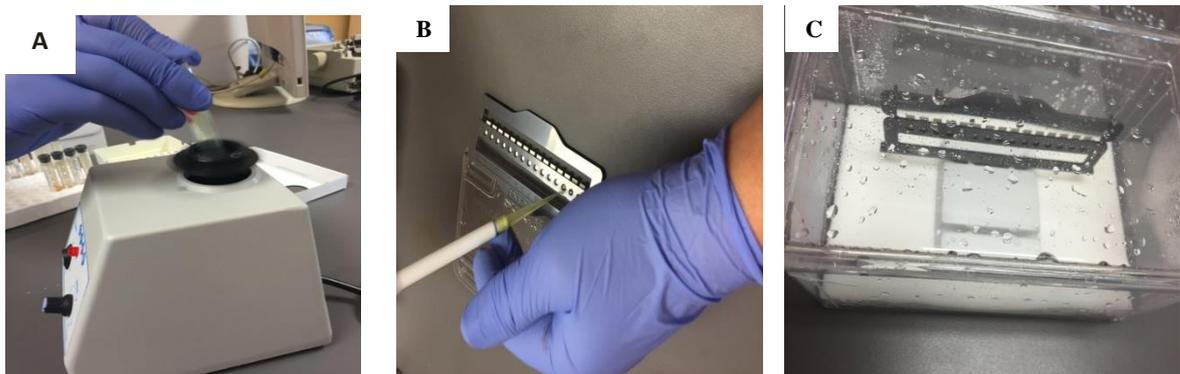


Figure 17: Application des échantillons « sérum »

➤ Préparation de l'automate pour la migration électro-phorétique :

La préparation de l'appareil (l'automate) se fait parallèlement au chargement de l'applicateur; l'ouverture du capot du module de migration en relevant les chariots porte-applicateurs et porte-électrodes (Fig.18.A). Puis, la fixation des mèches tamponnées sur le chariot porte-électrodes à l'aide des languettes perforées (Fig.18.B). Enfin la sélection du programme de migration "15/30PROTEIN(E)" (Fig.18.C).

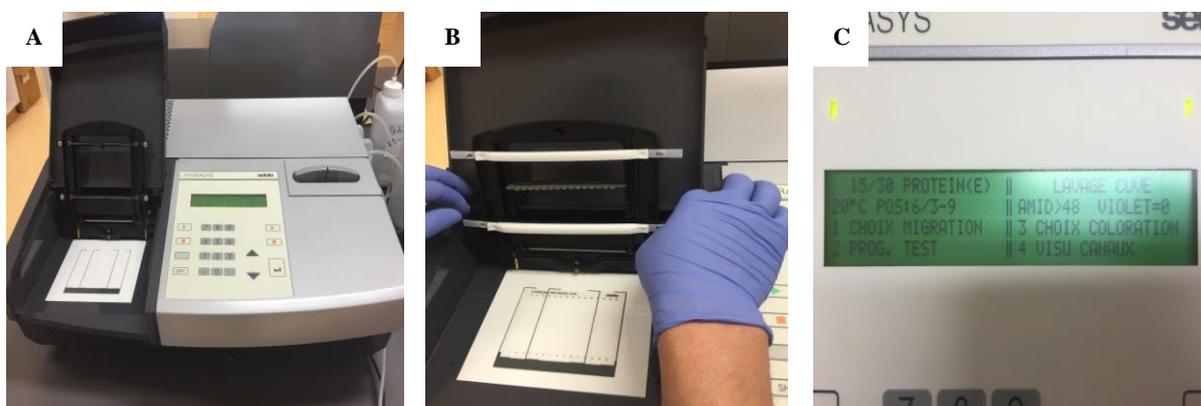


Figure 18 :Préparation de l'automate pour la migration électro-phorétique

➤ **Préparation du gel et le plateau de migration :**

À la sortie du gel de son emballage(Fig.19.A), l'excès de liquide en surface doit être éliminé rapidement avec un papier-filtre fin(Fig.19.B). Ensuite le gel est placé sur le plateau de migration(Fig.19.D) préalablement humidifié par 200µl d'eau distillée (Fig.19.C).

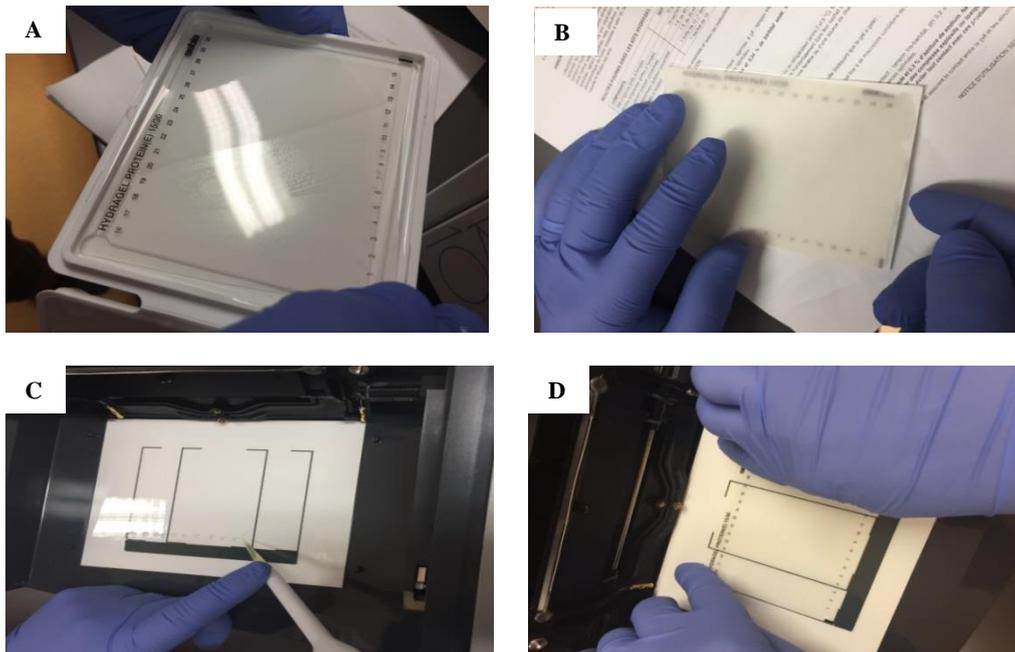


Figure 19 : Préparation du gel et le plateau de migration

➤ **La migration électrophorétique :**

Après le dépôt du gel sur le plateau de migration l'ensemble des chariots est abaissé jusqu'en butée de façon que les mèches ne touchent pas le gel. A cette étape-là, on fait sortir l'applicateur de la chambre humide Pour l'analyse de 15 échantillons

En fin, on ferme le capot du module de migration et on fait démarrer immédiatement la séquence de la migration.

➤ **Préparation des séquences de traitement du gel :**

Une fois le film de migration est récupéré(Fig.20.A), il est placé sur le porte-film (Fig.20.B) et introduit dans le module de traitement(Fig.20.C) .Puis, on lance les séquences de coloration du gel, décoloration, lavage et séchage (fig.20.D).

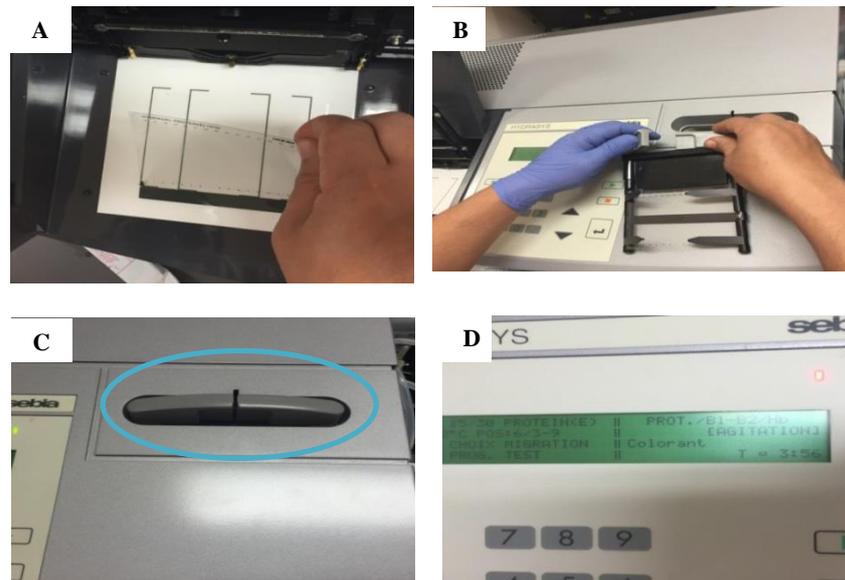


Figure 20 : Préparation des séquences de traitement du gel

- Avant de lancer un cycle de coloration " PROTEIN(E)/ β 1- β 2", s'assurer que:
 - le flacon de colorant contient 300ml de colorant.
 - le flacon de décolorant contient au minimum 1 litre de décolorant.
 - le flacon de vidange doit être vide.

Tableau 4: composition des colorants, décolorants et le tampon de lavage

Colorant	Décolorant	Tampon de lavage
AMIDOSCHWARZ	- 2.5 l de décolorant +2.5 ld'H ₂ O	- flacon de solution de lavage HYDRASYS concentrée (80ml) doit être complété à 5L avec l'eau distillée

Finalement, la lecture et l'interprétation des résultats à l'aide d'un scanner « Sebia ».

b. L'immunofixation :

✓ Le principe :

Les Ig monoclonales, marqueurs des gammopathies, sont préalablement détectées lors de l'électrophorèse des protéines. Elles se présentent sous forme de bandes anormales situées essentiellement dans la zone bêta ou gamma globulines.

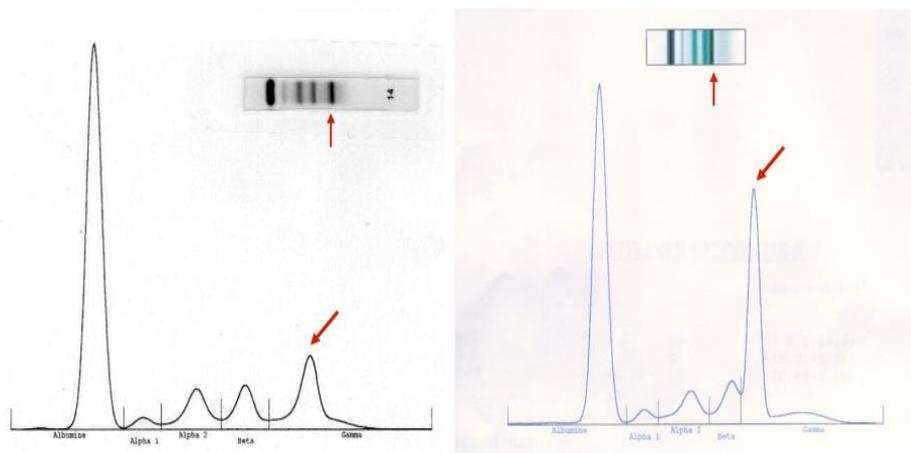


Figure 21: Tracé électrophorétique anormal (*sebia,2011*)

Afin de typer la protéine-M, une autre méthode d'électrophorèse sera utilisée et est appelée immunofixation (IF). Lors d'une IF, des réactifs spécifiques, appelés antisérums, sont utilisés. Chacun de ces antisérums réagit avec un type particulier de chaîne lourde ou de chaîne légère. Les protéines monoclonales réagissent habituellement avec un type d'antisérum anti-chaîne lourde et un type d'anti-chaîne légère. Certains plasmocytes peuvent produire uniquement des chaînes légères libres ; dans ce cas, la protéine monoclonale réagira uniquement avec l'un ou l'autre antisérum des deux types de chaînes légères.

Elle se réalise en quatre étapes :

- Séparation électrophorétique des protéines en gel d'agarose.
- Fixation et immunoprécipitation des protéines séparées par électrophorèse : application du fixateur et des antisérums sur le gel, au niveau des pistes de migration. Le fixateur et les antisérums diffusent dans le gel. Le fixateur précipite toutes les protéines et les anticorps précipitent les antigènes correspondants.

- Élimination des protéines non précipitées par pompage et lavage. Les protéines précipitées restent piégées dans le gel.
- Coloration des protéines et comparaison de la position des bandes immunoprécipitées avec celle des bandes anormales observées après électrophorèse des protéines.

✓ **Manipulation :**

➤ **Préparation de la migration :**

Après avoir mettre l'appareil sous tension, on pose deux applicateurs pour HYDRAGEL IF 2/4 à plat sur la paillasse (fig.22.A). Puis on dépose 10 μ l d'échantillon (sérum), dans chaque puits où le chargement de chaque applicateur ne doit pas excéder 2 min (fig.22.B). Ensuite on place les applicateurs dans la chambre humide (dents vers le haut) et les laisser diffuser 5 min après le dépôt du dernier échantillon.

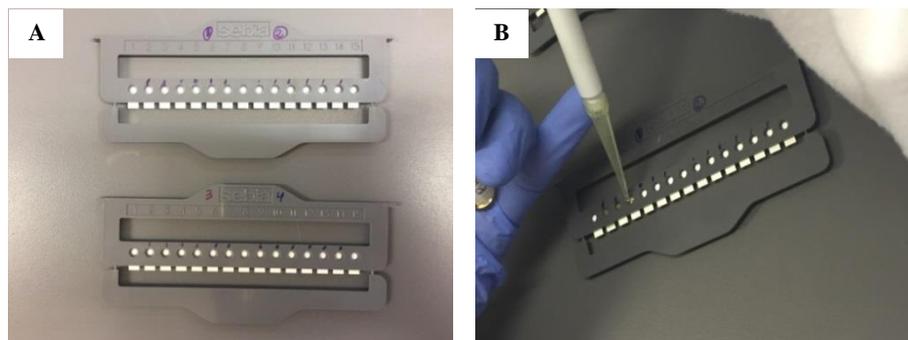


Figure 22 : Le dépôt du sérum

Après la préparation de l'automate, on sélectionne le programme de migration "2/4 IF MS/MD" (pour HYDRAGEL IF 2/4) (fig.23.A) et ensuite les mèches tamponnées sont fixées sur le chariot porte-électrodes à l'aide des languettes perforées.

Les étapes de la préparation du gel et son dépôt sur le plateau de migration « cadre sérigraphié » suivent le même protocole décrit auparavant dans l'électrophorèse (fig.23.B).

On abaisse l'ensemble des chariots jusqu'en butée et puis on fait Sortir les applicateurs de la chambre humide en éliminant la protection des dents. Enfin les applicateurs sont placés sur le porte-applicateurs et on fait démarrer immédiatement la séquence (fig.23.C).

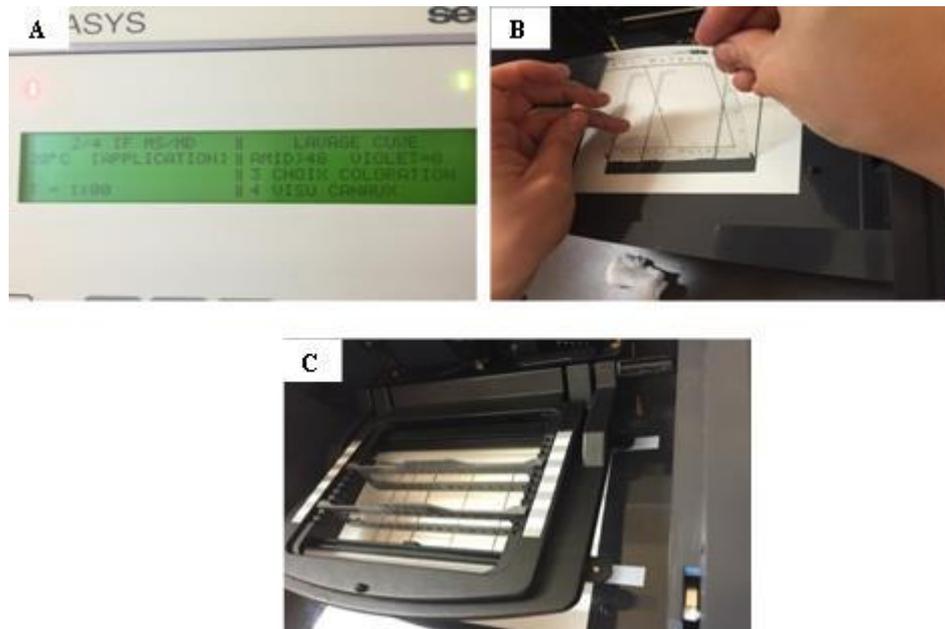


Figure 23: Préparation de la migration

➤ **L'étape de l'immunofixation :**

Lorsque Un signal sonore retentit et la sécurité du capot du module de migration se débloque, on ouvre le capot du module de migration et on retire les applicateurs et les mèches pour les jeter.

Après avoir retiré les chariots porte-applicateurs et porte-électrode, les électrodes sont nettoyés en laissant le gel en place dans le module de migration.

Afin de Mettre en place le masque de dépôt des réactifs, la tige destinée à l'accrochage du masque d'incubation a été fixée à l'aide des plots de fixation. Puis, les encoches du masque sont placées dans les repères de la tige et ensuite l'appliquer sur le gel (fig.24.A).

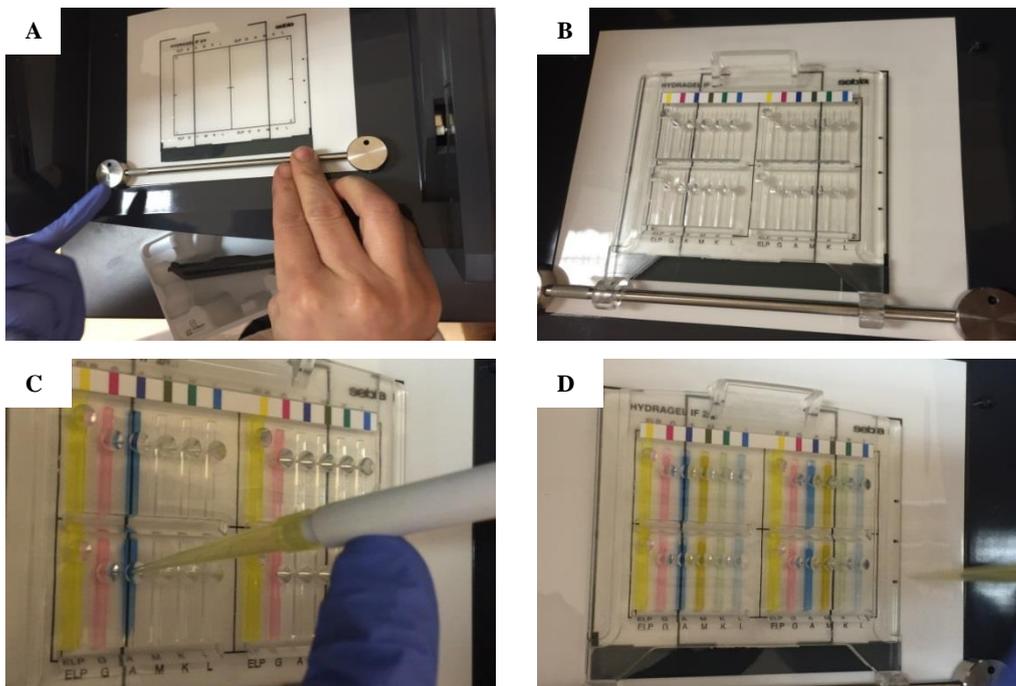
Après le réglage de la position du masque pour obtenir une parfaite correspondance entre les profils électrophorétiques du gel et les pistes de révélation du masque (fig.24.B), les réactifs sont déposés en procédant comme suit :

Tableau 5 : description des réactifs

Piste	Volume (μl)	Désignation	Couleur
ELP	40	solution de fixation	jaune
G	25	antisérum anti-chaînes lourdes gamma	rose
A	25	antisérum anti-chaînes lourdes alpha	bleu foncé
M	25	antisérum anti-chaînes lourdes mu	jaune vert
K	25	antisérum anti-chaînes légères kappa (libre et liées)	vert clair
L	25	antisérum anti-chaînes légères lambda (libre et liées)	bleu clair

Pour déposer les réactifs il faut tenir la pipette verticalement et appliquer légèrement l'embout au fond de l'orifice et puis injecter très progressivement les réactifs (fig.24.C,D).

Au démarrage de la séquence, à l'écran, s'affiche le message : "[INCUBATION]".

**Figure 24:** Préparation de la migration

➤ **Élimination des réactifs :**

A ce moment-là il faut ouvrir le capot du module de migration et ensuite éliminer les réactifs à l'aide des peignes de papier-filtre en le présentant à 30° (par rapport à l'horizontale) et les introduire dans les fentes pratiquées dans la partie inférieure des pistes d'incubation où les dents viennent en contact avec les réactifs et les absorbent par capillarité (le peigne de papier-filtre ne doit pas pénétrer dans le gel) (fig.25.A). Enfin, on fait démarrer la séquence (15 secondes).

➤ **pompage du gel :**

En arrivant à cette étape ; Les peignes de papier-filtre ont été Retirés et on Contrôle la bonne absorption des différents réactifs (absence de réactifs sur le gel et toutes les dents du peigne sont colorées sur toute leur hauteur) (fig.25.B). Puis on Retire le masque de dépôt des réactifs (fig.25.C) et une feuille de papier-filtre épais a été Appliquée sur le gel en appuyant bien sur toute la surface de la feuille de papier-filtre pour assurer un contact parfait entre le gel et le papier (fig.25.D). A la fin on redémarre la séquence. (40°C – 3 min)

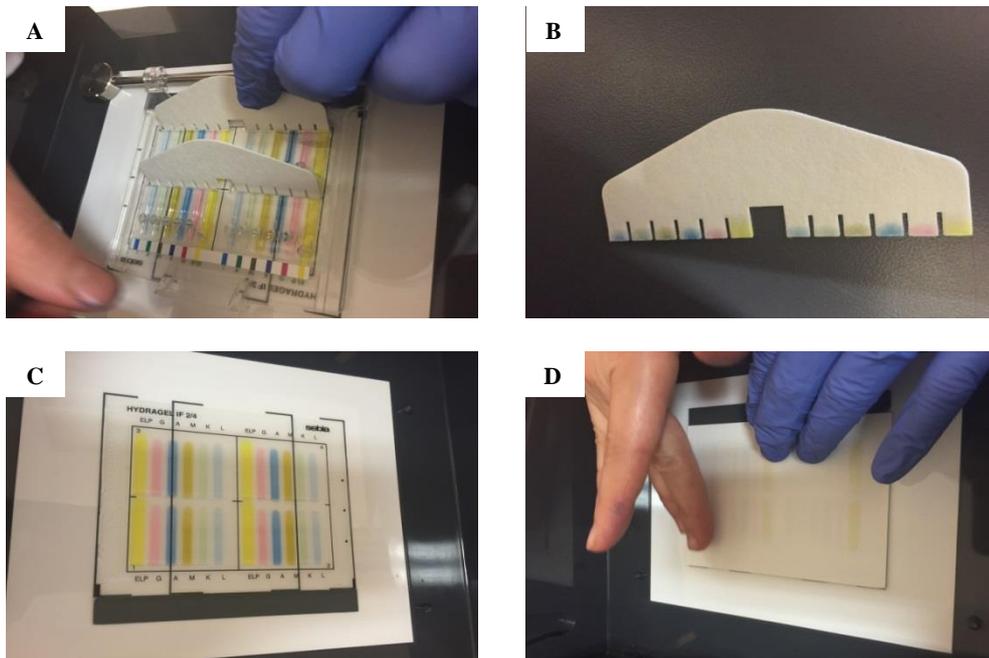


Figure 25: élimination des réactifs et pompage de gel

➤ **séchage du gel :**

Après l'ouverture de capot du module de migration le papier-filtre est retiré en laissant le film en place puis le capot du module de migration est refermé et la séquence est redémarrée. (fig.26.A) (50 °C --- 6 min)

➤ **lavage, coloration et décoloration du gel :**

À la fin de la séquence précédente, le film est placé sur le porte-film (fig.26.B) et ensuite dans le module de traitement / coloration du gel (fig.26.C). On démarre la séquence en Sélectionnant le programme de coloration "IF ACID VIOLET" ou "IF AMIDO" dans le menu (fig.26.D).(20 °C --- environ 5min)

Finalement, la lecture et l'interprétation des résultats.

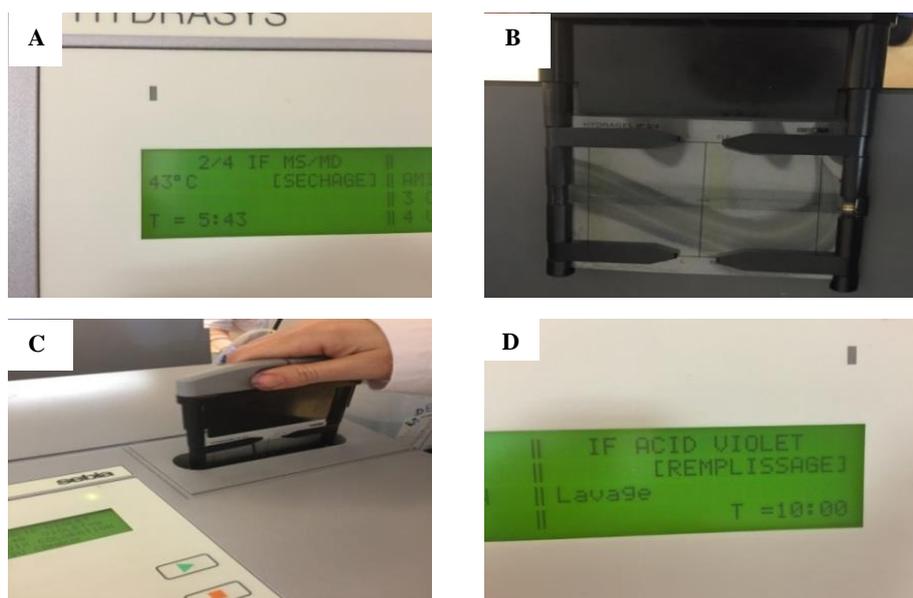


Figure 26: séchage, lavage, coloration et décoloration du gel

2.3 Le myélogramme :

2.3.1 Le principe :

Il s'agit d'un prélèvement des cellules de la moelle « hématopoïétique » par ponction et aspiration. Le principe est de piquer l'os (habituellement au niveau du sternum et plus rarement au niveau de la crête iliaque) pour aspirer le « suc médullaire », niché à l'intérieur

des logettes osseuses et de le déposer sur une lame pour pouvoir faire un frottis qui sera coloré (coloration MGG) pour être examiné au microscope optique.

2.3.2 La technique du prélèvement et de préparation du frottis :

Le prélèvement de la moelle osseuse en vue d'un examen cytologique est réalisé à l'aide d'un trocart auquel on adapte une seringue pour aspirer le suc médullaire. Le lieu privilégié de ce prélèvement est le manubrium sternal (partie supérieure du sternum).

Après avoir stériliser la partie de la ponction, le médecin pique perpendiculairement le sternum, traverse la première couche de l'os, puis aspire une quantité infime de moelle osseuse dans la seringue. L'aiguille est ensuite retirée. Puis le médecin enlève immédiatement l'aiguille et dépose la goutte du suc médullaire sur des lames pour passer à l'étape suivante.



Figure 27 :la zone du prélèvement

2.3.3 La coloration May-Grünwald Giemsa :

✓ Principe :

La coloration selon Pappenheim permet de réaliser la formule sanguine et médullaire. Le principe de cette coloration repose sur l'action combinée de deux colorants neutres: le May-Grünwald (MG : contenant un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène) et le Giemsa (G) dilué au 1/10 (contenant lui aussi de l'éosine, et un colorant basique, l'azur de méthylène «composition »).

Ces deux colorants sont des mélanges neutres aux propriétés bien distinctes. Ils ne sont pas actifs en milieu alcoolique et n'agissent de façon sélective qu'au moment de leur libération

en solution aqueuse tamponnée. Cette libération provoque la précipitation des colorants neutres.

- Le May-Grünwald colore les éléments acidophiles ainsi que les granulations neutrophiles des leucocytes.
- Le Giemsa colore le cytoplasme des monocytes, des lymphocytes et la chromatine des noyaux.

✓ Manipulation :

➤ Étalement :

Une goutte de suc médullaire est déposée à l'extrémité de la lame (Fig.28.A). Ensuite une 2^{ème} lame est mise sur la goutte à un angle de 45° permettant l'étalement. Le film sanguin ainsi obtenu est séché à l'air libre (fig.28.B).

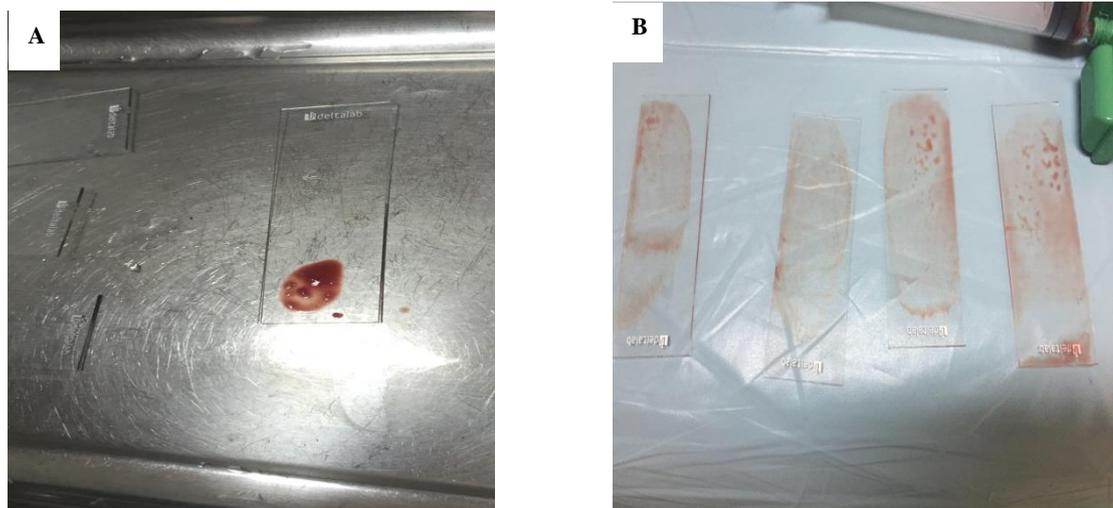


Figure 28: l'étalement

➤ La coloration :

15 à 20 gouttes de colorant May-Grünwald sont déposées sur le film de façon à recouvrir totalement les lames et laisser agir 20min pour que le méthanol fixe les cellules (Fig.29.A). Puis, on rince les lames à l'eau neutre et on laisse sécher à l'air libre (Fig.29.B).

Après la dilution du Giemsa (1 /10), on fait couvrir les lames avec ce dernier et on laisse agir pendant 40min (fig.29.C). Les lames sont enfin rincées et séchées à l'air libre (fig.29.D) pour être observées au microscope optique.

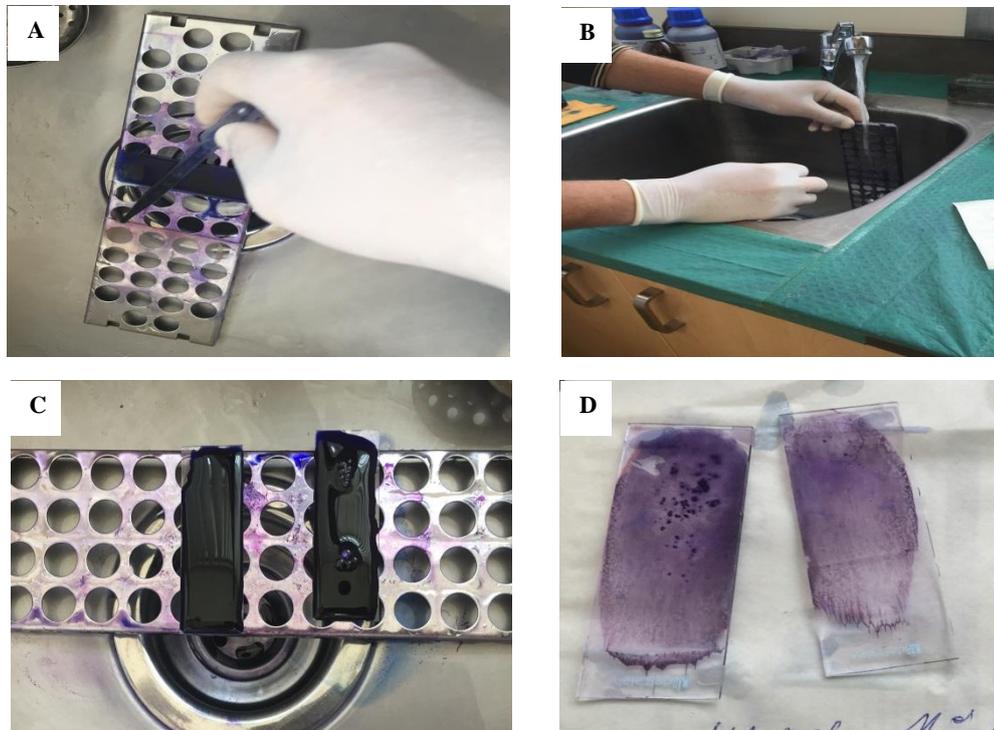


Figure 29 : La coloration MGG

Résultats et discussions

1- Etude épidémiologique:

Notre étude épidémiologique est réalisée sur 109 dossiers de patients qui représentent des gammopathies monoclonales entre les années 2016 et 2010. Ces patients sont âgés de 38 à 83ans. On a évalué nos résultats selon 4 paramètres: l'âge, sexe, type du CM et le Taux de protéines totales.

1.1 Evaluation selon l'âge :

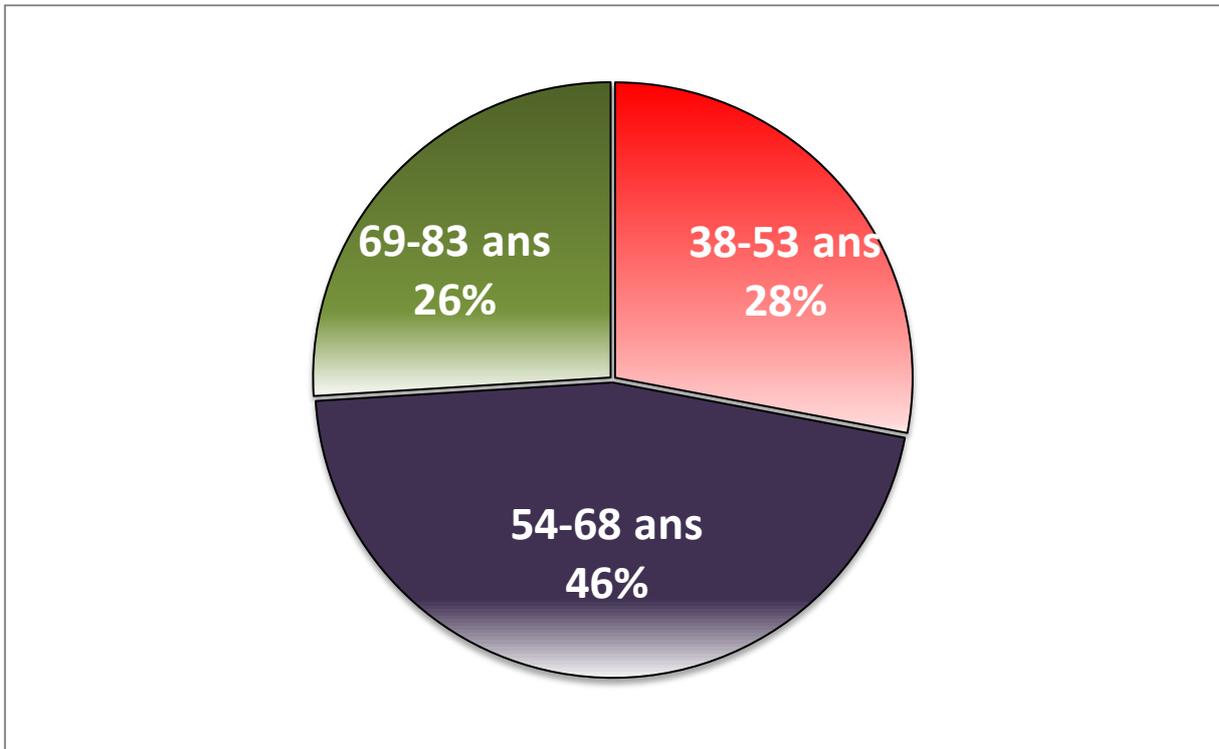


Figure 30 : Répartition des patients selon les classes d'âge

La répartition des patients selon la tranche d'âge de 15 ans est représentée dans le secteur (fig.30). Les extrêmes d'âge de notre série allant de 38 à 83ans. Nous avons constaté une dominance dans la classe d'âge 54-68 ans, sexe confondu, soit 46%.Ce qui montre que les GM sont des maladies du sujet âgé. Ceci est convergent avec l'étude rétrospective de *Mseddi-Hdiji et al.,2005* en Tunisie, réalisée sur une série de 288 patients présentant des GM dont l'âge moyen et la médiane d'âge des patients de leur série se situent aux alentours de 65 ans témoignant aussi que les GM sont des maladies du sujet âgé.(*Mseddi-Hdiji et al., 2005, Decaux et al.,2007*)

1.1. Evaluation selon les isotypes du CM :

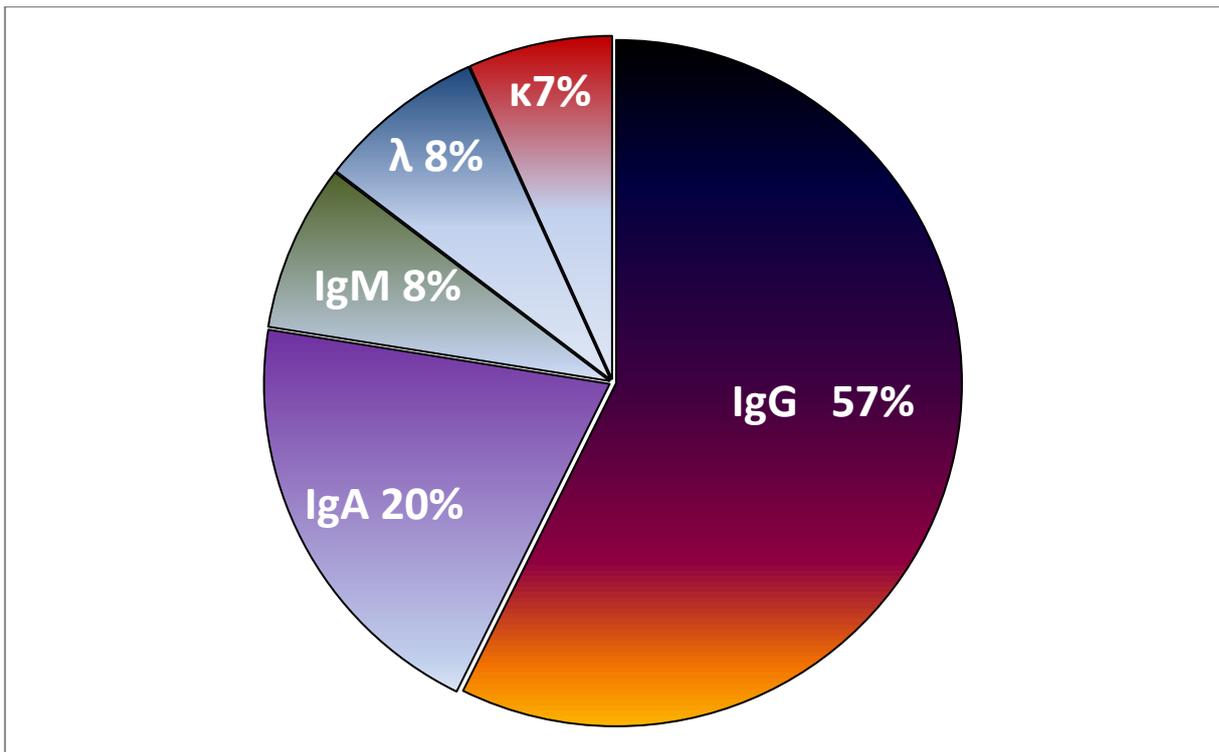


Figure 31 : Répartition des patients selon les isotypes du CM

Concernant la distribution isotypique des GM de notre série (fig.31), on remarque la prédominance de l'isotype IgG qui représente plus de la moitié des cas avec 57%, suivi par l'isotype IgA avec 20%, puis IgM avec 8% et les gammopathies à chaînes légères libres λ et κ qui représentent 15% des cas. Nos résultats sont en accord avec l'étude de *Mseddi-Hdiji et al., 2005*, la place prépondérante qu'occupent les IgG de leur série varie de 48 à 64 %. Les IgA occupent la 2^{ème} place avec plus de 21 % des cas. Alors que dans la plupart des séries internationales les IgM occupent la seconde place avec une proportion allant de plus de 20% à près de 33 %. 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. (*Mseddi-Hdiji et al., 2005, Decaux et al., 2007*).

1.2. Evaluation selon le sexe :

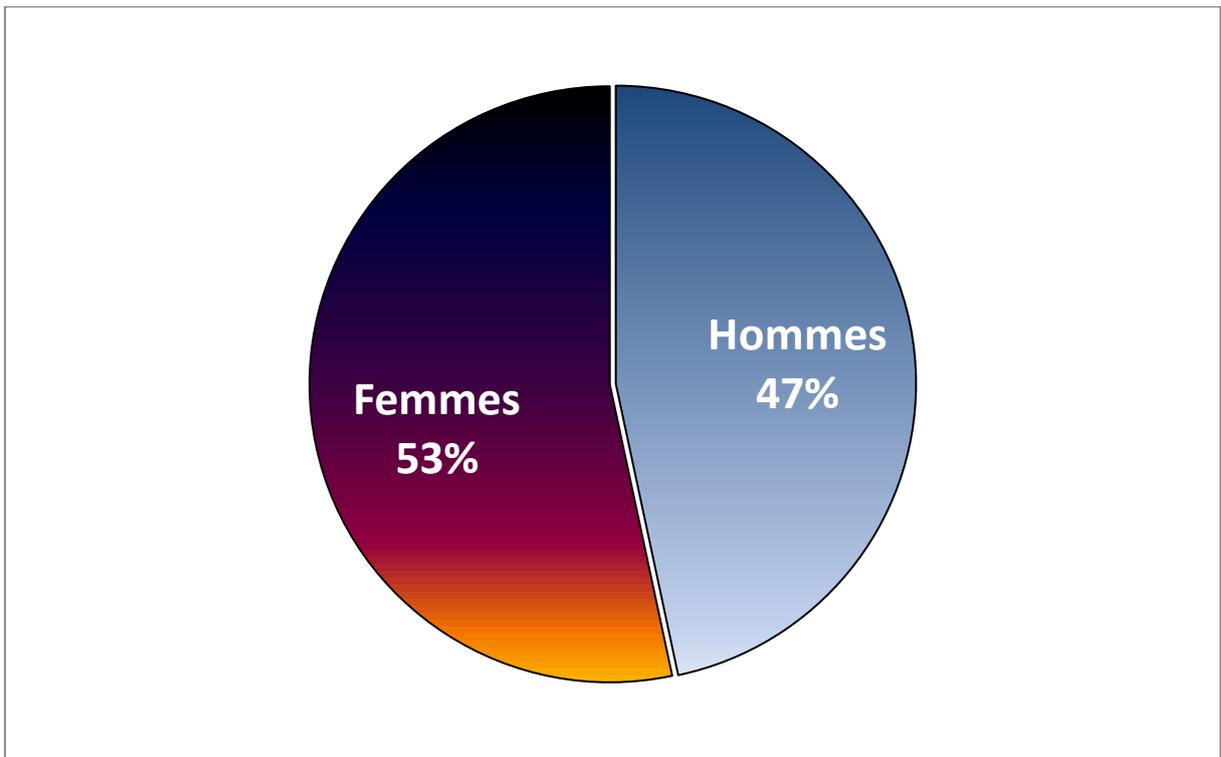


Figure 32 : La Répartition des patients selon le sexe

L'analyse de nos résultats montre une prédominance féminine avec un taux de 53%. Le sexe ratio homme/femme est de 1.14. Nos données concordent avec l'étude de *Decaux et al., 2007* qu'il s'agissait de 514 hommes et 537 femmes (sexe ratio est de 1.04). Contrairement au travail de *Mseddi-Hdiji et al., 2005*, dont la prédominance était masculine et le sexe ratio était :1.17.

1.3. Evaluation selon les protéines totales :

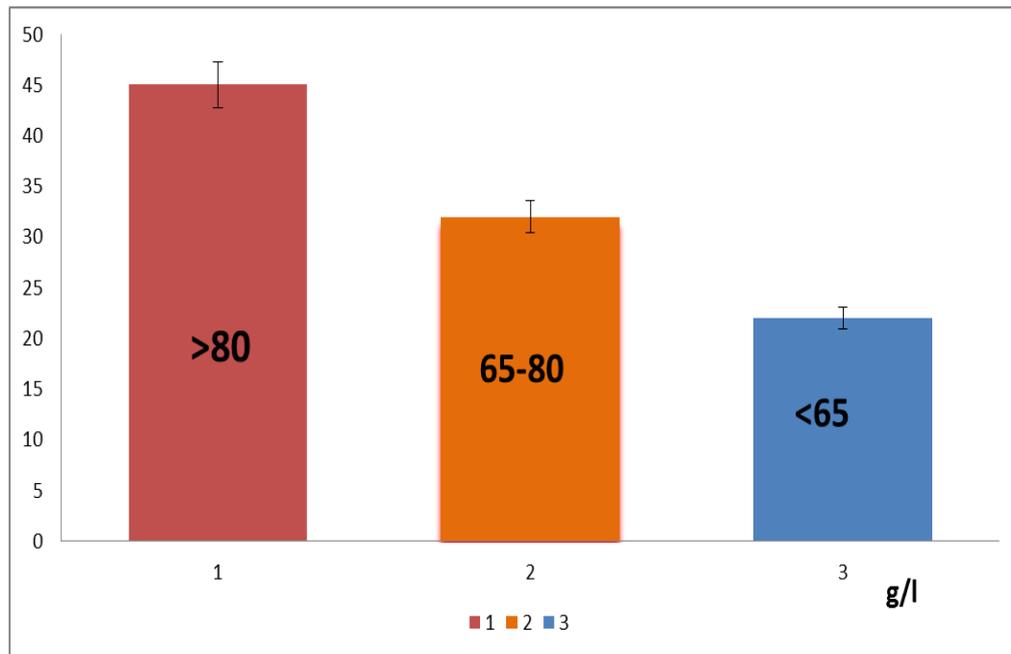


Figure 33 : Répartition des patients selon le taux de protéines totales

On note que le taux de protéines totales de la majorité des patients est supérieur de la normal (>80 g/l) ce que explique la présence d’une hypergammaglobulinémie dans le sérum des patients, dont 32 patients avaient un taux de protéines entre les normes (65-80 g/l) et 22 patients avaient un taux de protéines inférieur des normes. Ces résultats montrent que même si le taux de protéines sérique est entre les normes ou inférieur, on peut avoir un composant monoclonal dans le sérum car le patient peut avoir une hypogammaglobulinémie ou hypoalbuminémie d’un côté et une hypergammaglobulinémie d’un autre coté au même temps.

2. Résultats relatifs à l'électrophorèse sérique:

2.1. Le profil électrophorétique normal :

Comme pour d'autres tests, les valeurs calculées en électrophorèse sont comparées aux valeurs de référence du laboratoire (valeurs déterminées par l'analyse d'échantillons de donneurs sains). Ces normes diffèrent selon les techniques utilisées par les laboratoires (selon les appareils utilisés).

Les valeurs normales de l'électrophorèse sérique sont comme suit :

Tableau 6 : Valeurs d'un profil électrophorétique normal

Protéines	Pourcentage %	Concentration g/l
Albumine	55 – 65	36.0 – 50.0
Alpha 1	1.0 – 4.0	1.0 – 3.0
Alpha 2	8.0 – 14	4.0 – 8.0
Beta	8 – 14	5.0 – 12
Gamma	12 – 20	8.0 – 16

D'abord, après la dernière étape du traitement de gel (séchage), On a analysé les fractions électrophorétiques visuellement directement sur la membrane, où les protéines du sérum sont séparées en cinq groupes principaux par l'électrophorèse sur gel d'agarose (fig.34):

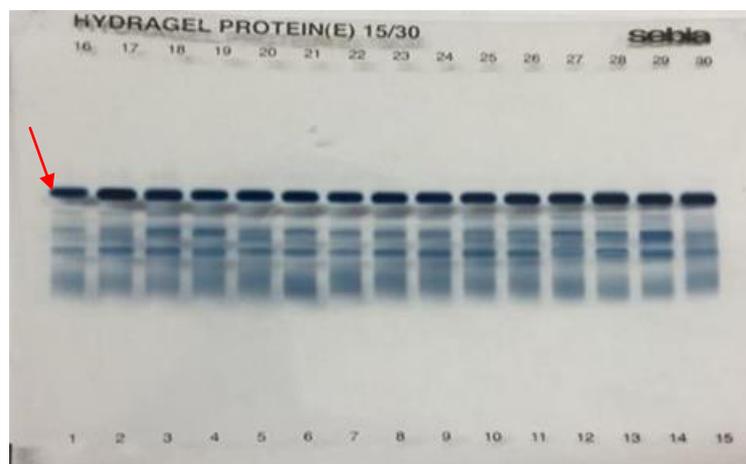


Figure 34: examen visuel (membrane du gel d'agarose) après migration (14 patients + 1 témoin (flèche))

Le profil normal se caractérise par des pics de protéines nettement séparés (pas d'augmentation ni de déformation d'un pic ni de pic additionnel en gamma bêta et alpha) (fig.35).

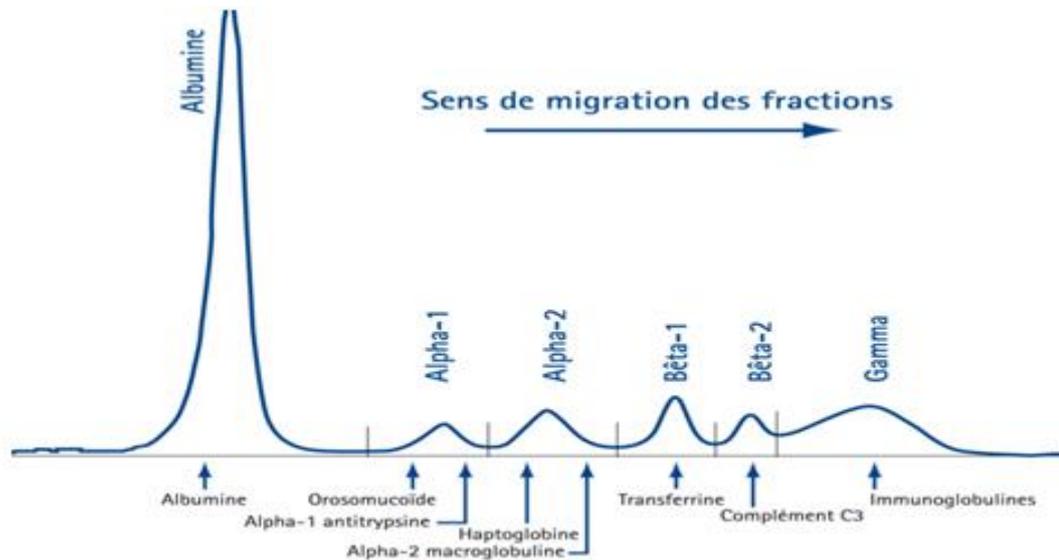


Figure 35 : protéinogramme humain normal (analyse densitométrique)

2.2 Le profil électrophorétique anormal (anomalies monoclonales):

Les anomalies monoclonales se traduisent par la présence d'un pic étroit d'intensité variable, en général en position gamma. On peut observer des pics en Bêta ou gamma et également alpha. La figure (36) montre un résultat d'une série de notre travail dont les patients numéro 3,21 et 23 présentent des composants monoclonaux en position gamma bien identifiés sous forme d'une bande étroite :



Figure 36 : membrane de gel d'agarose après migration (29 patients + 1 témoin(flèche))

La figure 37 représente le résultat final après le scanner de la membrane précédente d'un des patients qui développe une gammopathie monoclonale en position gamma dont le pic étroit est très clair avec une concentration du CM égale à 33.2g/l et un Tp = 99g/l :

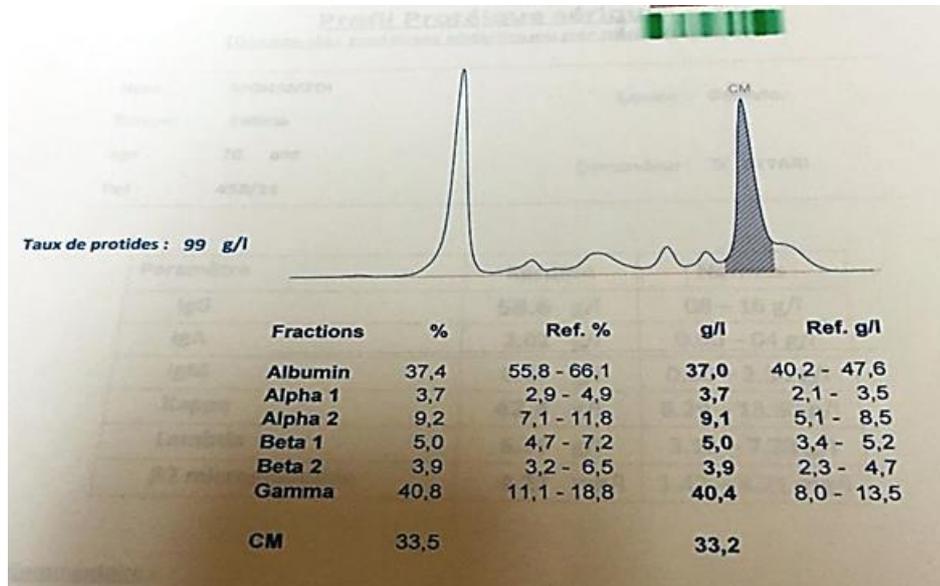


Figure 37 : protéinogramme sur agarose d'un profil pathologique (immunoglobuline monoclonale)

Ce pic est une conséquence d'une sécrétion excessive d'un seul type d'Ig ou une chaîne légère libre. Ces immunoglobulines migrent dans la zone des Gamma (mais pas toujours). Un pic détecté dans cette zone doit faire évoquer une gammopathie monoclonale, c'est à dire la prolifération incontrôlée d'un clone lymphoplasmocytaire.

Pour confirmer la présence d'une protéine monoclonale et afin d'en identifier les chaînes lourdes et/ou légères, une immunofixation du sérum est effectuée.

3. Résultats relatifs à l'immunofixation sérique :

Après l'obtention de la membrane séchée, en l'analysant visuellement on a noté deux situations : l'absence ou la présence des bandes étroites.

3.1. Absence de bande monoclonale (sujet sain):

Le sérum normal présente une zone colorée diffuse d'immunoglobulines polyclonales sur toutes les pistes (fig.38) avec aucune bande colorée étroite.

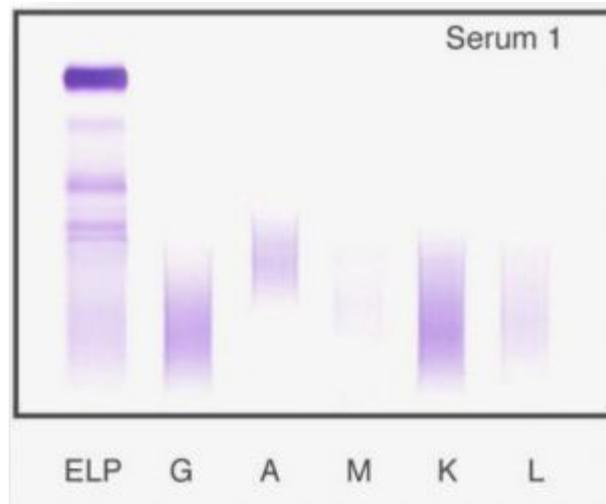


Figure 38 : membrane après électrophorèse d'un échantillon normal

3.2. Présence d'une bande monoclonale (sujet malade):

Une gammopathie (présence d'une immunoglobuline monoclonale) est caractérisée par une bande étroite détectée avec l'une des anti-chaînes lourdes (gamma, alpha ou mu) et avec l'une des anti-chaînes légères (kappa ou lambda). La fraction monoclonale mise en évidence, généralement étroite et bien visible, doit être située au même niveau de migration que la bande détectée sur la piste de référence (témoin).

L'immunofixation des protéines sériques sur gel d'agarose de ce patient (fig.39) confirme la présence d'un composant monoclonal d'isotype IgG à chaîne légère Lambda.

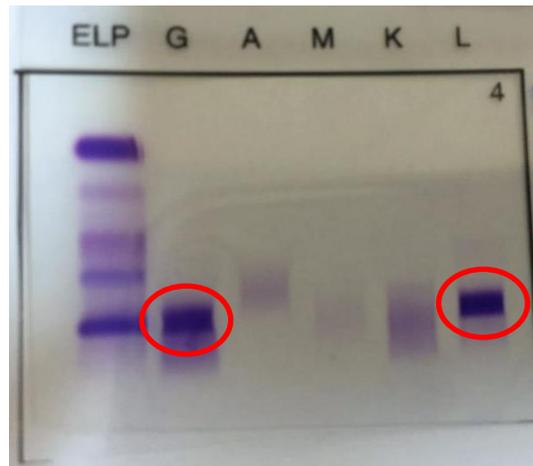


Figure 39 : résultat d'une immunofixation d'un sujet malade (IgG λ)

La figure 40 présente le résultat d'un patient qui développe une gammapathie monoclonal d'isotype IgM à chaîne légère lambda.

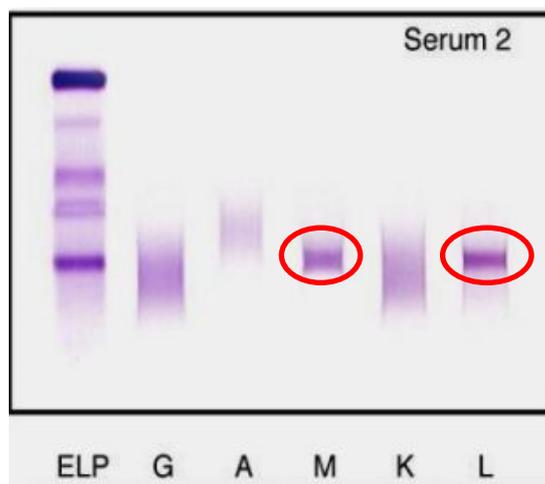


Figure 40 : résultat d'une immunofixation (IgM λ)

La présence d'un composant monoclonal d'isotype IgA à chaîne légère kappa chez un patient (fig.41).

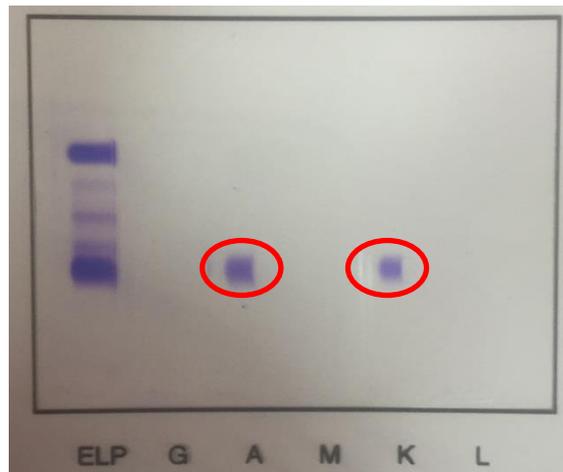


Figure 41 : résultat d'une immunofixation d'un sujet malade (IgA k)

- Dans le cas où on observe l'absence de réaction avec l'une des anti-chaînes lourdes appliquée, mais avec présence d'une chaîne légère ça peut être expliqué par :

- a) la présence d'une gammopathie à Ig D ou Ig E qu'il conviendra de confirmer avec les anti-chaînes lourdes delta ou epsilon
- b) la présence d'une chaîne légère libre qu'il conviendra de confirmer avec les antisérums spécifiques anti-chaînes légères libres kappa ou lambda.

La présence d'un composant monoclonal à chaîne légère libre de type Lambda (ou IgD λ ou bien IgE λ) (fig.42)

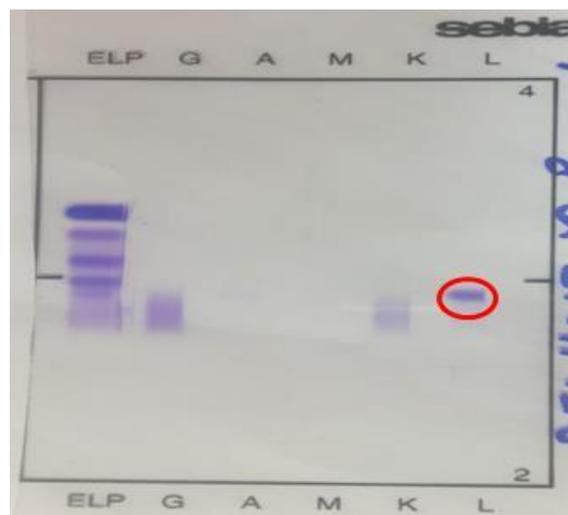


Figure 42 : Résultat d'une immunofixation d'un sujet malade (λ)

Un cas rare : L'absence de réaction avec les anti-chaînes légères mais avec présence d'une chaîne lourde, est rare. Il conviendra de confirmer la présence d'une maladie des chaînes lourdes gamma, alpha ou mu.

4. Résultats relatifs au myélogramme :

Après avoir réalisé la ponction médullaire sternale, les étalements médullaires et la coloration MGG, On a passé à l'observation microscopique à l'aide d'un microscope optique pour la lecture des frottis médullaires dont le but est de confirmer si le patient atteint un myélome multiple ou non. Cette démarche comporte plusieurs étapes successives :

- examen au faible grossissement : c'est une appréciation générale des frottis, pour avoir une idée d'ensemble de la moelle osseuse étalée, de la richesse en cellules et la recherche des cellules rares ;
- examen au fort grossissement : appréciation morphologique générale (aspect qualitatif) ;
- réalisation du décompte en % des éléments cellulaires.

4.1. Myélogramme d'un patient sain :

Les plasmocytes normaux(P) et réactionnels sont faciles à identifier sur les frottis de moelle osseuse humaine car ils présentent un petit noyau ex-central à chromatine mature et un cytoplasme abondant et très basophile après coloration de Giemsa. Leur cytoplasme est presque totalement rempli par de longs profils parallèles de réticulum endoplasmique rugueux et par un volumineux appareil de Golgi, montrant que leur fonction principale est la synthèse et l'excrétion protéique, dans le cas présent une immunoglobuline (Ig).

Dans une moelle osseuse d'un sujet normal, les plasmocytes ne représentent que 5% à 10% de l'ensemble des cellules médullaires.

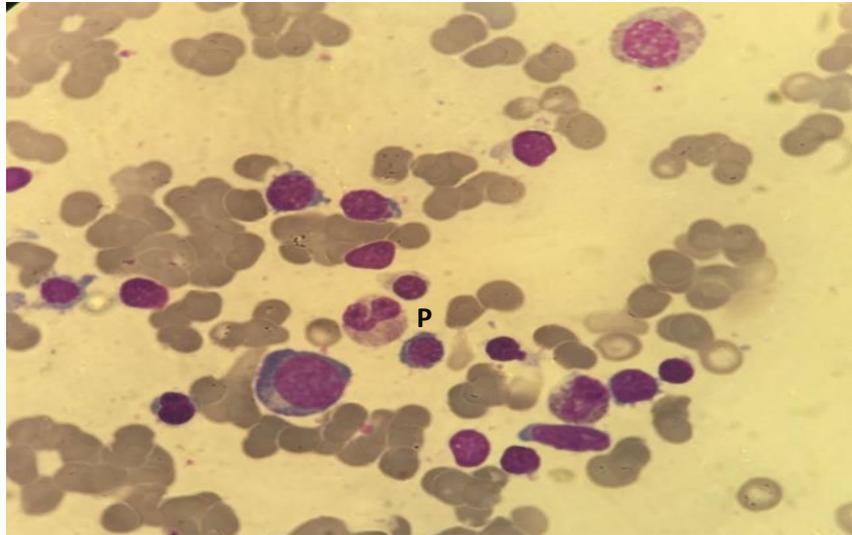


Figure 43: observation microscopique d'un frottis médullaire normal (Gx100)

4.2. Myélogramme d'un patient atteint de myélome multiple :

La dérégulation du génome de la cellule souche peut provoquer une prolifération incontrôlée des plasmocytes, aboutissant à leur expansion clonale et à l'une des néoplasies plasmocytaires. Au cours du MM le nombre des plasmocytes médullaires dépasse habituellement 10 % du total cellulaire. Leur morphologie est sensiblement normale dans 30—50 % des cas. Parfois le noyau a une morphologie normale mais le cytoplasme est de taille réduite (10—15 % des cas).

Dans les autres cas, il existe une ou plusieurs anomalies morphologiques portant sur le noyau: immaturité nucléaire (présence d'un nucléole, chromatine fine) ou un contour nucléaire irrégulier. Dans 10—15 % des cas quelques plasmocytes ressemblent à des blastes et sont appelés plasmoblastes. (*Ribourtout et al.,2015*)

Pour les résultats de suivi de myélome ; on a présenté une étude de cas développant un MM au niveau de l'EHU d'Oran. Un homme marié âgé de 51 ans, manipulateur de radio, d'origine de Mostaganem. L'électrophorèse des protéines sériques de ce patient a confirmé la présence d'un pic monoclonal à la zone Gamma de type IgG kappa, avec un taux de protides égal à 126 g/l. La photomicrographie (fig.44) montre l'examen microscopique médullaire de

ce cas. Son profil médullaire présente un envahissement plasmocytaire très clair (flèches). (Fig 44)

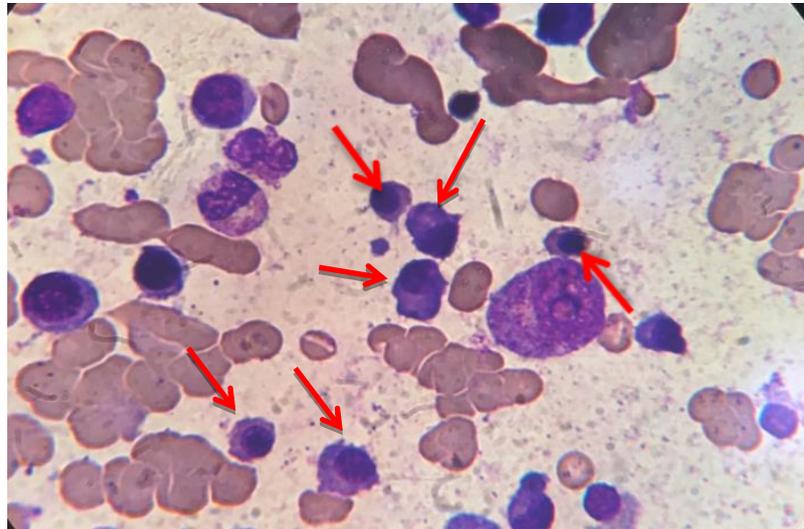


Figure 44 : observation microscopique d'un frottis médullaire au cours d'un myélome multiple(Gx100)

L'envahissement plasmocytaire peut être expliqué par la dérégulation du génome qui peut provoquer une prolifération incontrôlée des plasmocytes, aboutissant à leur expansion clonale et à l'une des néoplasies plasmocytaires. Au cours du MM le nombre des plasmocytes médullaires dépasse habituellement 10 % du total cellulaire.(*Ribourtou et al.,2015*)

Pour terminer le diagnostic du myélome, le médecin a demandé au patient de faire un examen radiologique conventionnel crânien. La figure 45 présente l'imagerie de cet examen en comparant avec une radiographie d'un sujet sain:

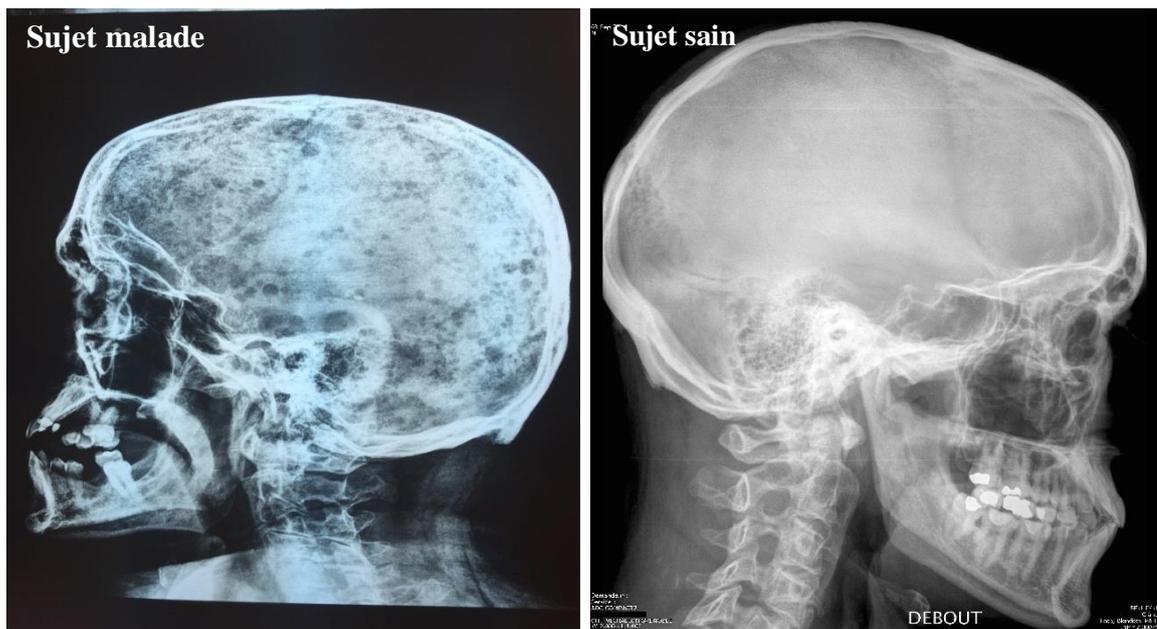


Figure 45 : comparaison entre un cliché crânien d'un sujet malade et sain

La radiographie crânienne du patient suivi montre la présence de plusieurs lésions ostéolytiques (géodes ou lacunes) à l'emporte-pièce de taille et de forme bien claire par contre le cliché du sujet sain montre un crâne normal et très nette.

Les lésions osseuses sont une des principales manifestations cliniques du MM. l'os est un tissu en renouvellement constant. A l'état normal, le remodelage osseux résulte d'un équilibre entre les ostéoclastes (OC), responsables de la résorption osseuse et les ostéoblastes (OB) qui reconstituent la matrice osseuse. Ces lésions osseuses dans le MM sont dues à un déséquilibre de la balance ostéoclastes/ostéoblastes qui provoque une lyse osseuse. Les cellules de MM entraînent une augmentation de la formation et de l'activité des ostéoclastes et une inhibition et une diminution du nombre des ostéoblastes. (Barillé.,2003)

Selon Barillé (2003) les lésions ostéolytiques associées au MM peuvent résulter du découplage pathologique des processus osseux de résorption et formation associant un recrutement ostéoclastique excessif et une inhibition ostéoblastique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les gammopathies monoclonales sont un problème fréquent en pratique clinique en Algérie et au niveau international. A l'Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine (HMRUC) et dans le laboratoire d'immunologie, des cas de gammopathie monoclonales sont découvertes avec le temps.

L'électrophorèse des protéines sériques nous a permis de révéler la présence des gammopathies monoclonales chez plusieurs patients, et puis d'identifier la nature du composant monoclonal selon l'isotype et la chaîne légère correspondante grâce à l'immunofixation.

Nos évaluations statistiques de 2010 à 2016 montrent que les GM sont des pathologies de sujets âgés (54-68 ans) avec une certaine prédominance féminine (53%) et isotypique IgG (57%). Nos évaluations statistiques du TP indiquent que même si le taux de protéines sérique est entre les normes ou inférieur, on peut avoir un composant monoclonal dans le sérum car le patient peut avoir une hypogammaglobulinémie ou hypoalbuminémie d'un côté et une hypergammaglobulinémie d'un autre côté à la fois.

Le taux moyen de l'Ig monoclonale est nettement plus élevé dans les GM malignes et en particulier le myélome. Le MM est une gammopathie monoclonale de diagnostic le plus souvent fondé sur la présence d'une infiltration plasmocytaire médullaire maligne qui est dévoilée par le myélogramme, d'un pic monoclonal et la présence des lésions ostéolytiques identifiables grâce aux techniques d'imagerie (radiographie).

Cette maladie n'est pas guérissable même si, aujourd'hui, des patients ont une survie très prolongée grâce à l'utilisation récente de nouveaux médicaments.

Avec le vieillissement de la population et la modernisation des techniques de révélation des composants monoclonaux et ses maladies associées, qui deviennent de plus en plus sensibles, le nombre de cas de gammopathies monoclonales devrait continuer à croître régulièrement dans les années à venir. On espère qu'au futur proche, les techniques de révélation de ce genre de pathologie vont être améliorées de plus en plus pour un dépistage plus rapide et plus précoce.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- **AaproMLink H.** Guidelines and Anemia Management with Erythropoiesis-Stimulating Agents. *The Oncologist*. 2008;13(3):33-36.
- **Andrès E.** Conduite a tenir devant une gammopathie monoclonale (gm).2013 ; 1-2.
- **Barillé-Nion S.** Mécanismes de l'ostéolyse du myélome mutiple : nouvelles perspectives thérapeutiques. *Hématologie*. 2003;9(3):220-229
- **Batteux F, Garraud O, Prin L et al.** Les Immunoglobulines : Structure et
- **Bouatay A, Hizem S, Ben Youssef Y et al.** Myélome multiple: aspect clinique, diagnostic biologique et pronostic. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 2013;28(1):30-35.
- **Chaïbi P, Merlin L, Thomas Cet al .** Les gammopathies monoclonales de signification indéterminée. *Ann Med Interne*. 2002;153(7):459-466.
- **Cofer .** Immunoglobuline monoclonale. 2010-2011 ; 7-8
- **Deconink E.** Diagnostiquer une Immunoglobuline monoclonale chez le sujet âgé .2010 ; 2-13
- **Denis R.** Chaînes légères libres d'immunoglobulines et gammopathies ; Utilité du dosage dans le sérum .2012 ; 585
- **Descamps G.** Impact du CD45 sur la voie de signalisation de l'IGF-1R dans les cellules de myélome multiple. Thèse de Doctorat de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes Sciences de la Vie et de la Terre Spécialité.2006 ; 5-38
- **Dimopoulos M, Spencer A, Attal M et al.** Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(21):2123-2132.
- **Émile F, Brousse N .** Physiologie de la réponse immunitaire humorale thymodépendante. *médecine/sciences*. 1992 ; 8 : 588-90 fonctions. 2007 ; 1-10
- **Fonseca R, Bergsagel P, Drach J et al.** International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009;23(12):2210-2221.
- **Glavey S , Leung N.** Monoclonal gammopathy: The good, the bad and the ugly. *Blood Reviews*. 2016; 30:223-231.

- **Gyan E, Alexis M, Benboubker L et al.** Référentiels de prise en charge des cancers : Onco-hématologie .2014 ; 43-51
- **International Myeloma Foundation** .Comprendre l'électrophèse avec le support de la société **Sebia** .2011 ;
- **International Myeloma Foundation**. Multiple myeloma. Cancer of the bone
- **Kuby J, Owen J, Punt J et al.** *Immunologie*. 7th ed. Paris: Dunod; 2014:65-90.
- **KuehlWBergsagel P**. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions.Nature Reviews Cancer. 2002; 175-187.
- **Ludwig H, Pohl G, Osterborg A**. Anemia in multiple myeloma. 2004 ; 2 : 233-41.
- **Manier S** . Myélome multiple : diagnostic clinique et perspective de traitement. Recommandations de l'International Myeloma Working Group (IMWG). Immunologie & Biologie Spécialisée. 2011;26(3):125-136.
 - o marrow. 2008/2009
- **Médecins de la Société Française d'Hématologie**. Association Française des Malades du Myélome Multiple (AF3M).2009 ; 1-2
- **Moreau P**. Le myélome multiple. france: John Libbey .2010 ;1-15.
- **Mseddi-Hdiji S, Haddouk S, Ben Ayed M et al**. Gammopathies monoclonales en Tunisie : analyse épidémiologique, immunochimique et étiologique d'une série de 288 cas. *Pathologie Biologie*. 2005;53(1):19-25
- **O. Decaux P, Rodon A, Ruelland L et al** .Epidemiology of monoclonal gammopathy in a general Hospital and a University Internal Medicine Department. *La Revue de médecine interne*. 2007;670-676.
- **Roitt I**. Immunologie Médicale. Paris: Maloine.2002 ; 33-46.
- **RoittIRabson A**. *Immunologie Médicale*. Paris: Maloine; 2002:33-46.
- **San Miguel J, Schlag R, Khuageva N et al**. Bortezomib plus Melphalan and Prednisone for Initial Treatment of Multiple Myeloma. *NewEngland Journal of Medicine*. 2008;359(9):906-917.
- **Santé Mag**. 2013;18:15.
- **Séve P**. diagnostiquer une immunoglobuline monoclonale. 2012 ; 10-12
- **Sprynski A** . Rôle du système IGF-1/insuline dans le Myélome Multiple. Thèse pour l'obtention du grade de docteur. Immunologie. Université Montpellier I.2009; 5-38

- **Touaoussa A** . aspect clinico biologique et évolutif du myélome multiple. Thèse pour l'obtention du diplôme de spécialité en médecine option : biologie médicale royaume du Maroc université Sidi mohammed Ben Abdellah faculté de médecine et de pharmacie de Fes .2015 ; 6-42
- **Wainsten J**. *Le Larousse Médical*. Paris: Larousse; 2012:629-630.

الملخص:

في العقود الأخيرة، أظهرت العديد من الدراسات أن وجود اعتلال غامائي وحيدة النسيلة يدل على وجود خلايا بلازمية منتجة للغلوبولينات المناعية سام المضادة وحيدة النسيلة. قد يكون هذا الخلل دليل على الإصابة بأمراض دموية خبيثة ، ولكن خاصية وحيدة النسيلة ليست دائما مرادفا للخبث (الاعتلال الغامائي الاحادي النسيلة الحميد).

لقد اشرنا أيضا إلى وجود اعتلال غامائي وحيد النسيلة عند سلسلة متكونة من 109 حالة بالمستشفى العسكري الجهوي لقسنطينة في فترة ما بين 2010-2016.

الهدف من هذا العمل هو دراسة الخصائص الوبائية (الجنس، السن، نوع الغلوبولينات المناعية، نسبة البروتين الكلي)، والاستطلاع على التقنيات المناعية الكميائية (الهجرة الكهربائية، التثبيت المناعي) الخاصة بهذا المرض. مع توضيح حلقة الربط بين الاعتلال الغامائي وحيد النسيلة و المايلوما.

الكلمات المفتاحية: اعتلال غامائي وحيدة النسيلة، المايلوما، الهجرة الكهربائية، التثبيت المناعي

Abstract :

In recent decades, several studies have shown that the presence of MG is evidenced by the proliferation of a plasma cell clone producing a monoclonal Ig.

This pathology may be indicative of hematological malignancies, but the monoclonal character is not always synonymous with malignancy (MGUS).

We also highlighted the presence of MG in a series of 109 cases collected in HMRU Constantine during the period from 2010 to 2016. The objective of this work is to study the epidemiological characteristics (sex, age, isotype, Tp), explore immunochemical techniques (EPS and IFX) of this anomaly and to describe the relationship between MG and one of its associated diseases "myeloma".

Keywords : monoclonal gammopathy, myeloma, electrophoresis, immunofixation

***Intitulé : Gammopathie monoclonale et myélome multiple :
Approche épidémiologique et technique***

***Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en
immuno-onco***

Durant les dernières décennies, plusieurs études ont montré que la présence d'une GM témoigne la prolifération d'un clone de plasmocytes producteurs d'une Ig monoclonale. Cette pathologie peut être révélatrice des hémopathies malignes, mais le caractère monoclonal n'est pas toujours un synonyme de malignité (MGUS).

Nous avons également mis en évidence la présence d'une GM à une série de 109 cas colligés au HMRU de Constantine Au cours de la période allant de 2010 à 2016. L'objectif de ce travail est d'étudier les caractéristiques épidémiologiques (sexe, âge, isotype, Tp), d'explorer les techniques immunochimiques (EPS et IFX) de cette anomalie et de décrire le lien entre la GM et l'un de ses maladies associées «le myélome ».

**Mots clés : Gammopathie monoclonale, Myélome multiple,
Electrophorèse, Immunofixation.**

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'immunologie de l'Hôpital Militaire
Régional Universitaire de Constantine (HMRUC)

Jury d'évaluation :

Président du jury : M^{elle} ELOUAR . I (Maître de Conférence A- UFM
Constantine).

Rapporteur : Mme AGGOUN .C (Maître de Conférences B- UFM Constantine).

Examinatrice : M^{elle} BENLATRECHE. M (Maître assistante A- UFM
Constantine).

Date de soutenance : 09-06-2016