

Le rôle du laboratoire dans le traitement par les immunoglobulines

(2^e partie)

Résumé

Ce sont, en majeure partie, les progrès accomplis dans l'analyse et le dosage quantitatif des protéines qui ont rendu possible le développement d'une application clinique des immunoglobulines à un éventail de maladies qui ne cesse de croître. En écartant les maladies autoimmunes, ce texte reverra les immunodéficiences primaires où le dosage des IgG et nombre d'analyses microbiologiques sont de rigueur. L'immunodéficiences humorales aux taux d'IgG normaux fait appel à l'analyse du système du complément. La cytofluorométrie et l'analyse génétique cernent mieux les différents syndromes et permettront au clinicien de constater que l'un ou l'autre des patients sera éligible pour un traitement génétique voire aux cellules souches.

Summary

Routine analysis of proteins and its progress in immunochemistry have allowed treatment of an ever increasing number of autoimmune and inflammatory diseases by intramuscular, subcutaneous and/or intravenous immunoglobulins. The present contribution focuses on substitutive immunoglobulin treatment given to patients who suffer from primary immunodeficiency diseases (PID) and their follow-up controls in the laboratory. The immunochemical and microbiological fields of laboratory diagnosis are at stake to monitor substitutive treatment of many children and fewer adults. Should immunodeficiency states turn out to express IgG levels in the normal range, then the laboratory exploration of the complement system becomes important. The more severe forms of PID, such as chronic granulomatous disease and Wiskott-Aldrich syndrome call for extensive cytofluorometric and genetic analysis. Advanced laboratory investigations may direct clinicians to such treatment options as gene therapy or stem cell transplantation.

Urs E. Nydegger

Introduction

La concentration des immunoglobulines (Ig) dans le plasma humain, dans les liquides biologiques tel le liquide céphalo-rachidien ou encore dans les urines, est mesurée aujourd'hui par néphélométrie utilisant des anticorps anti-Ig monoclonaux. Autrefois et aujourd'hui encore dans les pays en voie de développement, l'immunodiffusion d'abord en système double-diffusion Ouchterlony puis en immunodiffusion radiale indiquent une concentration de manière semiquantitative ou, au mieux, permettent une estimation près du taux réel de la concentration des IgM, IgG ou IgA.

Le progrès de la technologie du laboratoire dans le dosage des protéines a permis de réduire le coût d'un simple dosage d'IgG (www.famh.ch) tout en ajoutant la possibilité de doser les quatre sous-classes d'IgG et les deux de l'IgA. La plupart des IGIV sont des IgG presque pures et il existe la Pentaglobine, associant des IgG avec 20% d'IgM. La prescription d'IGIV ou d'IGSC (sc: sous-cutané) est donc souvent associée à une mesure du taux sérique avant et après perfusion (pour juger de l'augmentation des taux). Ici, les malades hypogammaglobulinémiques recevant les IVIG/IGSC dépendent du laboratoire beaucoup plus que ceux traités pour une maladie auto-immune, ces derniers présentant dans quasiment tous les cas un taux sérique d'IgG dans la norme. Le lecteur est référé au site web de la Société Européenne de l'Immunodéficiences, www.esid.org, un site qui est détaillé pour tous les aspects du soutien laboratoire dans l'immunoglobulinothérapie.

Il apparaît ainsi un triple rôle du laboratoire dans le traitement par Ig: 1. Celui du diagnostic qui amène le clinicien à prescrire les IGIV ou IGSC. Cet ensemble d'examen au labo comp-

rend lui aussi le diagnostic de maladies inflammatoires/autoimmunes amenant au traitement par IGIV (voire première partie, pipette n° 3, 2006) et l'auteur n'y reviendra pas. 2. Le rôle du laboratoire dans la documentation de l'efficacité du traitement et de l'assurance de sa sécurité. 3. Le contrôle de qualité des pompes à infusion, tel la MP-100 micrel (www.micrelmed.com) ou la Chronosuper PID (www.microjet.it). pipette y reviendra dans sa section «Marketplace».

Cet article abordera les trois aspects focalisés sur l'hypogammaglobulinémie en se penchant plus particulièrement du côté du prescripteur qui commande les tests appropriés à son laboratoire de routine, puis au laboratoire spécialisé en la matière.

Les examens immunologiques primaires

La fourchette moyenne sur environ mille donneurs de sang bien portants des taux d'IgG normaux se situe entre 6 et 16 g/L, ces taux resteront stables chez l'individu le long d'une vie à un certain niveau individuel (7 g/L suffiront chez l'un alors que l'autre aura besoin de 14 g/L pour rester sans infections). Il n'y a pas de différences hommes/femmes.

Le diagnostic des paraprotéines, en cas de résultats évocateurs en néphélométrie, se dirige dans la direction de la densitométrie miniaturisée (électrophorèse capillaire, [1]).

Lorsque le médecin recensera chez un de ses patients des épisodes infectieux récidivants plus de deux à trois fois/an et qui ne céderont pas au traitement antibiotique après quatre semaines, les IgG et les paramètres fondamentaux du système du complément devront être dosés de manière impérative au laboratoire.

L'hypogammaglobulinémie alors confirmée évoquera en fonction du contexte clinique tout un éventail de diagnostics différentiels: l'immunodé-

ficiences combinées (CVID: combined variable immunodeficiency), le syndrome de Wiskott Aldrich, SCID (severe combined immunodeficiency syndrome), l'hypogammaglobulinémie transitoire de l'enfant (THI, transient hypogammaglobulinemia of infancy) et le syndrome IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked). En France, les collègues de l'Hôpital Saint Louis, à Paris, ont établi une banque de données DEFI (DE Française Immunodéficience, [2]).

Une hypogammaglobulinémie peut aussi être associée à des désordres métaboliques, type déficit en transcobalamine, et nombre d'anomalies chromosomiques peuvent causer une hypogammaglobulinémie. Chez certains patients suspects d'immunodéficience mais qui présenteront des taux d'Ig normaux, le laboratoire médical étudiera le système du complément. Le manque sélectif d'un de ses composants, plus particulièrement de C1q, C2 et C4, suggère une déficience génétique du complément. Le déficit en C3 est possible aussi, mais son tableau clinique apparaît tôt chez le nourrisson, associant des infections graves et précoces (*h. influenzae*, *pneumococcus*) et des manifestations rénales.

Avant de continuer l'effort diagnostique du laboratoire, le médecin ne manquera pas de relever une anamnèse approfondie, en précisant les antécédents familiaux.

Examens microbiologiques

Le laboratoire de microbiologie est très utile pour élucider l'immunocompétence du patient. On l'investiguera par le dosage du taux d'anticorps typiques et importants dans notre défense immunitaire tel les anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes capsulaires-polysaccharide (PS) des pneumocoques [3, 4].

La plupart des infections sont à l'origine d'une hypergammaglobulinémie à l'exception de la rubéole, du CMV, et du mycoplasme qui entraînent des hypogammaglobulinémies secondaires; dans ce cas, la demande d'une sérologie virale au laboratoire de microbiologie n'est guère utile.

En cas d'hypogammaglobulinémie, il faudra exclure aussi une toxicité médi-

Tableau 1.

Examens globaux de laboratoire des immunodéficiences primaires [8]

Chapitre	Raison principale de ces examens ... exclure un/une ...
Bilan hématologique	Lymphopénie
Serum IgG/A/M quantitatif	Hypogammaglobulinémie
Sous-types des lymphocytes	Déficit cellulaire sélectif
Cellules T totales (CD3, CD2)	Déficit cellulaire des lymphocytes T
Sous-types cellules T (CD4, CD8)	Déficit auxiliaire
Cellules B (CD19, CD20)	Hyposynthèse d'Ig, défaut de présentation de l'antigène
Cellules NK (CD16, CD56)	Déficit cytotoxique
Typage du malade dans les HLA-DR	Déficience MHC classe II
Titres d'isohémagglutinines	Incapacité synthèse anticorps spécifiques
Titre d'anticorps contre les vaccins habituels (tétanos, diphtérie, Hib, Méningocoques, polio, rubéole)	Déficit du système du complément
Tests du complément CH50, AP50	mucoviscidose
Test de la sueur	Déficit humoral
Taux de l' α_1 -antitrypsine	

camenteuse, qui peut survenir avec les antimalariques, le captopril, de la carbamazépine et le traitement par sels d'or dans les arthrites rhumatoïdes.

Ayant exclu ces particularités, le patient hypogammaglobulinémique aura les examens de laboratoire de routine suivants: bilan hématologique, électrophorèse des protéines, dosage des classes d'immunoglobulines, évaluation du système du complément: CH50, C4, C3, bilan d'autoanticorps, et la glycémie (tab. 1).

Tout ces tests et leur interprétation dans le cadre d'une hypogammaglobulinémie sont à consulter sur le site: www.esid.org.

Une évaluation de l'efficacité de vaccins sera utile également. En consultant le médecin pour leurs états infectieux à répétition, les patients seront souvent déjà vaccinés et on testera le titre d'anticorps contre les vaccins habituels. Les vaccinations par des virus vivants atténués sont contre-indiquées chez les patients immunodéprimés. Le lecteur averti aura noté que le présent texte retarde la recommandation de doser les sous-classes des IgG, à savoir, IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 non seulement à cause des coûts mais aussi parce que ce dosage ne servira à rien lorsque l'hypogammaglobulinémie se situe <2 g/L. Par contre, c'est l'hypogammaglobulinémie modérée autour

de 5 g/L qui pourrait bien se manifester cliniquement à cause d'un déficit sélectif d'une sous-classe.

Une fois l'hypogammaglobulinémie confirmée, nous écarterons aussi une maladie maligne. La leucémie lymphoïde chronique, les lymphomes non-Hodgkiniens accompagnés d'hypogammaglobulinémie suspects doivent déclencher un examen médullaire, une colonoscopie et une radiographie du thorax. Dans la dystrophie myotonique, le catabolisme des IgG est accéléré et peut être à l'origine d'une hypogammaglobulinémie. A écarter également, une perte d'IgG par protéinurie, par lymphangiectasies intestinales, et aussi par la peau.

Examens immunologiques secondaires

C'est seulement à ce niveau là, quand les mesures diagnostiques n'auront pas abouti, que l'on procèdera aux examens spécialisés: étude des sous-populations lymphocytaires par les CD (cluster de différenciation des marqueurs) pour déterminer le rapport cellules T/B en cytofluorométrie (tab. 1). Le CD19 permet d'estimer le nombre des cellules B et l'on pourra procéder à l'analyse des cellules CD27 positives (cellules mémoires) et aux marqueurs IgD et IgM, co-exprimés; les cellules CD20 sont aussi importantes

à contrôler. Avec un traitement par rituximab, les cellules CD20 seront diminuées sans que cet anticorps monoclonal tue pour autant les cellules matures (plasma cells).

L'analyse moléculaire sera encore plus poussée: par exemple, en cas d'un syndrome autosomal-récessif hyper-IgM, il faudra exclure un déficit en CD40 ligand et approfondir l'anamnèse familiale. On sait aujourd'hui que ces malades sont capables de synthétiser la protéine CD40, mais que le ligand du CD40 est déficient sur les cellules T, les patients associant un déficit humoral avec hyper IgM et un déficit de l'immunité cellulaire.

Lors de la 12^e Réunion de la Société Européenne pour les Immunodéficiences (ESID), Budapest 2006, nous avons appris une confirmation formelle de l'utilité des examens moléculaires et génétiques pour mieux cerner l'origine de ces états hypogammaglobulinémiques et d'immunodéficiences. En effet, d'autres déficits peuvent aussi être dépistés: le déficit de l'un des quatre composants de la NADPH oxydase (p47 phox, p22 phox, p67 phox et gp 91 phox) peut induire une maladie chronique granulomateuse, CGD, avec à l'horizon thérapeutique la transplantation de cellules souches. Pour l'instant, ce traitement se trouve à l'état

préliminaire d'essais cliniques singuliers et n'engagera pas nos laboratoires, les centres compétents en la matière se trouvant à Paris (Prof. A. Fischer) encore que certains cas auront été traités à l'hôpital des enfants malades de Zurich (Prof. R. Seger) et de Genève (Prof. M. Jaconi).

L'importance du laboratoire dans le contrôle de qualité du traitement substitutif par IGIV et IGSC

Routine

De plus en plus, les IgG sont administrées par voie sous-cutanée (SCIG, [5]) de préférence chez les sujets à accès veineux difficile. En tête de liste des examens de laboratoire pour le monitoring des patients traités, et ceci ressort de ce qui a été écrit auparavant, est le dosage des IgG avant et après administration soit des IGIV soit des IGSC. Le succès clinique de cette substitution d'IgG se manifeste par une réduction voire une disparition des états infectieux (otite, sinusite, pneumonie). Le laboratoire nous prouvera que les taux des IgG sériques du patient ainsi traité augmenteront et se stabiliseront dans la norme.

Lorsqu'une reconstitution constante fut atteinte, un groupe d'études d'administration des IgG par voie sous

cutanée [6] injecta les IgG par voie s.c. 1x/semaine pendant 12 mois. Au laboratoire, cette étude sur 65 patients pour la plupart adultes démontra une ascension des taux minimaux d'IgG de 786 à 1040 mg/dl sous un dosage de 158 mg IgG/kg poids corporel. Dans ce genre d'études ainsi qu'au cabinet médical quotidien, le dosage des IgG par néphélométrie constitue le pilier important nous indiquant le succès des traitements.

Il est maintenant connu, que les IGIV et IGSC sont accompagnées, dans des cas rares, d'effets secondaires. Bien que la possibilité de transmission de virus ou de prions par les transfusions soit un fait appartenant au passé, espérons-le, les préparations d'immunoglobulines thérapeutiques se trouvent à la fin de nombreuses étapes d'isolation à partir du plasma source bénéficiant ainsi d'un appauvrissement complet d'un agent infectieux qui aurait pu se faufiler dans ce plasma pourtant testé et sélectionné pour sa stérilité microbiologique. On pourra néanmoins recommander, ne serait-ce que pour le confort du patient, de contrôler les marqueurs infectieux standards (HBV, HCV) une fois par année, même en absence de signes cliniques évocateurs; le labo de microbiologie est à la disposition du malade.

pipette
cme
CONTINUOUS MEDICAL EDUCATION

1. Le dosage des sous-classes d'IgG est de rigueur lorsque:

- A Le patient souffre d'une érythrodermie dermatite exfoliative.
- B Le taux total IgG plasmatique/sérique tombe en dessous de 2 g/L.
- C Le patient fait une pneumonie.
- D Apparaît une protéinurie.
- E Le taux total IgG plasmatique/sérique tombe en dessous de la norme.

2. Les centres de fractionnement pour les immunoglobulines intraveineuses veillent à mettre à disposition des préparations peu visqueuses. Le contrôle de la viscosité n'étant pas impératif chez les malades à risque, il vaut mieux:

- A Diluer la préparation avant la transfusion.
- B Instruire le personnel soignant de réduire la vitesse d'infusion.
- C Ne pas administrer des immunoglobulines si l'hématocrite augmente au-dessus de 0,52.
- D Contrôler la VS au laboratoire.
- E Faire une numération plaquettaire.

Vous trouverez les réponses sur internet sous www.sulm.ch/pipette.html.

1. Die quantitative Bestimmung der IgG-Subklassen muss dem Labor beauftragt werden, wenn:

- A der Patient eine exfoliative Erythrodermie entwickelt.
- B der Plasma-, bzw. Serum-Spiegel der IgG unter 2 g/l fällt.
- C der Patient länger als 2 Wochen eine Pneumonie durchmacht.
- D sich eine Proteinurie einstellt.
- E der Plasma-, bzw. Serum-Spiegel der IgG unter die Norm fällt.

2. Die Plasma-Fraktionierzentren sorgen dafür, dass die Immunglobulinpräparate keinen zu hohen Viskositätsgrad erlangen. Weil die Viskositätsmessung nicht vorgeschrieben ist, soll bei Risikopatienten

- A das Präparat vor der Transfusion verdünnt werden.
- B das Pflegepersonal die Infusionsgeschwindigkeit tief halten.
- C mit einem Hämatokrit über 0,52 auf die Verabreichung von Immunglobulinpräparaten verzichtet werden.
- D die Senkungsgeschwindigkeit im Labor bestimmt werden.
- E die Thrombozytenzahl gemessen werden.

Die Antworten finden Sie im Internet unter www.sulm.ch/pipette.html.

Anémie aiguë sous traitement par IGIV/IGSC

L'anémie avérée du malade sous ce traitement est très rare mais peut survenir. Le contrôle de la formule sanguine est recommandé 1x/année. Dans des cas très rares, elle peut devenir importante et exprimer les signes de l'hémolyse, induite par des anti-A chez un patient du groupe sanguin A. C'est ainsi qu'avec une préparation avec un titre anti-A de 1:16, un adulte récemment traité aura une anémie hémolytique alloimmune Coombs positive, l'éluion de l'anticorps de ses hématies révélant une spécificité anti-A. Le laboratoire d'immuno-hématologie fut d'une utilité importante pour ce malade car on sélectionnera pour lui, dorénavant, des lots de production à titre anti-A <1:8. Au début d'une cure par IGSC, le dosage de la protéine C-réactive (CRP) indiquera absence/présence d'une inflammation locale au site de l'administration sous-cutanée; un dosage de la CRP avant les injections s.c. pourrait être utile.

Assistance du laboratoire dans le contrôle de qualité de l'administration au lit du malade

La perfusion des IGIV doit se produire de plus en plus rapidement soit pour réduire le temps précieux du malade et du personnel, soit pour réduire le temps d'exposition du réseau veineux à la phlébotomie. Les producteurs des IGIV fournissent donc des préparations concentrées de 10% voire de 12% ce qui augmente leur viscosité [7]. Le laboratoire dispose de viscosimètres pour contrôler la viscosité du sang total du malade et de la préparation transfusée afin d'éviter des accidents vasculaires systémiques. Offrir une boisson au malade est de rigueur. Quant aux préparations IGSC, une viscosité trop élevée (>10 centipoises) pourrait amener à des réactions locales au site d'injection et réduire la vitesse de résorption. L'infusion des Ig thérapeutiques par voie sous-cutanée ayant gagné en popularité ces dernières années; le personnel soignant bien instruit est chargé d'appliquer les SCIG

sous la peau à des sites différents tels le haut du bras au niveau du muscle deltoïde, l'avant-bras, la région para-ombilicale au niveau abdominal et la cuisse. Cet auteur propose que les personnels soignants et du laboratoire s'associent afin de rester à l'écoute d'imprécisions possibles du débit de la pompe et de sa performance de biocompatibilité: les patients s'administrent souvent eux-mêmes les IGSC.

Correspondance:

Prof. Dr U. E. Nydegger
Transfusion Therapy Consultancy
Direction Médicale Octapharma Suisse
Seidenstrasse 2
8853 Lachen
info@immune-complex.ch

Remerciements

L'auteur est reconnaissant au Prof. Yves Bertrand, médecin-chef du Service Immuno-Hématologie Pédiatrique et Transplantation de Moelle Osseuse, Hôpital Debrousse, rue Sœur Bouvier, F-69005 Lyon, France, d'avoir bien voulu vérifier ce texte.

Références

- Schild C, Trapp-Chiappini D, Egger E, Nuoffer JM. Reliability of M-protein quantification on Paragon CZE 2000 and Capillarys 2. *Pipette* 2006;5:28 (abstr.).
- Oksenhendler E, Legarff-Tavernier M, Rabain C, Fieschi C, Theodorou I, Gerard L. The DEFI-French national study on adults with PID and hypogammaglobulinemia. 103 (B19), XIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest 2006, livre des résumés.
- Verhagen J. (2005) Surveillance des maladies infectieuses par un réseau de laboratoires de microbiologie. www.iph.fgov.be/epidemo
- Laub R, Di Giambattista M, Brancaert TH, Verspecht Y. Measuring and interpreting levels of antibodies against major pneumococcus serotypes in plasma pools and intravenous immunoglobulins. XIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest 2006, livre des résumés I3.
- Chapel HM, Spickett GP, Ericson D, Engl W, Eibl MM, Bjorkander J. The comparison of the efficacy and safety of intravenous versus subcutaneous immunoglobulin replacement therapy. *J Clin Immunol.* 2000; 20:94-100.
- Ochs HD, Gupta S, Kiessling P, Nicolay U, Berger M and the subcutaneous IgG study group. Safety and efficacy of self-administered subcutaneous immunoglobulin in patients with primary immunodeficiency diseases. *J Clin Immunol.* 2006; 26(3):265-73.
- Haag S, Buchacher A, Iberer G. Comparison of the viscosity of three different subcutaneous immunoglobulin brands. 210 I14. XIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest 2006, livre des résumés.
- Chapel HM, Misbah S, Webster ADB. Assessment of the immune system. In: Primary Immunodeficiency Diseases. A molecular and genetic approach. (Ochs HD, Edvard Smith CI, Pick JM, Eds) Oxford University Press 2007. p. 611-632.