

IMMUNOFIXATION

DEFINITION

L'immunofixation (IF) est une technique sensible d'identification d'une immunoglobuline monoclonale (Ig mc). Elle s'intègre dans une stratégie globale de recherche d'Ig mc, comportant une électrophorèse des protéines sériques, un dosage des immunoglobulines sériques et, éventuellement, une recherche de cryoglobuline.

L'immunofixation est une technique d'immunoprecipitation en gel. Sur les gels sont prédefinies des pistes de migration électrophorétiques sur lesquelles sont déposés les échantillons plus ou moins dilués. Après séparation électrophorétique des constituants du sérum, les différentes pistes sont incubées en présence d'antisérum spécifiques (selon la NABM, le diagnostic d'une Ig mc par immunofixation nécessite l'emploi d'au minimum 5 antisérum monospécifiques). L'Ig, lorsqu'elle est présente, est immunoprecipitée dans le gel. Après lavage, l'application d'un colorant des protéines permet de visualiser la réaction. Les résultats doivent être accompagnés d'un commentaire du biologiste.

Une alternative à l'immunofixation est l'immunotypage, réalisé en technique capillaire.

BIOPATHOLOGIE ET INDICATIONS DU DOSAGE

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines présentes dans le sérum, les liquides extra-vasculaires, les sécrétions et douées d'une activité anticorporelle. Elles sont caractérisées par leur grande hétérogénéité en dépit d'une structure fondamentale commune.

Les Ig mc constituent une population homogène d'immunoglobulines synthétisées par un seul clone plasmocytaire. Elles sont caractérisées par une seule classe de chaîne lourde, un seul isotype de chaîne légère et portent le même allotype et le même idiotype. Leur structure est le plus souvent normale, mais elles sont produites en très grande quantité. Leur activité anticorporelle est rarement démontrée.

La découverte d'une Ig monoclonale peut être fortuite, devant la présence d'une fraction supplémentaire à l'électrophorèse des protéines, ou bien faire partie de l'exploration diagnostique d'une prolifération lymphoïde ou lymphoplasmacytaire. L'immunofixation permet parfois de révéler une Ig monoclonale passée inaperçue à l'électrophorèse, en particulier lorsqu'elle est présente en petite quantité (moins d'1 g/l). Elle permet dans tous les cas de la caractériser.

Une IF est donc indiquée dans la recherche d'un désordre lymphoplasmacytaire, dans un contexte

clinique évocateur. Les recommandations de l'IMWG (*International Working Myeloma Group 2008*) sont de combiner une électrophorèse des protéines (EP) et une IF sériques avec le dosage des chaînes légères libres. Cette association a une sensibilité de 97,4 % pour détecter un composant monoclonal, toutes pathologies confondues : amylose AL, myélome multiple, maladie de Waldenström, gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), POEMS, plasmocytome, maladie de dépôt des chaînes légères. Les explorations urinaires (EP et IF urinaires) ne sont pas nécessaires (en première intention).

RECOMMANDATIONS PREANALYTIQUES

■ PRELEVEMENT – CONSERVATION, TRANSPORT

Se reporter au référentiel des examens de biologie médicale Biomnis en ligne pour les conditions de prélèvement et conservation-transport.

■ RENSEIGNEMENTS INDISPENSABLES

Contexte clinique et biologique : il est impératif de disposer de renseignements cliniques, en particulier dans un contexte diagnostique (suspicion de prolifération lymphoplasmacytaire : douleurs osseuses... ; neuropathie périphérique...) et des résultats des autres examens biologiques (NFS, VS, protéinurie...) et radiologiques.

INTERPRETATION

- biomnis - biomnis
- La présence d'une zone diffuse plus ou moins large reflète la présence d'Ig polyclonales.
 - L'observation d'une bande étroite au même niveau de migration avec un sérum anti-chaîne lourde (anti-gamma, alpha ou mu) et un sérum anti-chaîne légère (anti-kappa ou anti-lambda) caractérise la présence d'une Ig monoclonale. Cette bande étroite est également retrouvée sur la première piste témoin d'électrophorèse.
 - Une bande étroite observée isolément avec un sérum anti-chaîne légère sans bande étroite au niveau d'un anti-sérum anti-chaîne lourde classique, nécessite de poursuivre les investigations. Il convient de réaliser une deuxième immunofixation en testant des anti-sérum anti-delta et anti-epsilon, avant de conclure à la présence d'une Ig D monoclonale, d'une Ig E monoclonale ou, en l'absence de précipité avec ces anti-sérum, d'une protéine de Bence-Jones (elle migre à un niveau différent de l'Ig mc avec laquelle elle est parfois associée car son poids moléculaire est différent).
 - Une bande étroite révélée avec un anti-sérum anti-chaînes lourdes, sans bande étroite avec un anti-sérum anti-chaînes légères, doit faire évoquer une maladie des chaînes lourdes (en fonction du contexte clinique).
 - Le dépistage et l'identification d'une Ig monoclonale

entière et/ou d'une protéine de Bence-Jones (PBJ) dans le sang et/ou les urines par immunofixation nécessitent de poursuivre les investigations à la recherche d'une éventuelle hémopathie maligne.

- S'il s'agit d'une IgG ou d'une IgA monoclonale de concentration élevée, il convient de rechercher en premier lieu un myélome dont il existe quatre variétés immunochimiques (*cf. tableau*).

	Sérum	Uries
1-Ig mc entière*	Ig +++	+/-
2-Ig mc + PBJ	PBJ +/-	+++
3-PBJ isolée $\mu\mu$	PBJ +/-	+++
4-Myélome non excrétant	Ig/PBJ = 0	0

* IgG dans 50 % des cas, IgA dans 25 % des cas, jamais IgM

** 24 % des cas

- Dans un contexte d'hémopathie, la découverte d'une IgM orientera vers une macroglobulinémie de Waldenström (une IgM monoclonale est retrouvée dans 100 % des cas de cette maladie).

- Une Ig mc est présente dans environ 15 % des cas de leucémie lymphoïde chronique, à faible concentration (< 5 g/l). Il s'agit le plus souvent d'une IgG ou d'une IgM, rarement d'une IgA.

- Les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS) représentent plus de 60 % des gammopathies monoclonales et sont retrouvées chez 7,6 % des sujets âgés de plus de 75 ans et dans 10 % des cas après 80 ans. Elles sont définies par un pic d'Ig mc < 30 g/l, une plasmocytose médullaire < 10 %, l'absence d'hypercalcémie, d'anémie et d'atteinte organique (atteinte osseuse, insuffisance rénale ou organomégalie).

Il est recommandé de surveiller tous les 6 mois les examens cliniques et biologiques de ces patients et d'y associer une fois par an un examen radiologique.

- D'autres pathologies lymphoïdes (hors maladie de Waldenström) peuvent être associées aux gammopathies monoclonales : lymphomes, amylose, POEMS ; elles sont en réalité rarement révélées par la découverte « fortuite » d'une Ig mc, mais plutôt par des troubles neurologiques ou d'autres symptômes (purpura périorbitaire par exemple, évocateur d'amylose) ; enfin, des pathologies non lymphoïdes peuvent s'accompagner d'Ig mc transitoire : syndrome de Gougerot Sjögren, maladie de Gaucher, quelques infections virales (VIH, VHC...).

DIFFICULTES D'INTERPRETATION ET CAUSES D'ERREUR

- Celles de toutes les réactions antigène-anticorps

Un excès d'antigènes (phénomène de zone) se traduit par une bande à centre clair reflétant la redissolution de l'Ig mc. Inversement, il peut y avoir un excès d'anticorps, lorsque la dilution du sérum est excessive. Enfin, la

sensibilité des antisérum est variable (certains réactifs ne retrouveront pas une Ig mc en faible quantité, qui pourra toutefois être mise en évidence par d'autres antisérum). Il convient de bien observer les conditions de l'analyse, en particulier d'adapter les dilutions en fonction des résultats de l'électrophorèse.

- Nature du sérum

L'observation d'une coloration au niveau de la zone de dépôt sur toutes les pistes, quelle que soit la spécificité de l'anti-sérum utilisé, signe la présence de protéines qui n'ont pas migré et sont restées emprisonnées dans le gel. Il peut s'agir d'Ig polymérisées (IgM ou IgA), et/ou de cryoglobuline.

L'utilisation d'un agent réducteur comme le mercaptoéthanol permet de dépolymériser les Ig. S'il s'agit d'une cryoglobuline à taux significatif, il convient de refaire l'immunofixation en réchauffant le sérum et en le plaçant, ainsi que le tampon et le gel à une température adaptée, selon la température de précipitation de la cryoglobuline.

- Importance du contexte clinique et biologique

Il est indispensable de pouvoir disposer des données de l'électrophorèse et de renseignements cliniques : par exemple, une neuropathie périphérique s'accompagne souvent d'une IgM mc en faible quantité (1 à 4 g/l) qui pourrait passer inaperçue dans le cadre d'une hypergammaglobulinémie associée. Si le biologiste est averti, l'immunofixation peut être envisagée en ajustant les dilutions du sérum.

Par ailleurs, il faut se méfier des hypogammaglobulinémies qui peuvent « masquer » un envahissement médullaire (l'Ig mc peut passer inaperçue à l'électrophorèse des protéines). En cas de forte suspicion clinique, toutes les techniques devront être mises en œuvre à la recherche d'une Ig mc.

POUR EN SAVOIR PLUS

- Pham BN, Intrator L., *Immunoglobulines monoclonales: recherche et identification*. Le Cahier de formation, Biologie médicale n° 28, Bioforma, Paris, 2003:44-65.
- Beauvillain C, Jeannin P, Renier G, Chevallier A. *Immunoglobulines monoclonales : méthodes diagnostiques en 2011*, Revue francophone des laboratoires 2011 ;433 :55-62.
- Oudart JB, Maquart FX, Ramont L. *Synthèse sur la prise en charge des gammopathies monoclonales en biochimie : des recommandations à la pratique quotidienne*, Ann Biol Clin 2012 ; 70 :251-261.