

Apport du laboratoire de Chimie Clinique au dépistage, au diagnostic et au suivi des gammopathies monoclonales

Les Jeudis de Fleurus, le 20/5/2010

N. Gillain-Martin, Ph. Biologiste,

CHR La Citadelle, Liège

Plan de l'exposé

- Importance de la mise en évidence d'un composé monoclonal (CM)
- Les défauts de l'électrophorèse : faut-il réaliser une immunofixation (IF) en présence d'un pentavalent?
- Les difficultés de l'IF et de l'immunosoustraction (ou immunotypage, immunotyping) (IT): laquelle choisir?
- Le dosage des chaînes légères libres (CLL) dans le sérum (Freelite®) et son apport au diagnostic et au suivi des gammopathies monoclonales
- Quel est le test le plus performant, le dosage des CLL ou l'immunofixation?: l'étude du Professeur X. Bossuyt publiée en 2008 dans le BJH
- Quelques considérations personnelles...



Il n'y a pas que le myélome!
La découverte d'un CM ne doit
jamais être prise à la légère...



Principales hémopathies malignes associées à un CM:

- le myélome multiple (maladie de Kahler)
- la macroglobulinémie de Waldenström
- les leucémies lymphocytaires chroniques
- les lymphomes non Hodgkinien
- les plasmocytomes
- l'amylose
- la maladie des chaînes lourdes
- la maladie des chaînes légères
- le syndrome de POEMS (polyneuropathie, organomégalie, endocrinopathie, dysglobulinémie monoclonale, anomalie cutanée)



Pathologies associées à un CM sans implication pronostique du CM

- Maladies auto-immunes
- Maladies infectieuses (à mycoplasme, virales: CMV, EBV...)
- Traitements par immunosuppresseurs
- Pathologies tumorales
- Transplantation des cellules souches hématopoïétiques surtout les allogreffes

La présence du CM peut alors être transitoire !

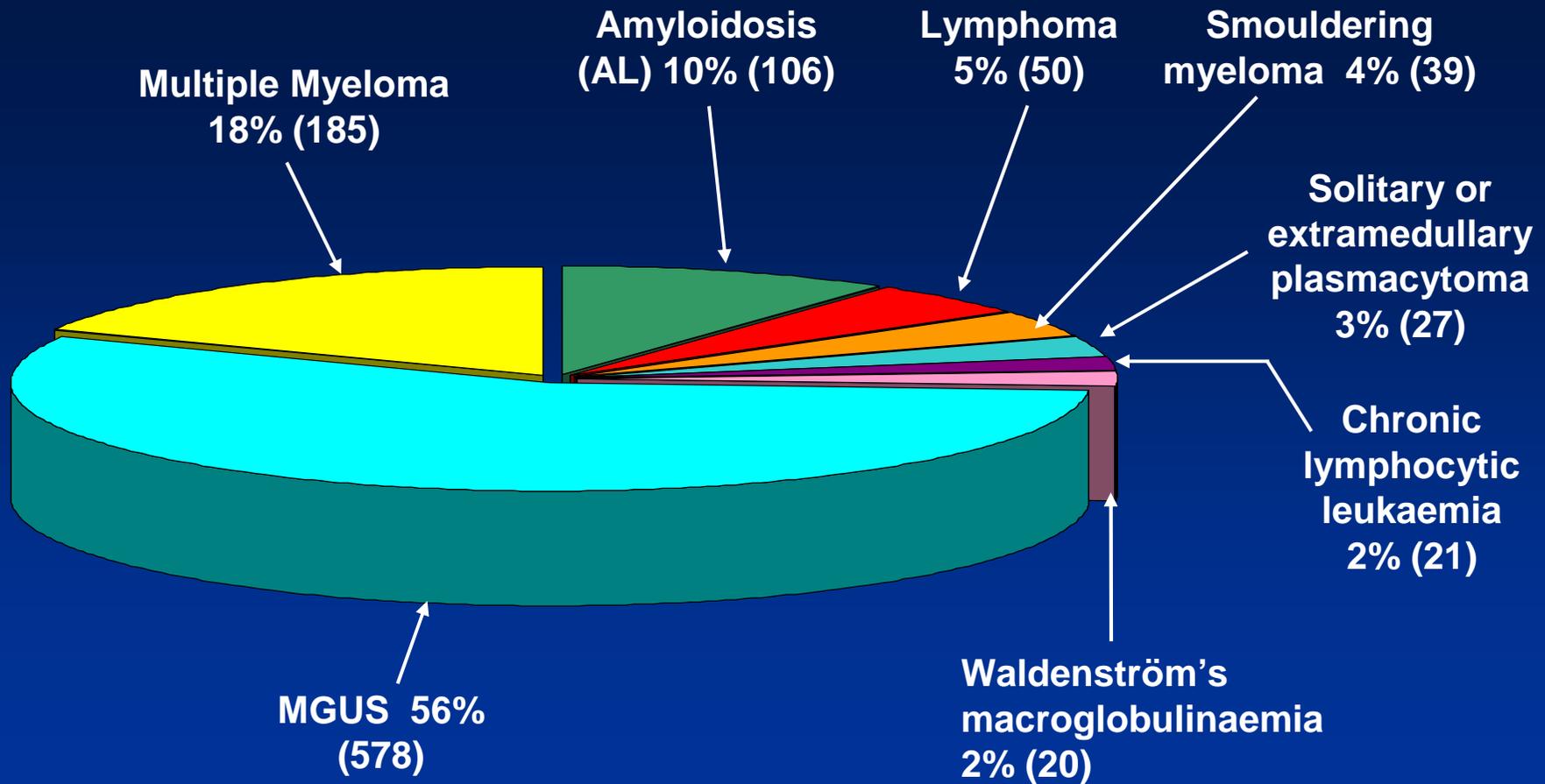


CM observé de manière fortuite chez un patient asymptomatique: cas le plus fréquent

- On qualifie ces observations de gammopathie monoclonale de signification indéterminée (GMSI) ou de MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance)
- Plus de 50 % des CM observés sont associés à des MGUS
- 25% des MGUS évoluent dans les 20 ans vers un myélome; la transition vers un clone plasmocytaire de forte malignité résulte de plusieurs évènements → le nouveau concept

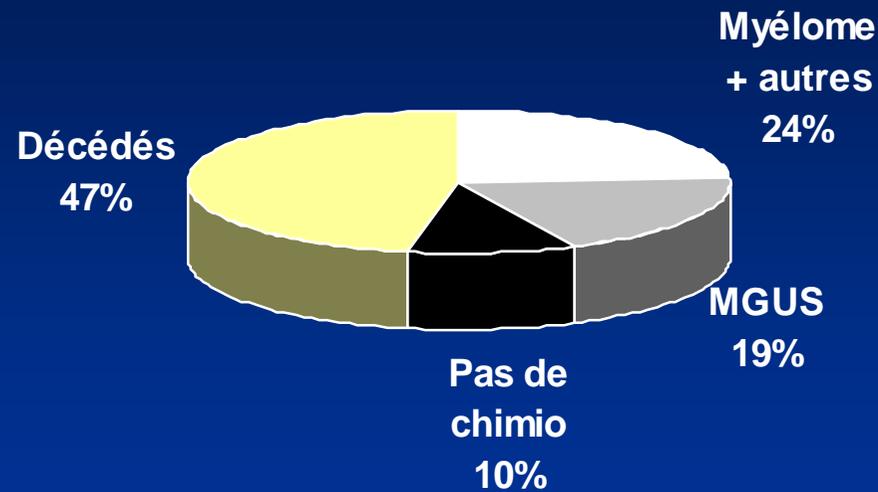
MGUS = pathologie plasmocytaire monoclonale à malignité réduite





Distribution of clinical diagnoses in 1026 patients with a serum monoclonal protein detected at the Mayo Clinic in 1992.

Evolution des MGUS dans le temps



L'étude prospective de Kyle (Mayo Clinic) a duré 20 ans. Elle a démontré que 24% des 241 patients classés comme « MGUS » ont présenté une amylose ou une hémopathie maligne dans un délai de 8 ans minimum après la découverte du CM

Conséquences néfastes de la présence d'un CM quelle que soit la pathologie associée

Un CM peut entraîner des complications liées à son activité anticorps:

- Neuropathies périphériques : IgM anti-myéline, anti-ganglioside; syndrome de POEMS (svt IgA), polyneuropathies axonales dues aux IgG et IgA
- Maladie des agglutinines froides: svt IgM kappa anti-érythrocytaire provoquant une hémolyse chronique et une cyanose des extrémités par exposition au froid
- Œdème angioneurotique acquis: anti-C1 estérase inhibiteur
- Activité anti-facteur de coagulation, lipoprotéine...
et ceci quelle que soit sa concentration!



Conséquences néfastes de la présence d'un CM quelle que soit la pathologie associée

Un CM peut entraîner des complications liées à sa concentration élevée ou à ses propriétés physico-chimiques:

- Syndrome d'hyperviscosité
- Syndrome cryopathique (type I et type II associé à une immunoglobuline polyclonale)
- Amyloïdose en raison de son affinité pour de nombreux tissus: reins, cœur, tissus nerveux, peau, tube digestif...



Les CM et les troubles de l'hémostase

(d'après C. Eby et M Blinder, *Current Hematology Reports*
2003, vol 2,5, 388-94)

Les complications hémorragiques sont la cause du décès de 33% des patients atteints d'un myélome et 21% des patients souffrant de macroglobulinémie

- souvent pas lié directement au CM: thrombocytopénie due à l'envahissement médullaire ou au traitement, dysfonctionnement hépatique, sepsis ...
- parfois propre au CM: inhibition d'un facteur de coagulation (fct X, fct VIII), du facteur de von Willebrand, de la fonction plaquettaire, inhibition de la polymérisation de la fibrine, inhibition de la protéine S ou C...
- syndrome d'hyperviscosité



Les problèmes posés par l'électrophorèse des protéines sériques



L'électrophorèse des protéines sériques: le test indispensable

- Pour le dépistage du CM (la majorité des CM sont découverts fortuitement)
- Comme critère de diagnostic
- Pour l'évaluation du risque de transformation maligne
- Pour contrôler l'efficacité du traitement

Depuis 1995, l'immunofixation ne peut plus être portée en compte à l'INAMI que « lorsqu' une bande anormale est visible à l'électrophorèse »



Actuellement, seule la firme Sebia est réellement présente sur le marché belge et propose des techniques automatisées ou semi-automatisées

- Les gels d'agarose et le système HYDRASYS (+ HYDRAPLUS)
- L'électrophorèse capillaire (CAPILLARYS et MINICAP)

R: - Helena nous propose un système capillaire
- l'Interlab G26 pour gel d'agarose n'est plus commercialisé par Analis



Les « faux » composés monoclonaux

- Fibrinogène, facteurs du complément, hémoglobine...simulent un CM en agarose et en électrophorèse capillaire
- Des médicaments et des produits de contraste simulent un CM (au niveau α_2 et β) en électrophorèse capillaire

La plupart de ces interférences peuvent être facilement évitées ou détectées: il suffit de réaliser une IF!



Du fibrinogène contamine souvent les sérums des patients dialysés: comment l'éliminer?

- 450 μl de sérum + 50 μl d'éthanol absolu
(tube conique)
- Vortexer
- Laisser reposer 24H au frigo
- Centrifuger pour précipiter complètement le fibrinogène



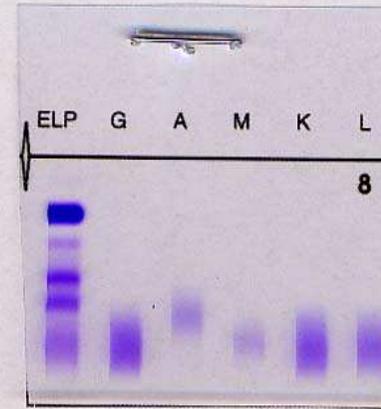
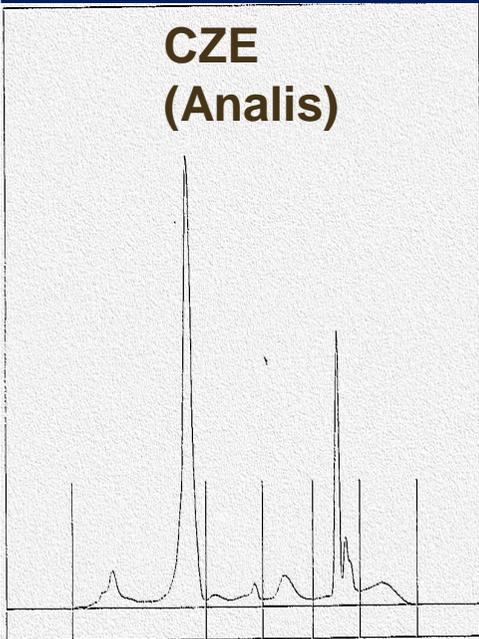
Les principales interférences en électrophorèse capillaire:

X. Bossuyt, Clin Chem Lab Med 2003; 41(6):762-772

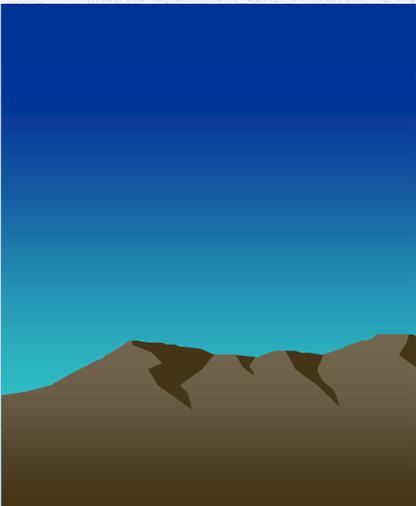
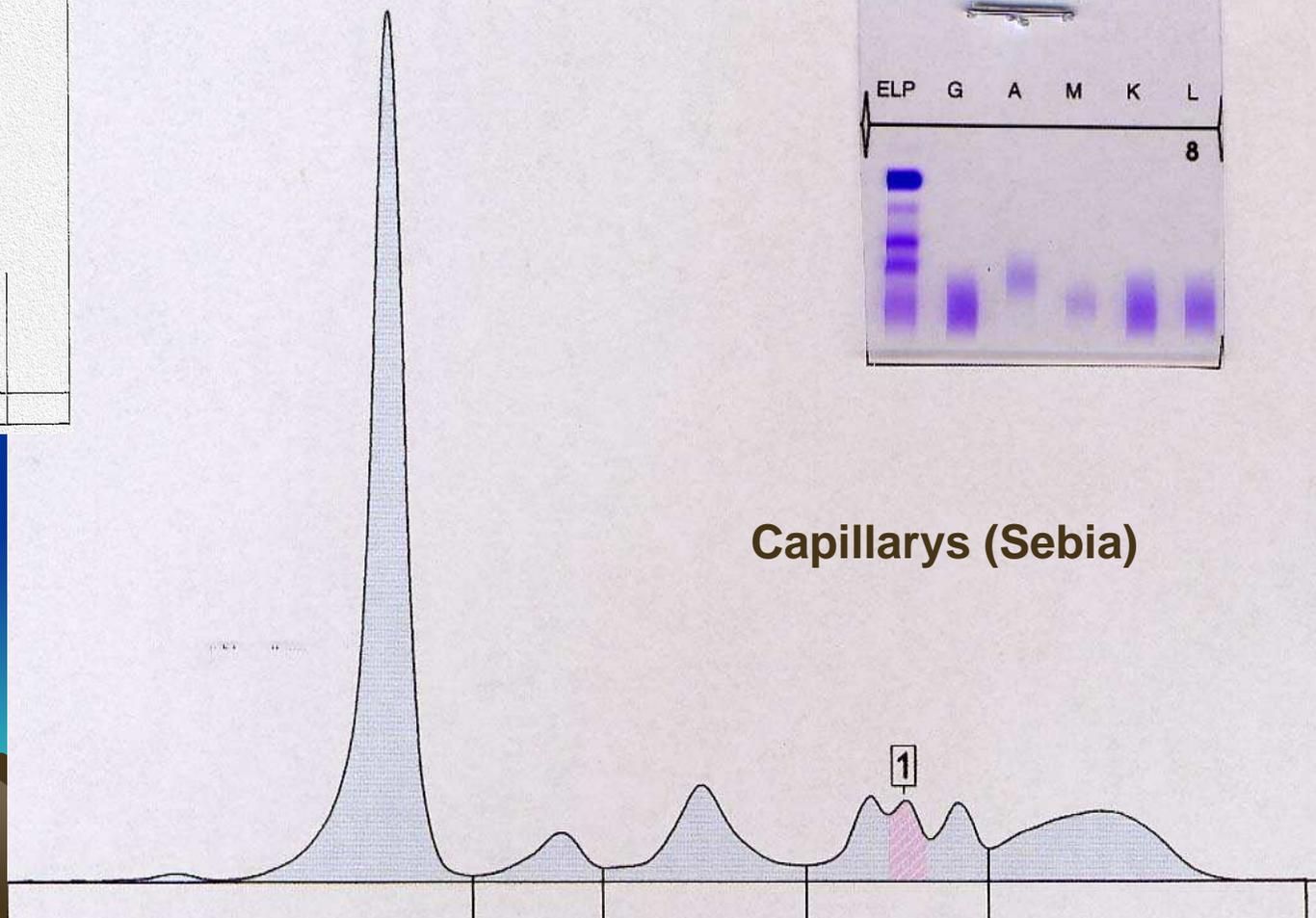
Reference	Interfering substance	Location on electropherogram
Interference by radio-opaque agents		
Bossuyt <i>et al.</i> (37)	Urografin (Meglumine amidotrizoate)	Anodal side α_2 -globulin fraction
	Telebrix (Meglumine ioxitalamate)	Mid- α_2 -globulin fraction
	Omnipaque (Iohexol)	Cathodal side α_2 -globulin fraction
Blessum <i>et al.</i> (39)	Telebrix (Meglumine ioxitalamate)	Mid- α_2 -globulin fraction
Arranz-Pena <i>et al.</i> (38)	Meglumine iotroxate	Prealbumin
	Meglumine amidotrizoate	Anodal site α_2 -globulin fraction
	Ioxitalamic acid	Mid- α_2 -globulin fraction
	Iobitridol	Mid- α_2 -globulin fraction
	Iopamidol	Cathodal site α_2 -globulin fraction
	Iohexol	Cathodal site α_2 -globulin fraction
	Iopromide	Cathodal site α_2 -globulin fraction
	Meglumide ioxaglate	Anodal site β -globulin fraction
	Ioversol	Mid β -globulin fraction
	Iomeron	Mid β -globulin fraction
Interference by antibiotics		
Bossuyt & Peetermans (40)	Intravenous piperacillin-tazobactam	Anodal side of β -globulin fraction
Bossuyt <i>et al.</i> (41)	Sulfamethoxazole	Anodal site of albumin

Au CHR la Citadelle, le produit de contraste utilisé est l'ioméron qui interfère en Bêta

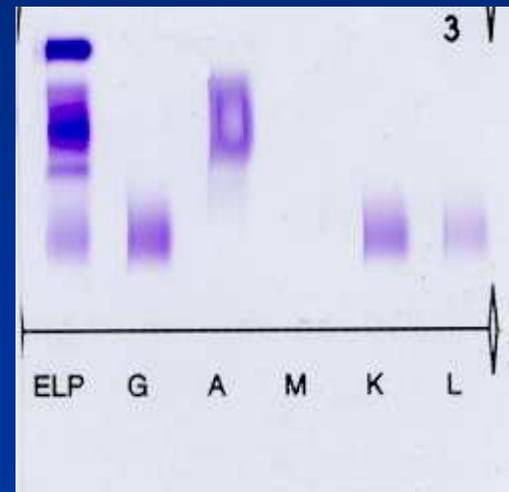
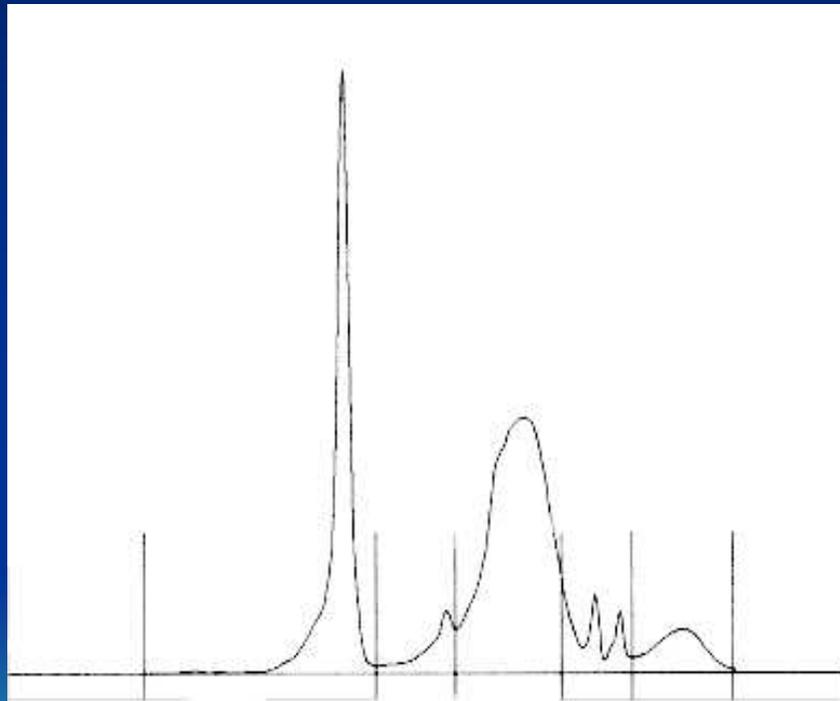
**CZE
(Analis)**



Capillarys (Sebia)



Ne jamais conclure trop vite à une interférence!



Chez un adolescent de 14 ans...

Le gros problème: les CM invisibles à l'examen du tracé

Ils sont présents :

- en trop faible concentration
- recouverts par une fraction normale
- en faible concentration et recouverts par une fraction normale:

les chaînes légères

(parfois liées à l' α 1 antitrypsine),

les IgA et les IgM

les chaînes lourdes...



Agarose versus Capillaire

De nombreuses études ont démontré que l'électrophorèse capillaire permettait un meilleur dépistage des CM que l'électrophorèse en gel d'agarose

	Agarose sur Hydrasys	Capillarys
Sensibilité	93,50%	97,20%
Spécificité	98,90%	93,70%

AGE : agarose
CZE : capillaire

X. Bossuyt, Clin Chem Lab Med 2003; 41(6):762-772

Reference	Instru- ment	n	Comparison method	Sensitivity	Specificity	Comment
Jolliff & Blessum (4)	Paragon	240 samples 100 M-proteins	AGE			100% concordance when – M-protein > 0.75 or > 0.5 g/l (IgG) – M-protein not in β -fraction
Bossuyt <i>et al.</i> (22)	Paragon (1.08)	58 selected samples 58 M-proteins (IF)*	AGE CAE	93% (CZE) 86% (AGE) 74% (CAE)		
Katzmann <i>et al.</i> (12)	Paragon	1518 samples 215 M-proteins (IF)* prospective study	AGE	95% (CZE) 91% (AGE)	99% (CZE) 99% (AGE)	
Clark <i>et al.</i> (24)	Paragon	selected samples	AGE			CZE is superior to AGE for: M-proteins within polyclonal increase M-proteins in β -region Light chains No point of application artefacts
Litwin <i>et al.</i> (23)	Paragon	617 samples 63 M-proteins (IF)*	AGE	100% (CZE) 95% (AGE)	100% (CZE)	
Meunier (25)	Paragon	105 selected samples 105 M-proteins (IF)*	AGE	80% (CZE) 39% (AGE)		Selection: "difficult" M-proteins migrating in β (n = 65) and α_2 (n = 10)
Bossuyt & Mariën (26)	Paragon (1.5)	1692 samples 481 M-proteins (IF)* prospective study		95% (CZE)		

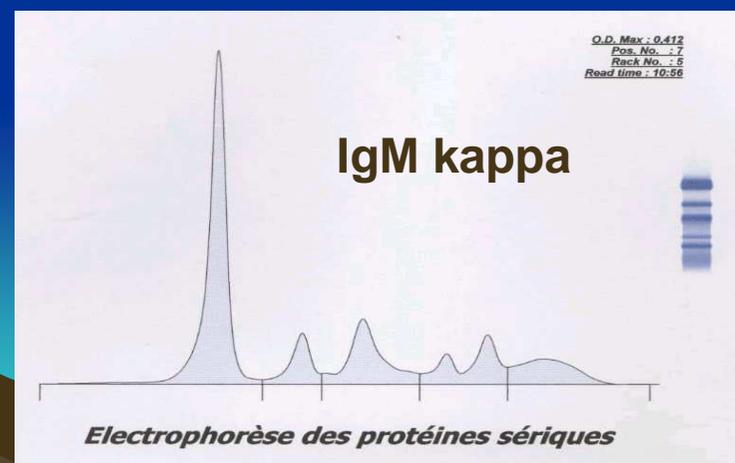
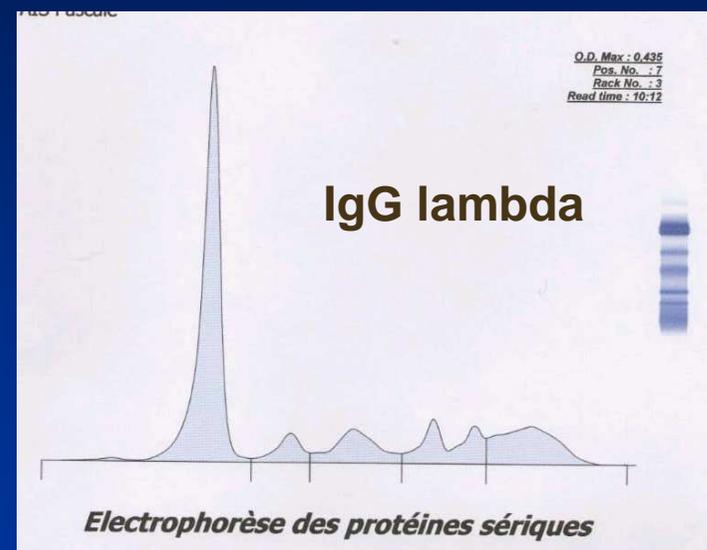
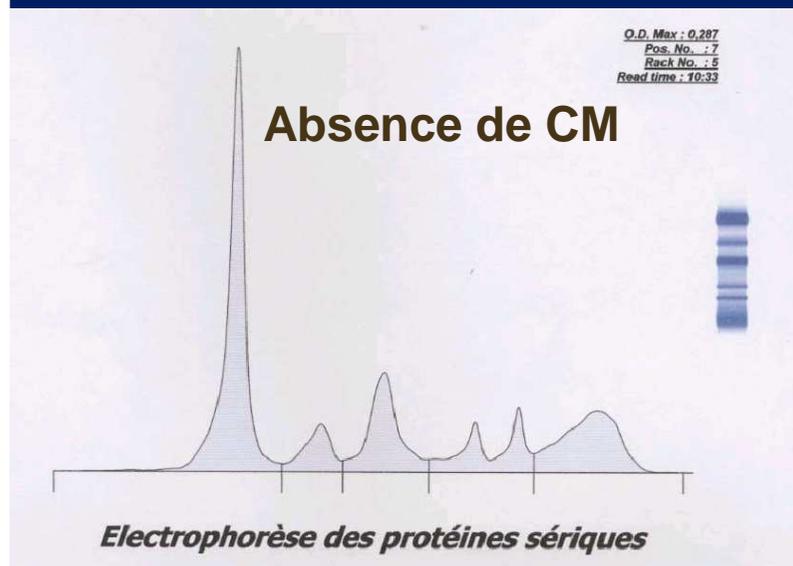
Précautions à prendre pour éviter de passer à côté d'un CM

- Il faut examiner avec attention la zone des bêta et des gammaglobulines (et aussi des alpha: chaînes légères)
- Toujours réaliser une IF en cas d'hypogammaglobulinémie
- Certains CM déforment légèrement la fraction normale qui la recouvre.

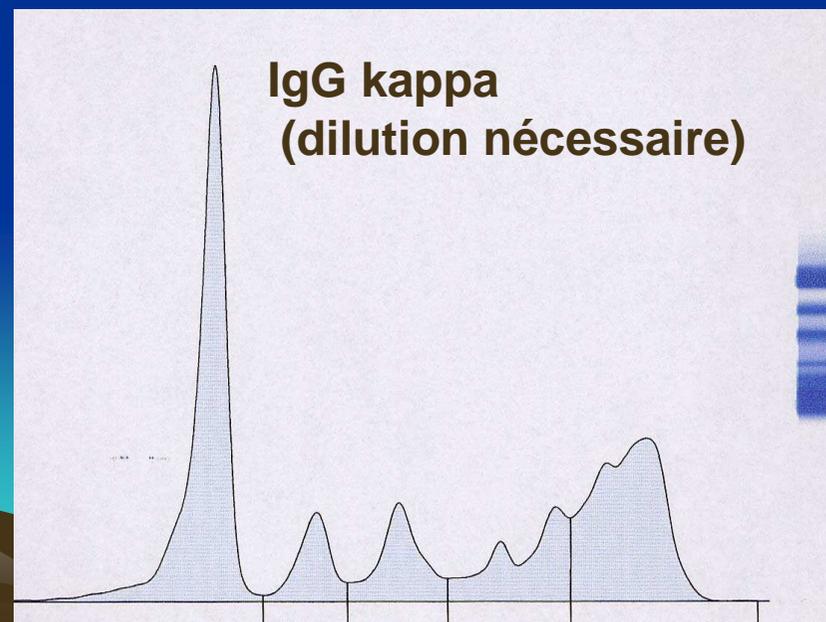
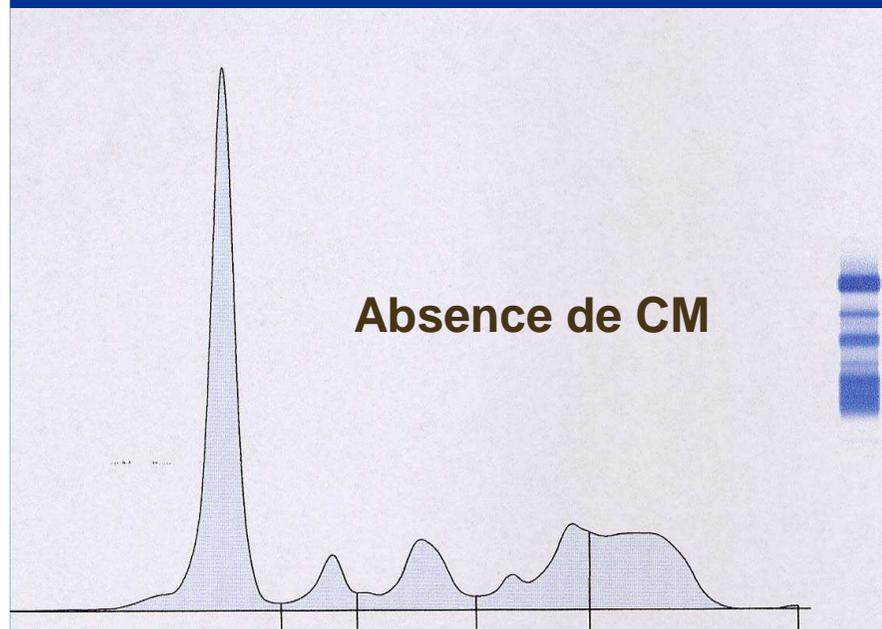
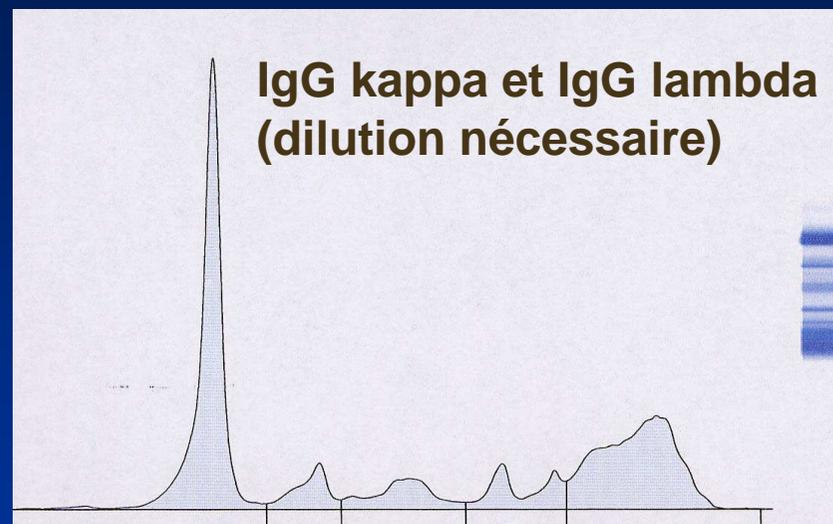
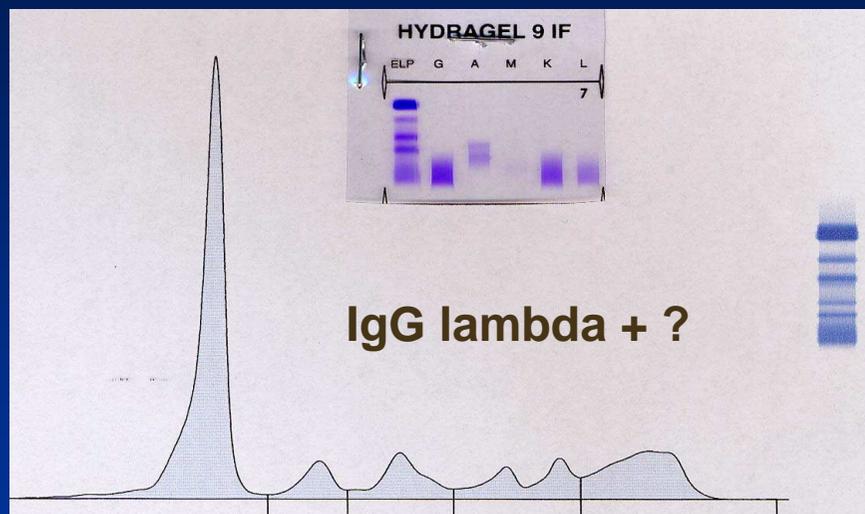
Ces déformations sont aussi observées dans les syndromes inflammatoires chroniques sans CM associé



Difficultés rencontrées dans l'interprétation des tracés : CM ou pas CM?



Les syndromes inflammatoires chroniques: un vrai casse tête!

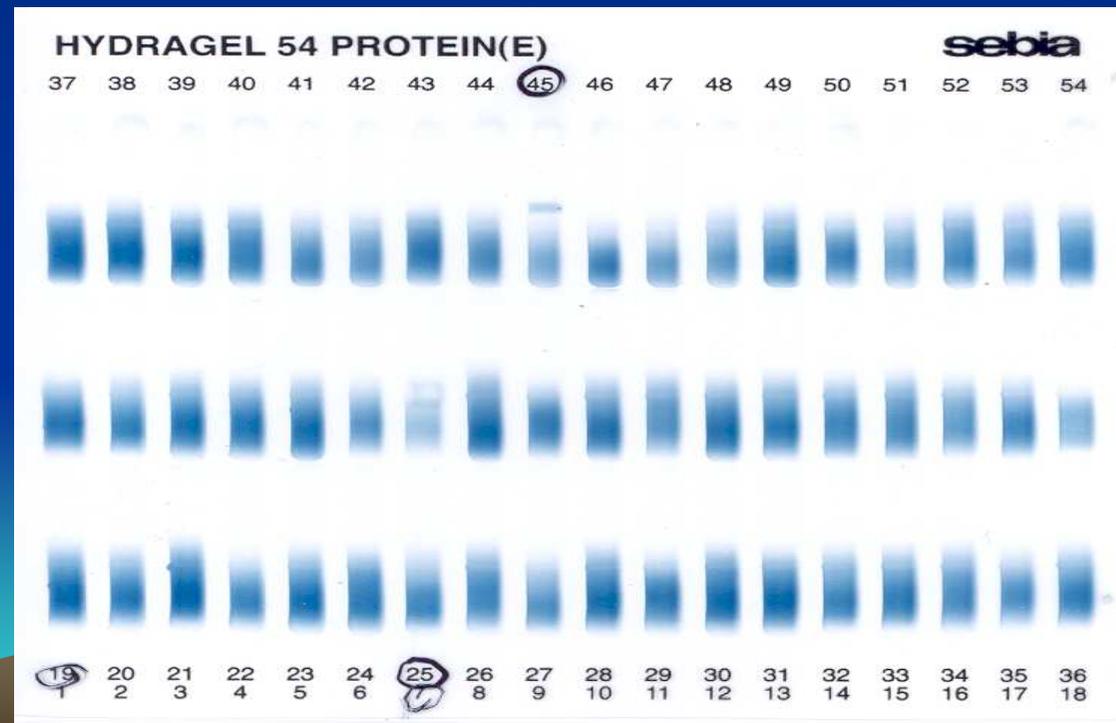


Faut-il réaliser une fixation systématique en présence d'un pentavalent?

- En 1995, les premières techniques automatisées sur acétate de cellulose et sur agarose ne permettaient pas un bon dépistage des CM: seulement 58% grâce aux gels fabriqués par la firme Helena pour le REP d'après notre expérience.
- Une technique c'est alors imposée: la réalisation d'une immunofixation en présence d'un immunsérum pentavalent

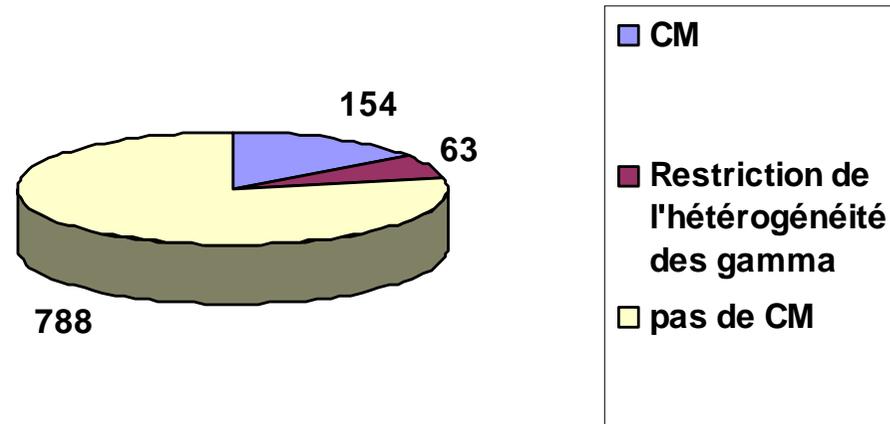


- La firme Sebia a commercialisé un kit le 12 IF Penta
- En raison de son coût, beaucoup de laboratoires ont utilisés une technique « maison »
- Les travaux du Docteur Meunier ont démontré l'utilité de ce type de tests



Cette technique s'impose-t-elle toujours lorsqu'on dispose du Capillarys 2 et du tampon protein(6)?

En 2007, nous avons réalisé en parallèle une électrophorèse sur le Capillarys2 et une fixation en présence d'un immunsérum pentavalent (technique maison) sur les 1005 échantillons correspondant aux demandes de 2 semaines



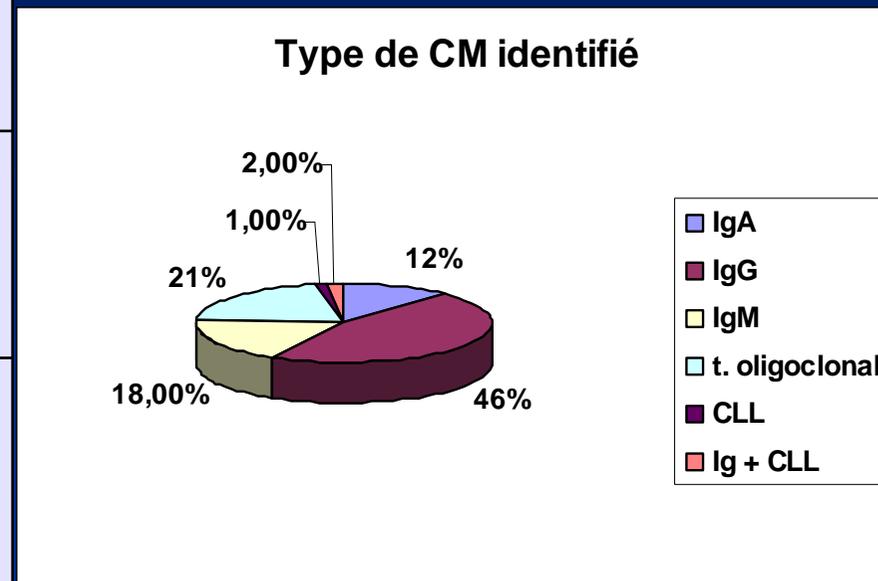
- Parmi ces 154 CM
 - 59% étaient visibles à l'électrophorèse et avec le penta
 - 29% n'étaient visibles qu'avec l'électrophorèse
 - 8,5% ont été détectés grâce au penta
 - 3,5% ont été recherchés sur base d'une antécédent ou d'une découverte dans l'urine

La réalisation d'un penta nous a permis de détecter 13 CM chez 1005 patients!

Les CLL n'étaient visibles ni à l'électrophorèse ni au penta!



	ELECTROPHORESE	PENTA
Spécificité	88%	98%
Sensibilité	86%	67%

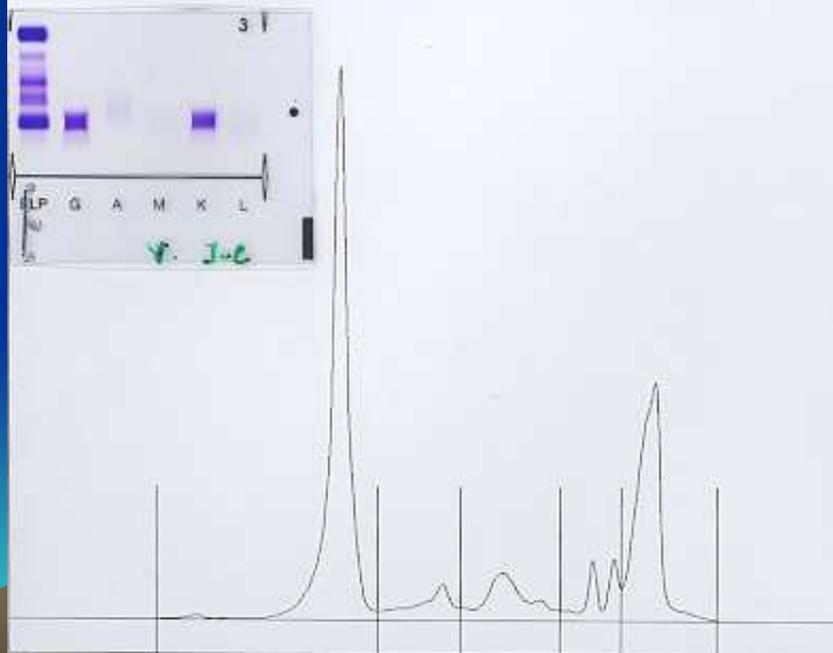
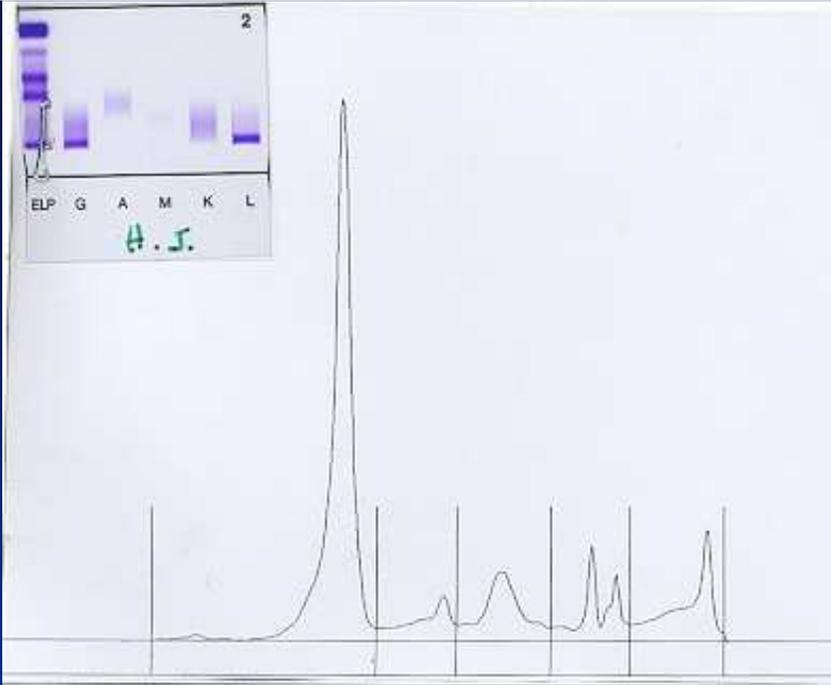


Sur base de ces résultats, nous considérons que la fixation en présence d'un immunsérum pentavalent ne s'impose plus lorsqu'on réalise les analyses avec le Capillarys 2 et le tampon protein 6.

La quantification du pic

- à partir de l'électrophorèse:
estimation du pic monoclonal en % lors de la lecture de l'électrophorèse et calcul de la concentration à partir du dosage des protéines totales
la meilleure à condition que le pic soit bien isolé!
- sur base du dosage des immunoglobulines correspondant au type du CM: correct lorsque les immunoglobulines polyclonales ne sont plus synthétisées ou que leur taux est tout-à-fait stable





- **IgG lambda**
quantification du pic difficile
 - Concentration calculée à partir du pic (6.4%): 4.3g/l
 - Dosage par turbidimétrie: 10.5 g/l
- **IgG kappa**
quantification du pic facile
 - Concentration calculée à partir du pic (26.6%): 20.2 g/l
 - Dosage par turbidimétrie: 21,3g/l

Dilutions successives d'un sérum contenant comme seule immunoglobuline une IgG monoclonale avec un sérum normal: concentrations théoriques et mesurées sur base de l'électrophorèse

Concentrations théoriques de l'IgG monoclonale (g/l)	Prot totales (g/l)	Pic en %	IgG monoclonale estimée à partir du pic (g/l)
97.2	141	55	77.5
48.6	110	38.1	41.9
24.3	92	26.8	24.6
12.1	84	18.6	15.6
6.0	79	12.3	9.7
3.0	77	8.6	6.6
1.5	77	6.7	5.1
0.75	75	4.2	3.1

L'identification de la « bande anormale »: Immuno-fixation ou Immunosoustraction?

- L'immuno-fixation reste la méthode de référence car elle assure un meilleur dépistage des CM que l'immunosoustraction.

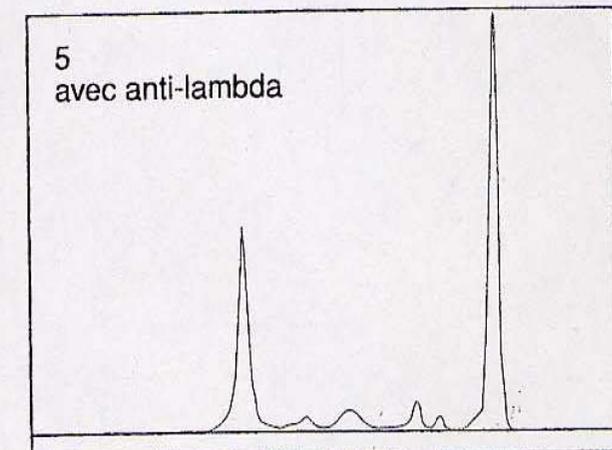
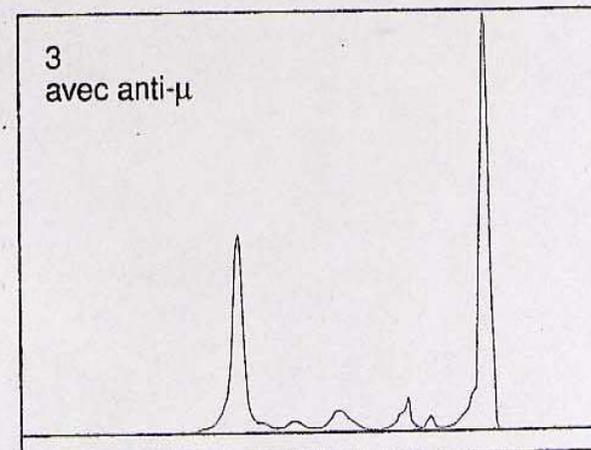
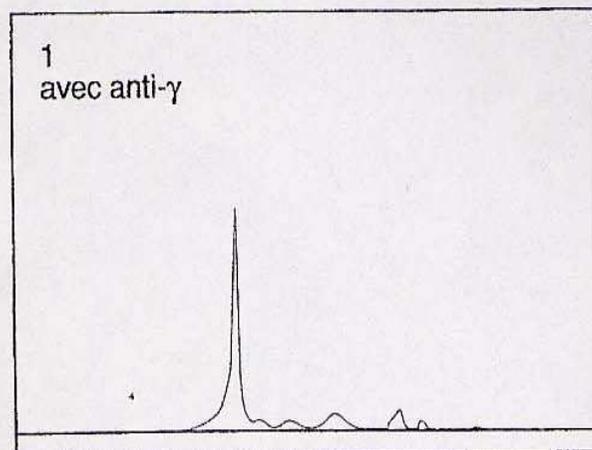
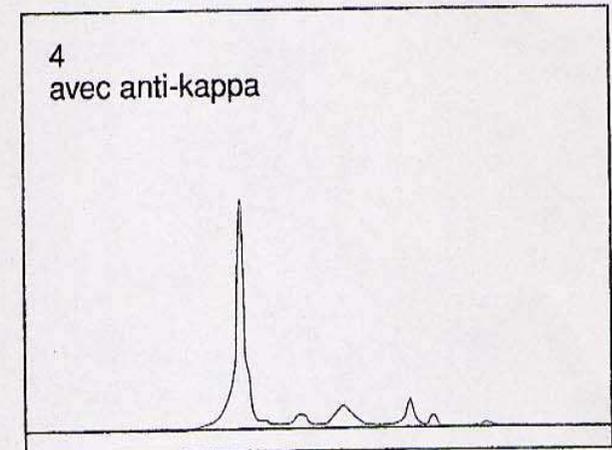
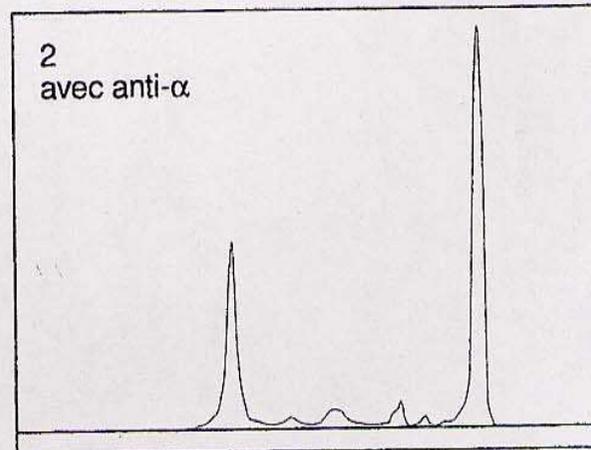
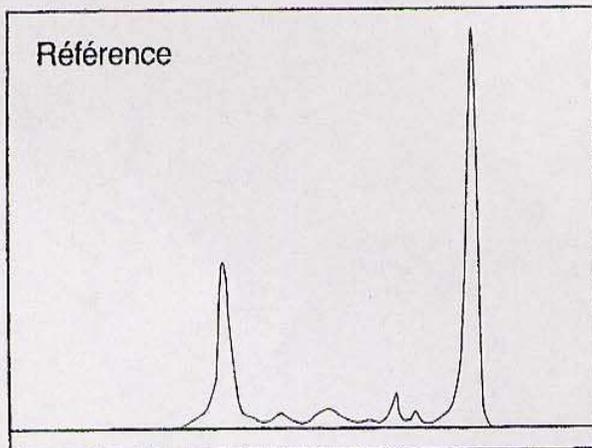
Elle nécessite de nombreuses manipulations (dilution des échantillons, dépôt des immun-sérums, manipulation du gel d'agarose), une certaine expérience (notamment avec le masque dynamique) et ... du matériel (HYDRASYS, HYDRAPLUS)

- L'immunosoustraction présente l'avantage d'être une technique entièrement automatisée sur Capillarys



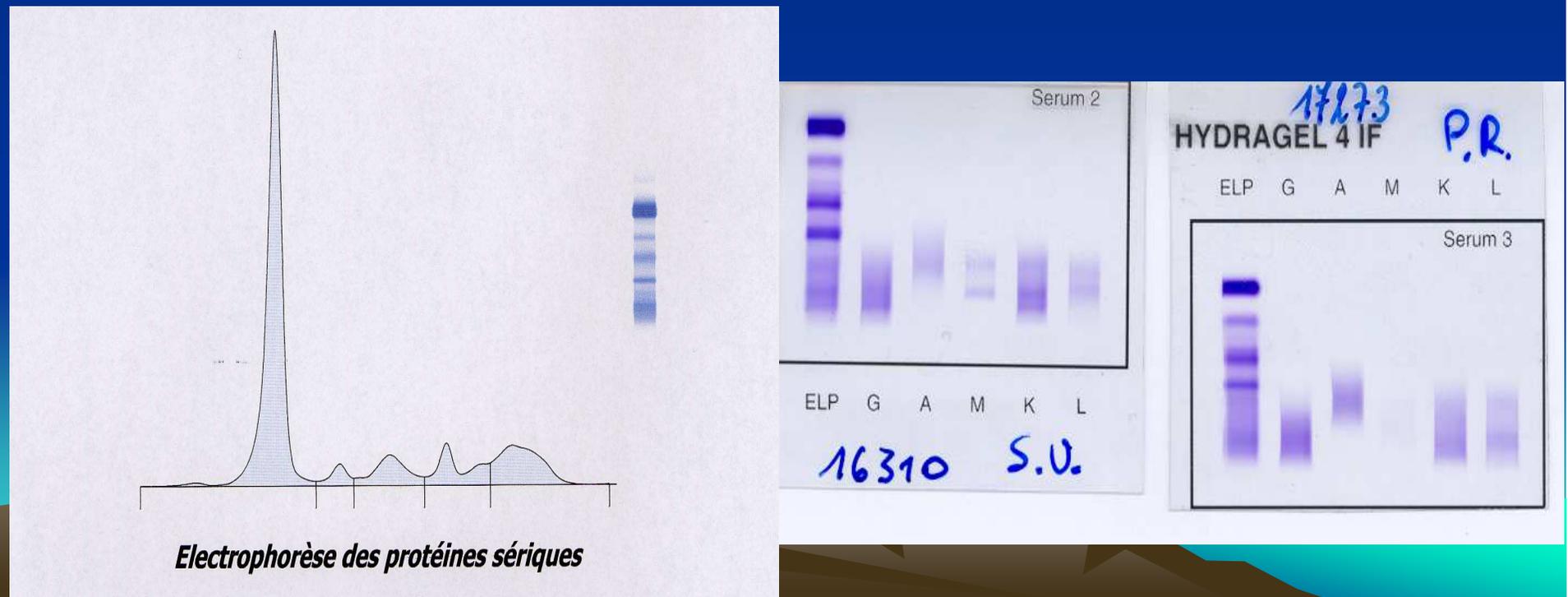
L'immunosoustraction (Immunotyping)

L'immunosoustraction: C. Blessum et J. Bienvenu
(Ann. Biol. Clin. 1999, 57:643-57)



Les deux techniques présentent des difficultés de lecture

- Quand manifestement les gammaglobulines ne sont pas homogènes et qu'on ne peut identifier des bandes nettes, possibilité d'utiliser le commentaire: restriction de l'hétérogénéité des gammaglobulines

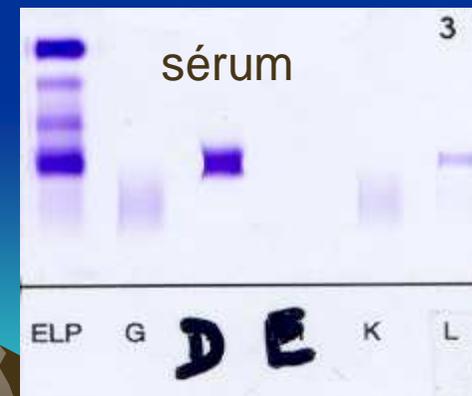
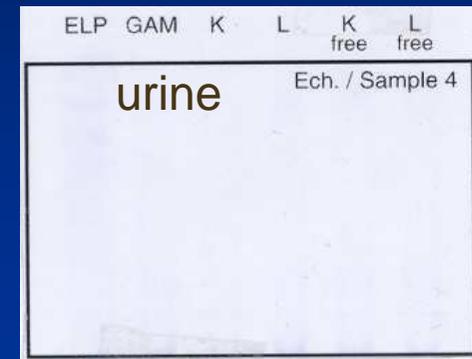
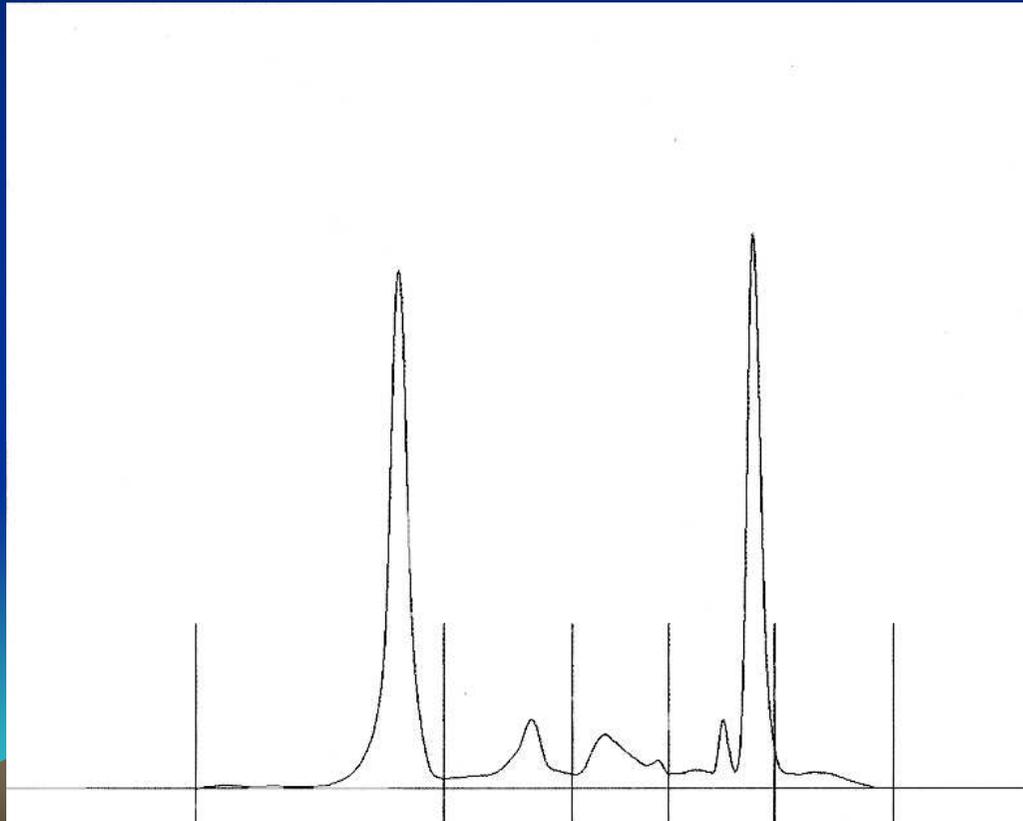


Pour ne pas passer à côté d'un CM à la lecture de l'immunofixation (ou de l'immunosoustraction)

- lors de la réalisation de l'IF, tenir compte de la concentration d'immunoglobulines : diluer d'avantage les échantillons ou éventuellement les déposer non dilués
- ne pas oublier de faire l'anti-D et l'anti-E lorsqu'on observe des chaînes légères



IgD



Le manque de sensibilité de l'immunotypage

X. Bossuyt, Clin Chem Lab Med 2003; 41(6):762-772

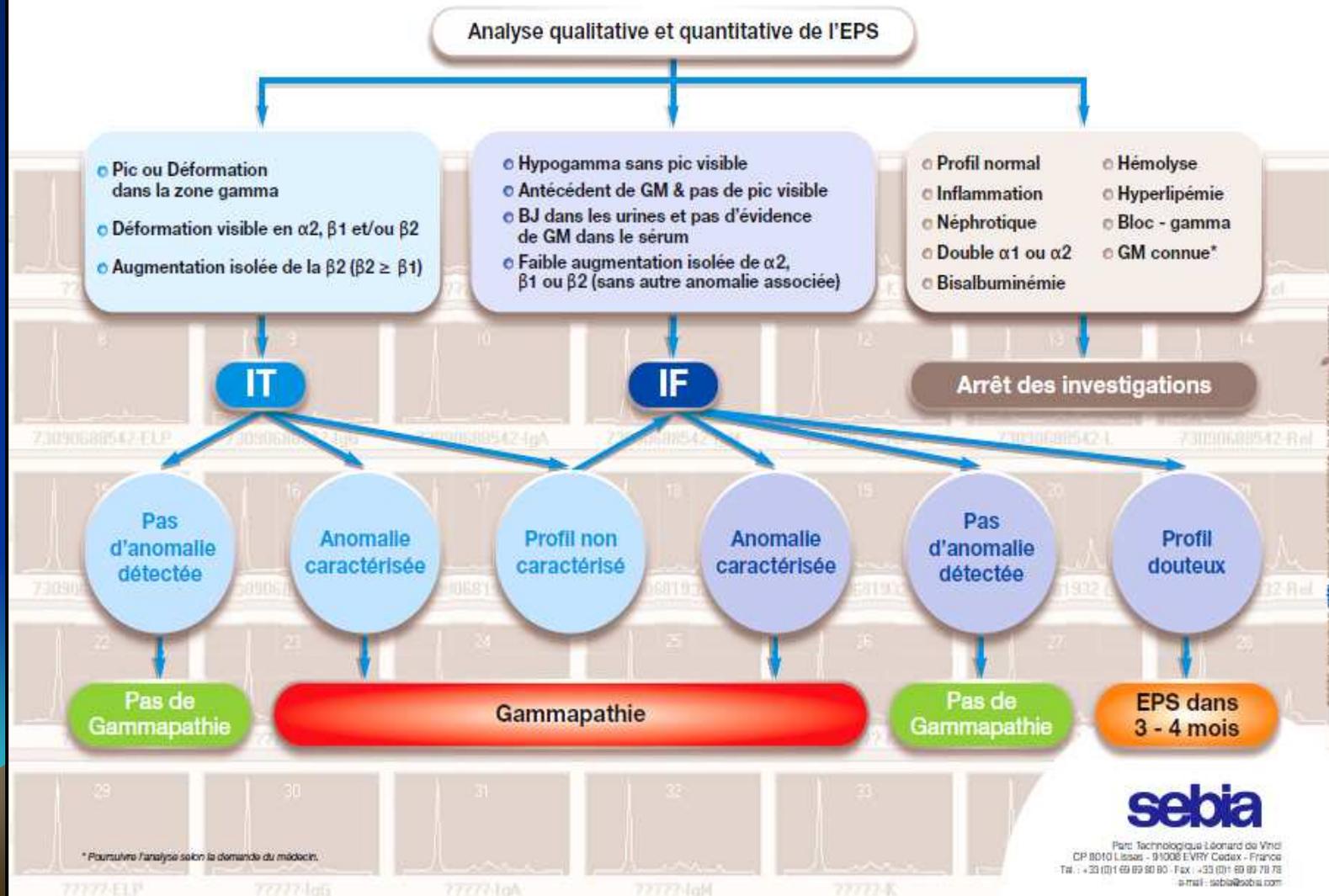
Reference	n	Concentration (g/l)	Full identification	Comment
Bienvenu <i>et al.</i> (5)	403 M-proteins			
	46	>20	98%	
	72	10-20	97%	
	101	5-10	95%	
	127	<5	78%	
	57	Small	44%	
Bossuyt <i>et al.</i> (22)	58 M-proteins			
	12	>30	100%	
	30	10-30	93%	
	6	5-10	83%	
	10	<5	89%	
Katzmann <i>et al.</i> (12)	215 M-proteins		97%	
Litwin <i>et al.</i> (23)	78 M-proteins		60-75% (four readers)	
Meunier (25)	16 multiclonal gammopathy		44%	
	6 M-proteins in α_2		83%	
	43 M-proteins in β		74%	
Smalley <i>et al.</i> (30)				6% of sequential CZE immunosubtraction studies needed to be tested by immunofixation

- L'IT permet la détection:
 - des CM dont la concentration est $>10\text{g/l}$
 - de seulement 50% des pics moins importants
- L'IT ne permet pas la détection :
 - des chaînes légères
 - L'identification des pics bi ou oligoclonaux



Proposition de la firme Sebia: un arbre décisionnel permettant de choisir une de ces deux méthodes

Stratégie d'investigation des gammopathies monoclonales



- Pic ou Déformation dans la zone gamma
- Déformation visible en $\alpha 2$, $\beta 1$ et/ou $\beta 2$
- Augmentation isolée de la $\beta 2$ ($\beta 2 \geq \beta 1$)

IT

- Hypogamma sans pic visible
- Antécédent de GM & pas de pic visible
- BJ dans les urines et pas d'évidence de GM dans le sérum
- Faible augmentation isolée de $\alpha 2$, $\beta 1$ ou $\beta 2$ (sans autre anomalie associée)

IF

- Profil normal
- Inflammation
- Néphrotique
- Double $\alpha 1$ ou $\alpha 2$
- Bisalbuminémie
- Hémolyse
- Hyperlipémie
- Bloc - gamma
- GM connue*

Arrêt des investigations

Une étude réalisée à la Citadelle à la demande de la firme Sebia en janvier 2010

- 106 échantillons ont été analysés en IF et en IT
- Ils ont été sélectionnés par le technicien responsable du poste sur base de l'existence d'un pic net en β ou en γ ou d'une déformation de la zone γ . Dans notre laboratoire, la découverte de ce type d'anomalie génère la réalisation d'une IF.
- Les échantillons sans anomalie au tracé mais avec antériorité connue n'ont pas été analysés en IT.
- Les IF ont été lues par une seule personne.
- Les IT ont été examinées par une spécialiste de la firme Sebia et deux débutantes
- Les résultats ont été classés en deux groupes en fonction de l'anomalie observée à l'électrophorèse

- 1) Les échantillons caractérisés par la présence d'un pic bien individualisé en β ou en γ (57 échantillons)
 - Tous ces échantillons contenaient un CM à l'exception de 2 échantillons contaminés par un produit de contraste
 - Les résultats IF/IT sont concordants pour 43 échantillons (75%): 41 CM et 2 interférences dues à un produit de contraste
 - Les discordances sans gravité réelle:
 - petites bandes secondaires vues en IF et pas en IT (7)
 - petites bandes secondaires vues en IT et pas en IF (3)
 - 3 identifications différentes pour des bandes secondaires
 - **Mais** 2 IgG lambda et 1 IgG kappa étaient associées à des CLL monoclonales: ces CLL ne sont pas identifiables à l'IT !

- Les données de ces patients

- *Une IgG $\lambda + \lambda$:

- pic IgG λ : 14.6 g/l

- CLL λ : 300 mg/l

- *Une IgG $\lambda + \lambda$:

- pic IgG λ : 9.3 g/l

- CLL λ : 67 mg/l

- *Une IgG $\kappa + \kappa$:

- pic IgG κ : 27.2 g/l

- CLL κ : 3500 mg/l

Expert de la firme versus une débutante en IT:

La débutante n'ose pas se prononcer pour 3 cas (1 cas: produit de contraste) et ne rend pas le même résultat que l'expert dans 4 autres cas (1 petite bande pas vue et une lecture différente dans 3 cas): (12% d'échec)



2) Les échantillons caractérisés par simple déformation des gamma: 49 cas

- 34 de ces échantillons contenaient un CM identifiés avec l'une ou l'autre des deux techniques, 24 en IF + 10 autres à l'IT
- Corrélation IF/IT: 27 réponses identiques dont 12 identifications de CM (55%)
- Les discordances :22 cas (45%)
 - bandes vues uniquement en IT :10, principalement des IgG
 - bandes vues uniquement en l'IF: 4, principalement des IgM
 - des identifications différentes (IgM en IF et IgG en IT): 3



Expert de la firme versus débutante en IT:

- la débutante n'ose pas se prononcer dans 12 cas (24%) dont 3 échantillons avec CM
- la lecture est identique à celle de l'expert dans 25 cas (51%) dont 18 avec CM (37%)
- les discordances (24%): la débutante identifie 3 CM (6%) de plus que l'expert, n'identifie que 1 CM a lieu de 2 dans 6 cas (12%) et donne une identification différente dans 3 cas (6%)



En 2001, commercialisation du kit Freelite
par la firme Binding Site: on peut enfin doser
dans le sang le premier marqueur tumoral
découvert, la protéine de Bence Jones



- La protéine « thermosoluble » a été observée pour première fois en 1845 par les docteurs MacIntyre et Watson chez un patient de 45 ans, Monsieur McBean. C'est le Docteur Henry Bence Jones qui la fait connaître
- En 1909, on identifie son origine: les plasmocytes médullaires
- En 1922, Bayne-Jones et Wilson constatent en injectant des urines de patients à des lapins qu'il y a deux protéines de Bence Jones différentes
- En 1956, Korngold et Lapiri démontrent que les immunsérums dirigés contre les protéines de Bence Jones réagissent également avec les protéines observées chez les patients atteints de myélome: les deux protéines ont été appelées κ et λ
- En 1962, Edelman et Gally démontrent que les chaînes légères issues de protéines monoclonales sont identiques à la protéine de Bence-Jones

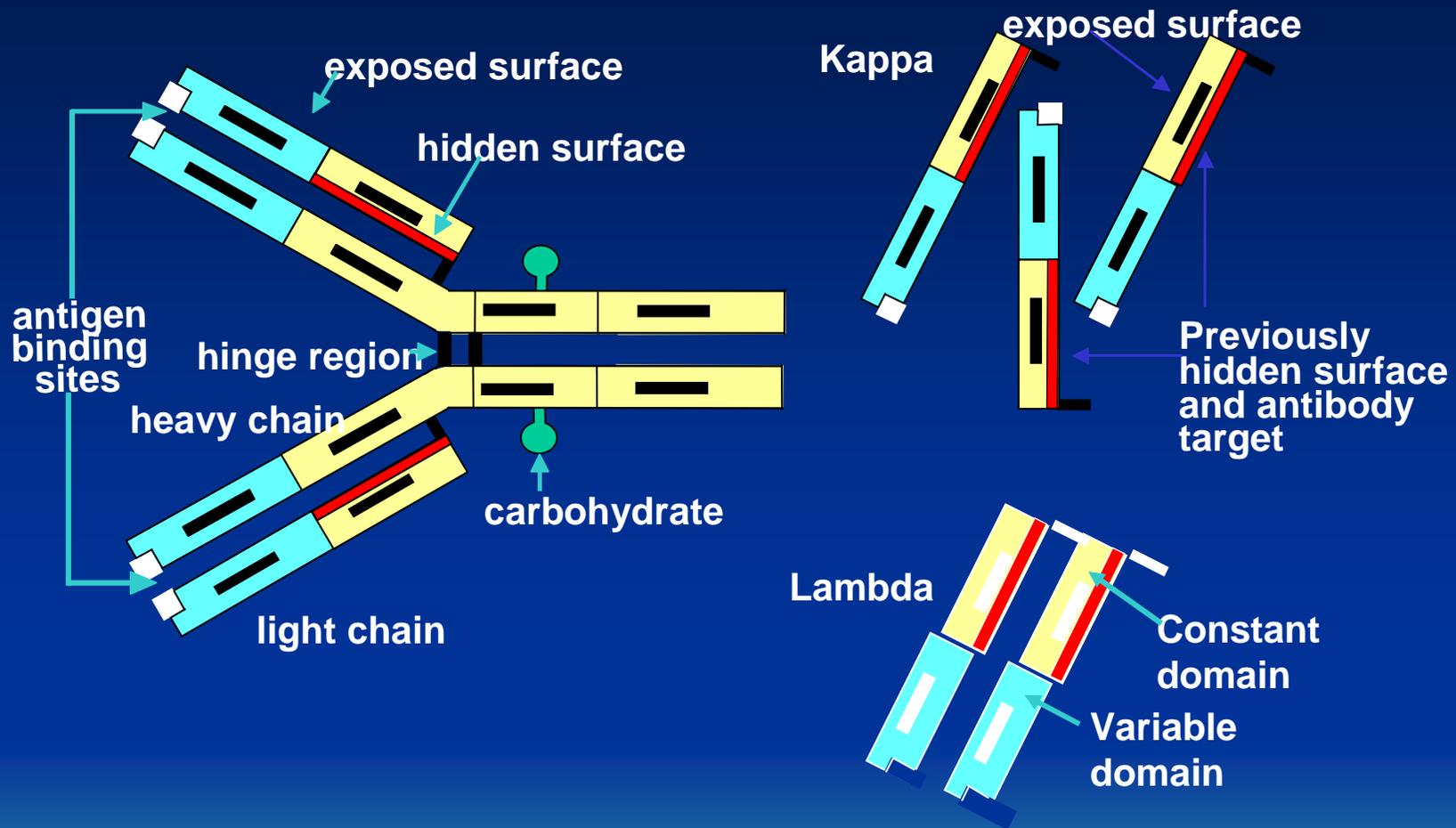
Le kit Freelite

- Ce kit permet le dosage des chaînes légères libres (CLL) dans le sérum
- Ce test apporte une grande aide au diagnostic, et au suivi thérapeutique des hémopathies malignes caractérisées par la présence d'une immunoglobuline monoclonale
- Ce test peut aider à évaluer le pronostic des MGUS
- Le dosage des CLL est remboursé par l'INAMI depuis le 1/11/2009 dans le myélome à chaînes légères, le myélome non sécrétant et l'amylose



- Le réactif contient des particules de latex sensibilisées avec un immunsérum capable de reconnaître les épitopes des CLL qui sont cachés lorsqu'elles sont liées aux chaînes lourdes
- L'immunsérum est obtenu en immunisant des chèvres avec des protéines de Bence Jones et en purifiant ces immunsérums avec des immunoglobulines
- Le réactif permet le dosage de très petites quantités de CLL dans le sérum et dans l'urine et réagit aussi bien avec les monomères de CLL qu'avec leurs dimères et leurs polymères
- Le kit comprend un standard et des contrôles
- La technique peut être adaptée à différents automates réalisant des dosages néphélométriques ou turbidimétriques





An antibody molecule showing the heavy and light chain structure, together with free κ and λ

Le métabolisme des chaînes légères libres



Les CLL dans le sérum

- Les cellules B et les plasmocytes synthétisent toujours un excès de chaînes légères par rapport aux chaînes lourdes. Ces CLL sont polyclonales et leur taux sérique est faible.
- Elles sont présentes sous forme mono et dimérique, mais peuvent constituer des complexes plus importants, notamment se fixer sur l'alpha1 antitrypsine
- Ces CLL sont filtrées au niveau glomérulaire: la clairance des chaînes kappa monomériques est supérieure à la clairance des lambda dimériques
- Valeurs de référence des CLL dans le sérum (d'après Katzmann):
 - 3.3 à 19.4 mg/l pour les kappa
 - 5.7 à 26.3 mg/l pour les lambda
 - le rapport κ/λ : 0.26 à 1.65

Les CLL dans l'urine

- Les CLL qui ont traversé le glomérule sont catabolisées au niveau tubulaire; les CLL retrouvées dans l'urine sont principalement d'origine urétrale:

kappa: 1.35 à 24.19 mg/l

lambda: 5.71 à 26.3 mg/l

le rapport κ/λ : 2.04 à 10.37

- En cas d'atteinte rénale tubulaire:
la concentration des CLL augmente dans l'urine puisque les tubules ne sont plus capables de les cataboliser.

ces chaînes sont polyclonales

le rapport κ/λ : 2.04 à 10.37



Augmentation des CLL en dehors des proliférations lymphocytaires B

La concentration des CLL augmente :

- avec l'âge (diminution physiologique du DFG)
→ le rapport κ/λ est toujours: 0.26 à 1.65
- dans l'IR avec atteinte glomérulaire
→ le rapport κ/λ est toujours: 0.26 à 1.65
toutefois, en cas d'IR importante et chez le patient dialysé, le rapport est légèrement augmenté:
→ le rapport κ/λ est: 0.3 à 3.3
- Lors de stimulations du système immunitaire entraînant une synthèse accrue d'immunoglobulines
→ le rapport κ/λ est toujours: 0.26 à 1.65
une augmentation de ce rapport a toutefois été décrite
On peut observer une augmentation des CLL dans l'urine (protéinurie de surcharge)
→ leur rapport κ/λ urinaire est normal: 2.04 à 10.37

Les chaînes légères libres dans le sérum lors d'une production monoclonale

- Des quantités importantes d'un seul type de CLL sont produites (10 à 30 g/jour).
- Les capacité de filtration des glomérules sont rapidement dépassées et cette CLL monoclonale s'accumule dans le sérum
- L'existence de CLL monoclonale est déduite d'une anomalie dans le rapport κ/λ
 - < 0.26 : présence de chaînes lambda monoclonales
 - > 1.65 : présence de chaînes kappa monoclonales
- En cas d'insuffisance rénale importante et chez le patient dialysé, on augmente la spécificité du test en utilisant le rapport:

0.3 à 3.3



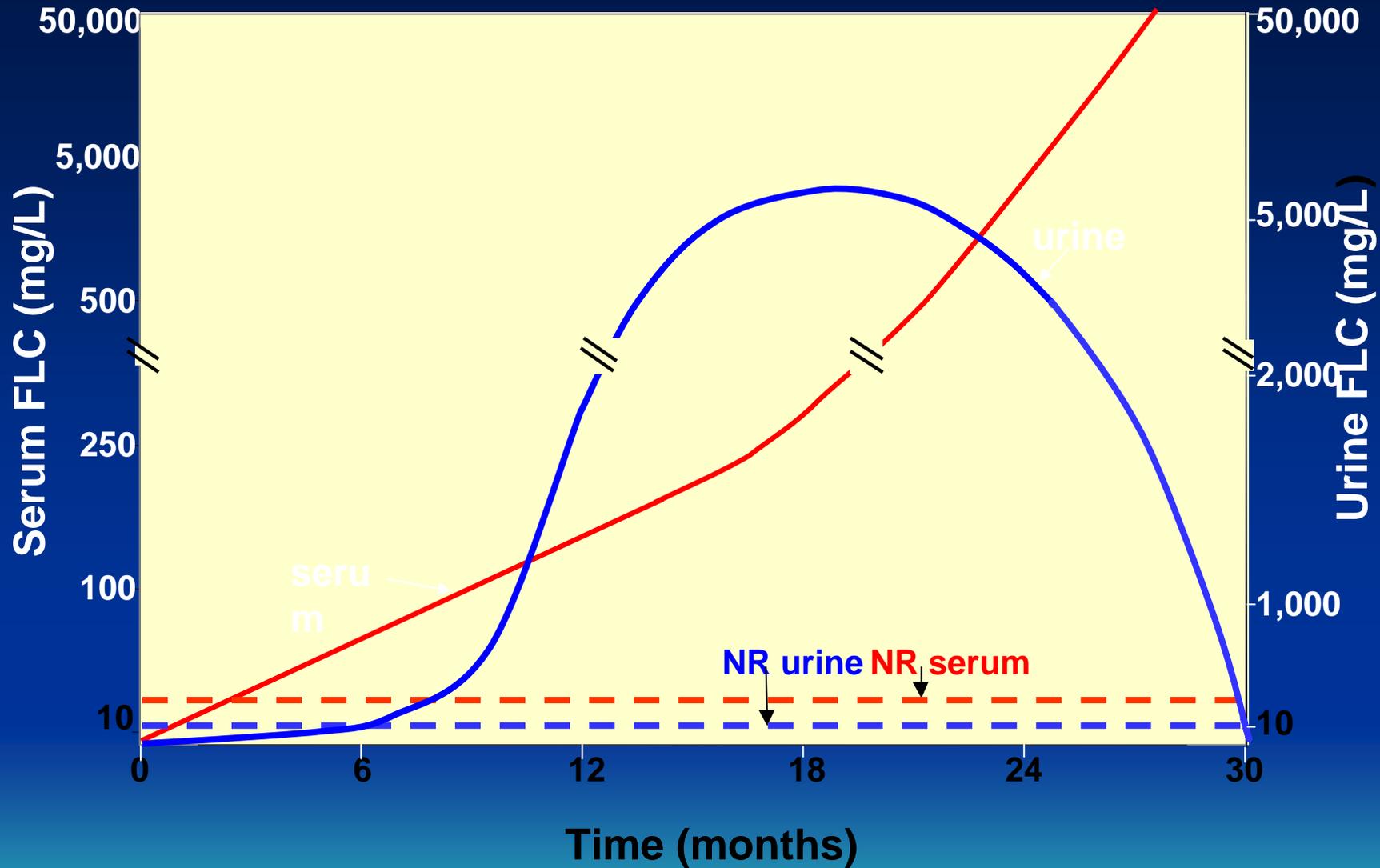
Les chaînes légères libres dans l'urine en cas de production monoclonale

- des quantités importantes de CLL monoclonales doivent être réabsorbées par les tubules rénaux: la capacité de réabsorption du tube proximal est vite dépassée
- Les CL monoclonales sont décelables dans l'urine par immunofixation (IF) et le rapport κ/λ de l'urine devient anormal
- Les tubules ne peuvent plus réabsorber les CLL des clones normaux et on observe des CLL polyclonales en plus des CLL monoclonales à l'IF



- les chaînes légères non catabolisées au niveau du tube proximal se combinent à l'uromucoïde (protéine de Tamm et Horsfall) et précipitent dans les tubes distaux sous forme de cylindres. Elles détruisent le néphron.
- En raison de l'altération d'un nombre de plus en plus élevé de néphrons, le débit de filtration glomérulaire s'effondre et une insuffisance rénale aiguë peut s'instaurer.
- En cas d'insuffisance rénale grave, la concentration des chaînes légères dans l'urine diminue alors qu'elle explose au niveau sérique

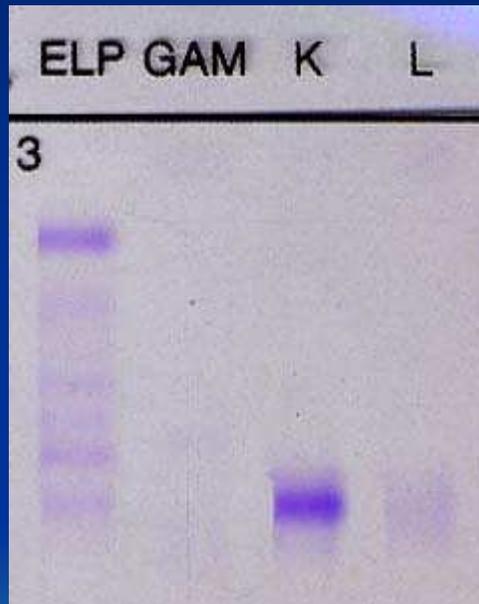




- Le dosage des CLL dans l'urine est un très mauvais indicateur de la masse tumorale : dans certains cas, la quantité de CLL libre dans l'urine est d'avantage tributaire de la fonction rénale résiduelle que la production de CLL elle-même
- Le rapport κ/λ déterminé sur urine est également peu fiable en raison de la présence concomitante de chaînes monoclonales et de chaînes polyclonales



La patiente est dialysée à cause de cette CLL monoclonale



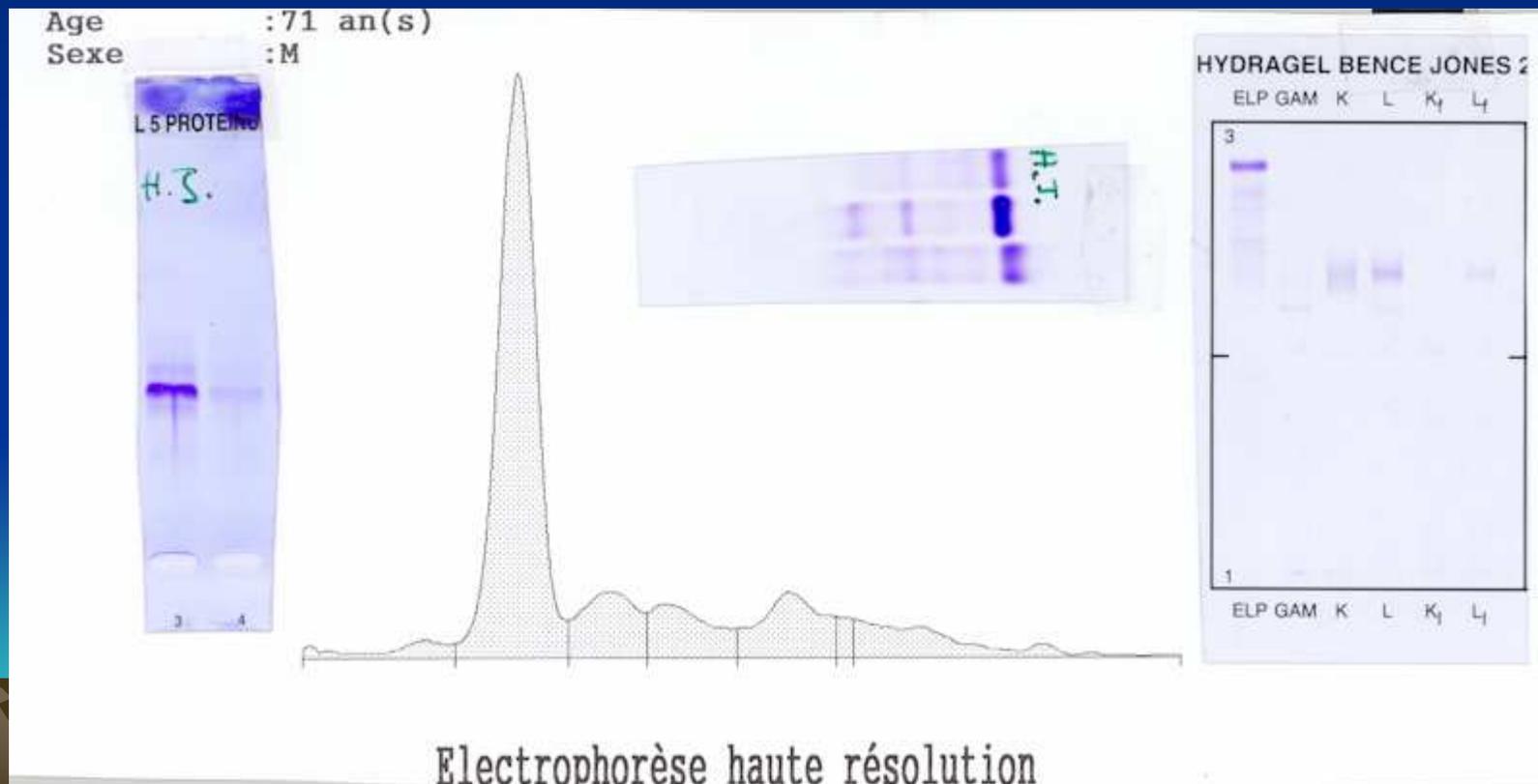
- Sérum:
 - IgA kappa non quantifiable
 - CLL κ : 292 mg/l
 - CLL λ : 59.8 mg/l
- Urine:
 - CLL κ : 402 mg/l
soit 1246 mg/24H
 - CLL λ : 38.8 mg/l

Lorsque le rapport κ/λ ne signifie rien ...

kappa polyclonales: 45,9 mg/l

lambda monoclonales: 20,5 mg/l

Rapport kappa/lambda : 2,24 normal



Les anomalies quantitatives des CLL sur sérum et sur urine ne sont pas corrélées (Clinical Cancer Res 2005,11(24):8706-8714)

Soit 131 patients: 82 avec CLL à l'IF sur urine
49 sans CLL

- Valeurs de κ sériques observées lorsque:
 - κ visibles à l'IF: 7 à 39.500; moyenne: 113 mg/l
 - κ non visibles à l'IF : 6 à 710; moyenne: 40 mg/l
- Valeur des λ sériques observées lorsque:
 - λ visible à l'IF : 5 à 7.060; moyenne: 278 mg/l
 - λ non visibles à l'IF: 3 à 561; moyenne: 44 mg/l

Lorsqu'il s'agit de chaînes λ , il faut un taux sérique beaucoup plus élevé de ces chaînes que lorsqu'il s'agit de chaînes κ pour pouvoir observer des CLL dans l'urine car ces λ polymérisées passent beaucoup plus difficilement à travers le glomérule

Un cas clinique prouvant cette discordance

- En août 2003, une patiente âgée de 68 ans, suivie pour un myélome à chaînes légères lambda depuis 1999, doit subir des plasmaphérèses en raison de l'altération de sa fonction rénale.
- Le clinicien nous demande un dosage des chaînes légères libres qui démontre la discordance entre les chaînes légères dans l'urine et le sérum
- Avant la plasmaphérèse, la concentration des λ sériques est très élevée, elle chute grâce à la plasmaphérèse; par contre, dans l'urine, on observe une nette augmentation des λ en raison de l'amélioration de la fonction rénale qui permet une excrétion accrue de chaînes libres dans l'urine
- Nous réalisons en parallèle l'ancien test, le dosage des kappa et lambda totales (libres et liées), les résultats démontrent combien le test traditionnel est peu contributif

En rouge: valeurs élevées (<2g/l pour λ), en vert: valeurs basses, en noir:valeurs normales

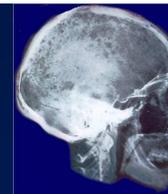
le 1/9/2003: IgG kappa en plus des chaînes lambda à l'IF

	Test traditionnel			Freelite		urines: κ et λ totales	
	κ tot.(g/l)	λ tot.(g/l)	κ/λ	free κ (mg/l)	free λ (mg/l)	kappa (mg/24H)	lambda
28-juil	1,29	1,39	0,93	10,4	5520		
22-août	1,57	2,39	0,65	25,4	8520		
24-août						30,69	1051
PLASMAPHERESE							
25-août	0,72	3,18	0,22	20,1	6700	37,8	1512
26-août	0,42	2,38	0,18	18,9	6260	34,3	2804
27-août						25,5	2186
28-août						24	3900
29-août	0,27	2,12	0,13	26,3	5650	35,38	2360
30-août						25,6	3756
31-août						15,24	1344
1-sept	0,53	2,2	0,24	75	5490	44	2200

Conclusions:

- Pour le dépistage des CLL monoclonales et le suivi thérapeutique: c'est dans le sang qu'il faut faire le dosage !
- Pour dépister les CLL monoclonales, il faut se baser sur une anomalie du rapport κ/λ
- Pour suivre l'évolution de la maladie et assurer le suivi thérapeutique, il faut se baser sur la concentration de la CLL monoclonale, pas sur le rapport entre les CLL
- Le dosage des chaînes légères dans l'urine doit être déconseillé!





Le dépistage des CLL monoclonales

- Un rapport kappa/lambda anormal permet d'établir la présence de CLL monoclonales dans de nombreuses hémopathies malignes: myélomes à chaînes légères, myélomes « non sécrétants », amylose AL, maladie de Waldenström, les plasmocytomes, la LLC, les lymphomes non Hodgkiniens...
- Ces CLL monoclonales ne sont pas toujours visibles à l'IF encore moins à l'électrophorèse

Le « papillon » du Binding Site

- Le corps est constitué par les rapports κ/λ normaux des individus non malades, des insuffisants rénaux sans CM, des hypergammaglobulinémies polyclonales
- Les ailes correspondent aux rapports κ/λ des patients qui présentent des myélomes à chaînes légères, aux amyloïdoses et aux autres hémopathies malignes

Légende des illustrations:

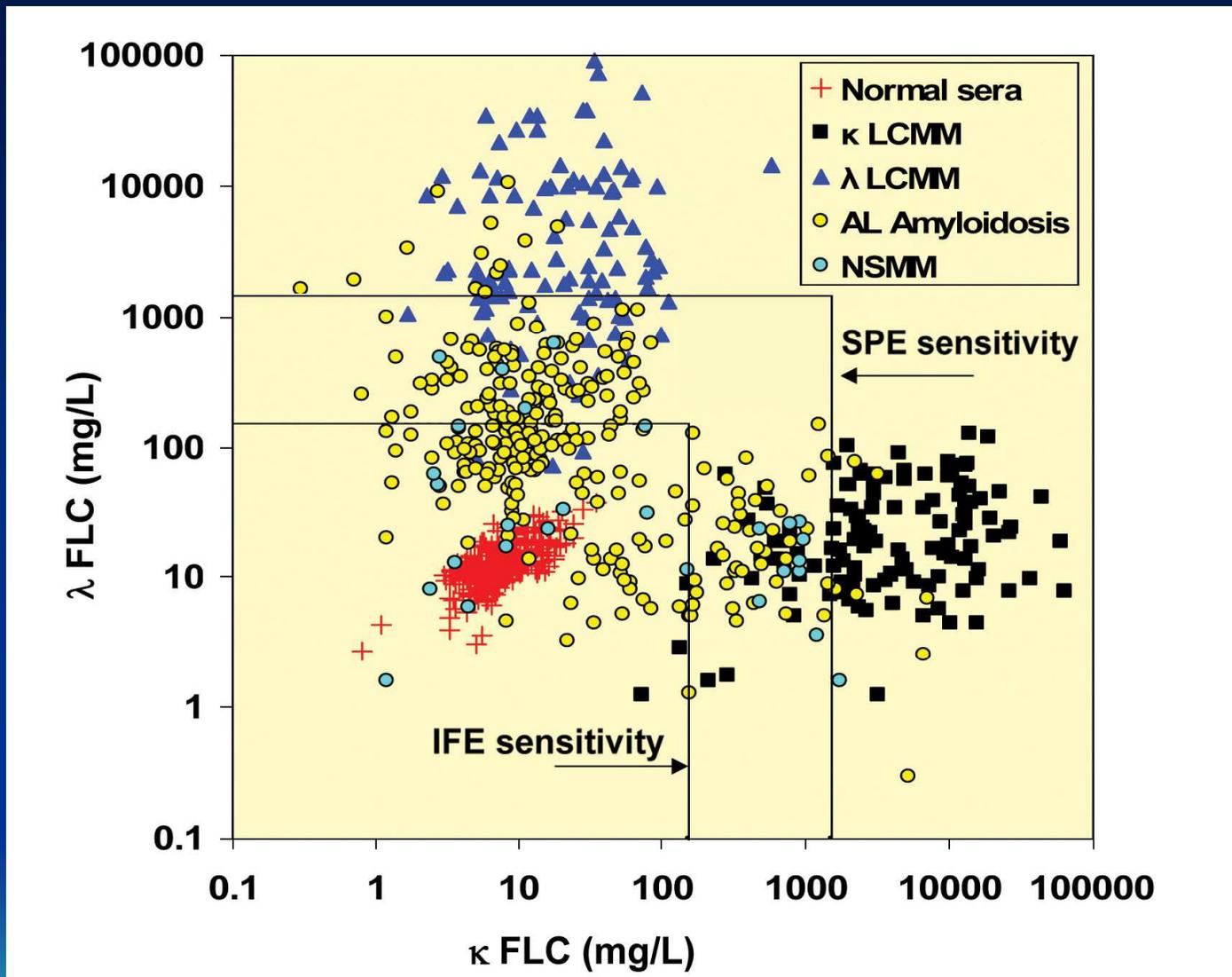
LCMM: light chain multiple myeloma

IIMM: intact immunoglobulin multiple myeloma

High plgG: polyclonal hypergammaglobulinaemia

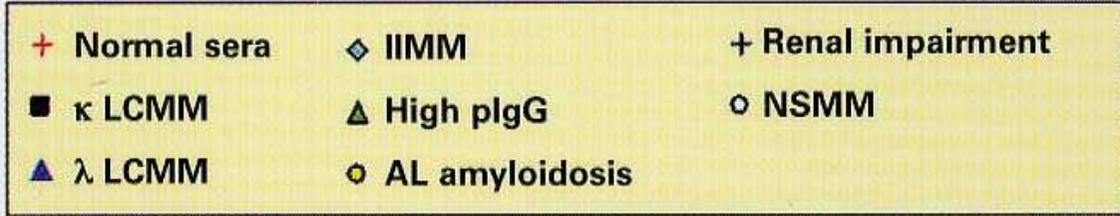
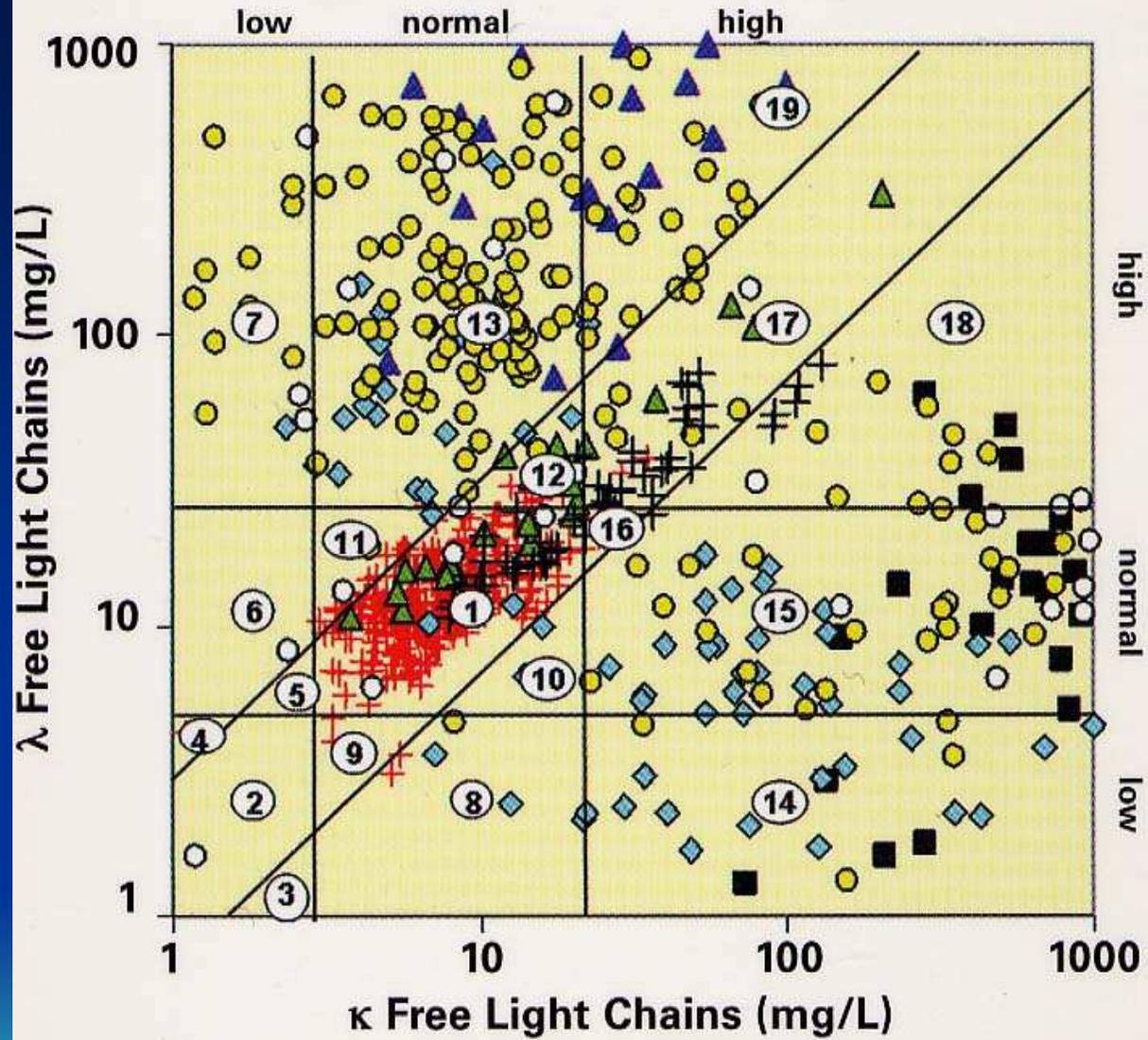
NSMM: nonsecretory multiple myeloma





Serum FLCs in 262 patients with AL amyloidosis at diagnosis, 282 normal sera, 224 patients with LCMM and 28 patients with NSMM.

Tous les cas



La légende

Sector	Kappa	Lambda	κ/λ Ratio	Interpretation
1	Normal	Normal	Normal	Normal serum
2	Low	Low	Normal	BM suppression without MG
3			High	Monoclonal Gammopathy
4			Low	
5			Normal	Normal
6		Low		
7		High	Low	Monoclonal Gammopathy
8		Normal	Low	High
9	Normal			Normal serum
10	Normal		High	Monoclonal Gammopathy
11			Low	
12	High		Normal	plg or renal impairment
13			Low	Monoclonal Gammopathy
14	High	Low	High	Monoclonal Gammopathy
15			Normal	High
16		High	Normal	plg or renal impairment
17			Normal	
18			High	MG with renal impairment
19			Low	

 With bone marrow (BM) suppression

 Without bone marrow (BM) suppression

MG = Monoclonal Gammopathy plg = Polyclonal Immunoglobulin

Chaines légères dans le myélome

- Le rapport κ/λ est anormal dans 96% des myélomes à immunoglobuline intacte
- Le rapport κ/λ est anormal dans 100% des myélomes à chaines légères
- Le rapport κ/λ est anormal dans 70% des myélomes dit non sécrétants



Chaînes légères dans le contrôle de l'efficacité thérapeutique du myélome à chaînes légères et du myélome non sécrétant

- Auparavant, la réalisation d'une ponction médullaire était indispensable en cas de myélome non sécrétant et de myélome à chaînes légères en raison de la faible fiabilité des analyses urinaires
- Actuellement, le suivi du traitement peut être assuré sur base de la chaîne légère monoclonale
- Le dosage des chaînes légères est remboursé par l'INAMI dans ces deux cas



Le myélome à protéine intacte: contrôle de l'efficacité thérapeutique

- La réponse de la tumeur au traitement est basée sur la chute du CM: réponse partielle si chute du CM $>50\%$ dans le sang et $>90\%$ dans l'urine (ou chaînes libres $<200\text{mg}/24\text{H}$) pendant 6 semaines
- Réponse complète lorsqu'on n'observe plus de CM à l'IF du sérum et de l'urine et que la plasmocytose médullaire est $<5\%$
- Le dosage de la chaîne libre dans le myélome à protéine intacte peut se révéler utile car l'impact du traitement se manifeste beaucoup plus rapidement sur la chaîne légère dont la demi-vie est plus courte
- Le dosage n'est pas encore recommandé systématiquement dans les consensus ni remboursé par l'INAMI

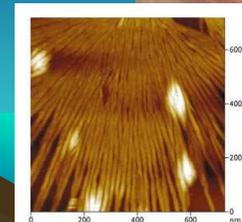
Les chaînes légères et le pronostic du myélome:

- Différentes études ont établi qu'un rapport κ/λ :
 <0.03 et >32
serait d'un mauvais pronostic dans les différents types de myélome (de même pour les plasmocytomes, l'amylose et les MGUS...)
- Ces rapports seraient associés à des translocations secondaires correspondant à une grande instabilité chromosomique de mauvais pronostic et à un myélome plus agressif

Ceci n'est pas encore reconnu par les consensus

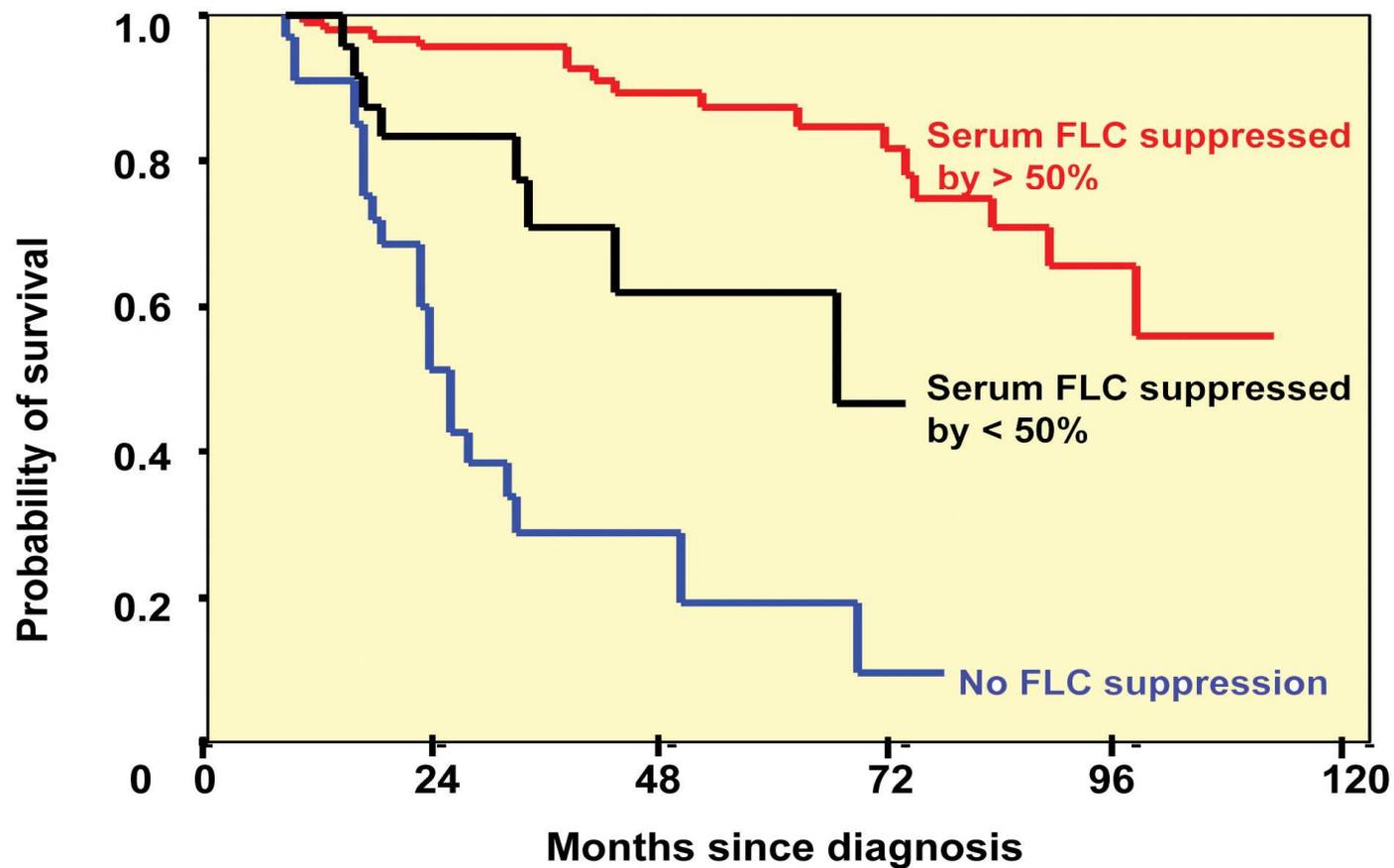
L'amylose: la maladie et son diagnostic

- L'amylose est une maladie rare caractérisée par des dépôts extracellulaires d'une protéine fibrillaire dont la composition est différente suivant la nature de la protéine responsable de sa formation (amylose AL, amylose à SAA, à bêta2microglobuline, à transthyrétine...). Elle peut être locale ou systémique.
- L'amylose AL est une amylose systémique secondaire à la synthèse d'une chaîne légère, souvent lambda, monoclonale
- Les patients souffrent de décompensation cardiaque, d'insuffisance rénale, mais aussi de troubles dermatologiques et neurologiques
- C'est une maladie de mauvais pronostic dont le traitement est semblable à celui du myélome



Les chaînes légères dans l'amylose: le diagnostic et le contrôle de l'efficacité du traitement

- Au moment du diagnostic, un CM est détecté par électrophorèse sérique ou urinaire dans moins de 50 % des cas. Lorsqu'on y associe le dosage sérique des CLL, un résultat anormal est observée chez 97% des patients
- Le *UK myeloma forum AL amyloidosis guidelines working group* a recommandé de réaliser le dosage des CLL sériques en complément des tests traditionnels au moment du diagnostic et le dosage isolé des CLL sériques au cours du suivi.
- On observe un meilleur taux de survie lorsque le taux de CLL diminue de plus de 50 % : les dépôts de substance amyloïde se stabilisent et même parfois régressent. L'état général du patient s'améliore.
- Ce test est remboursé par l'INAMI



Probability of survival in 137 patients with AL amyloidosis showing that a reduction of sFLCs by greater than 50% following chemotherapy was associated with increased survival. (Courtesy of PN Hawkins).

MGUS: le diagnostic

Le diagnostic de MGUS est établi sur une série de critères, biologiques et cliniques, d'exclusion d'une pathologie tumorale:

- CM <30 g/l,
- <10% de plasmocytes dans la moelle
- pas de lésions lytiques, pas d'anémie, pas d'hypercalcémie, pas d'insuffisance rénale liée à la prolifération clonale
- Pas de preuve de prolifération d'un clone cellulaire B, d'amyloïdose, d'altération d'organe suite à des dépôts de chaînes légères ou lourdes...



- Les patients asymptomatiques ne doivent pas être traités, mais ils doivent subir une surveillance intensive à vie
- L'attitude du clinicien et le caractère plus ou moins invasif de la surveillance (moelle) doit dépendre de l'âge du patient
- La prévalence de MGUS augmente avec l'âge Une étude épidémiologique réalisée chez les 21.463 habitants âgés de plus de 50 ans habitant une bourgade du Minnesota (qui comptait 28.038 habitants) montre que la prévalence de MGUS est de 3.2% après 50 ans La fréquence augmente avec l'âge et est plus élevée chez l'homme (Kyle R et al. N Engl J Med 2006;354:1362-1369).



Le pronostic des MGUS

- L'analyse cytogénétique permettra dans l'avenir de mieux cibler les patients à haut risque de transformation maligne
- Sur base de tests biochimiques, on a défini 3 facteurs de risque de transformation maligne:
 - un CM > 15g/l
 - un CM autre qu'une IgG
 - un rapport kappa/lambda anormal
- La présence d'une protéine de Bence Jones en faible concentration dans l'urine et une production réduite des immunoglobulines polyclonales ne semble pas être des indices de malignité



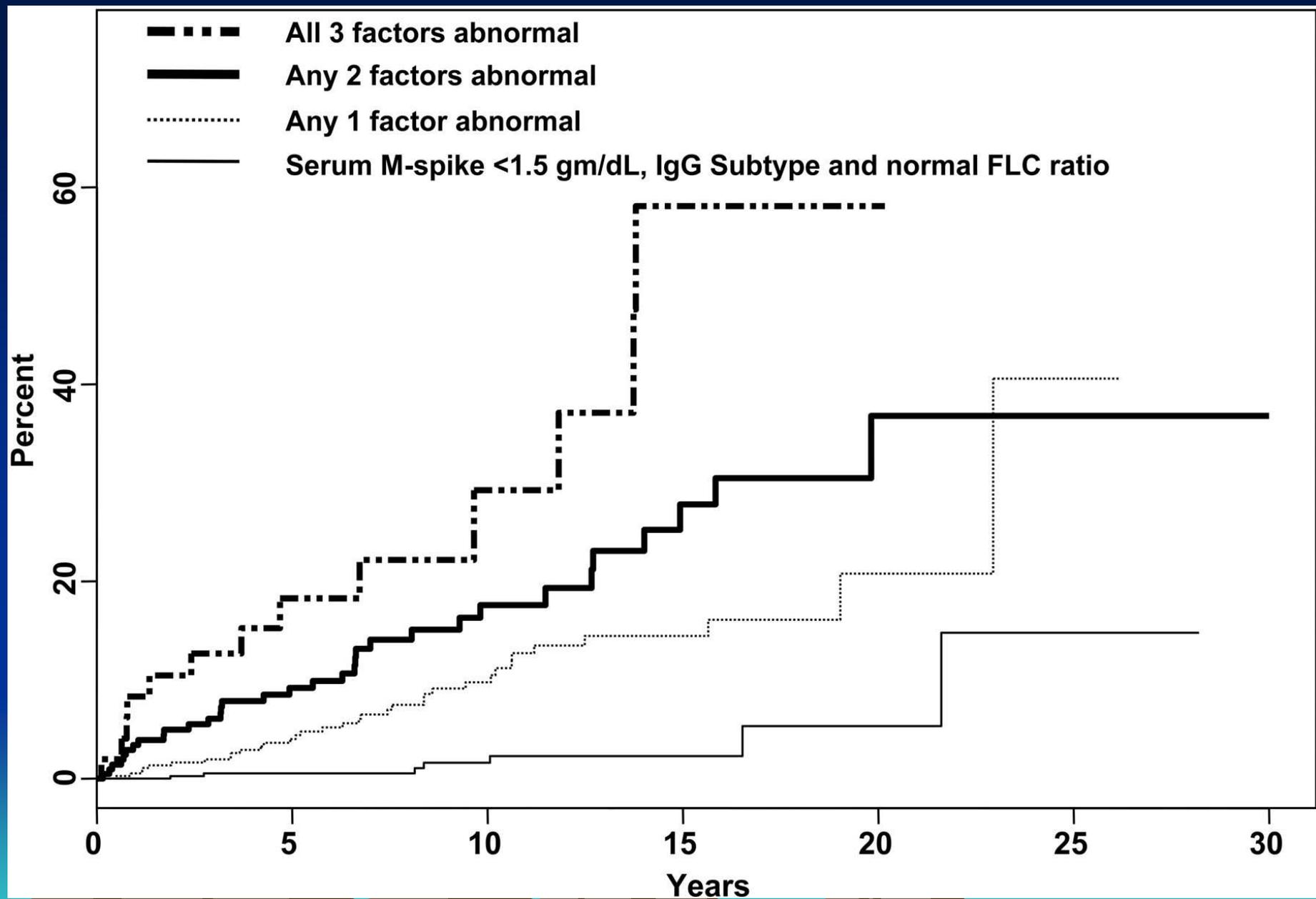
20 ans après le diagnostic de MGUS:

- 58% des patients avec ces 3 caractéristiques
présentaient un processus malin

- 37% des patients avec 2 de ces
caractéristiques présentaient un processus malin

- 5% des patients avec 1 de ces
caractéristiques présentaient un processus malin





Risk of progression to myeloma or related condition in 1148 patients with MGUS.

Le dosage des chaînes légères: les problèmes

- Le coût: une mesure sur BN II coûte environ 10 euros. En raison de la plage très large des concentrations observées, une trousse de 100 tests permet la réalisation de 65 à 70 dosages de patients.
→ définir au mieux les dilutions initiales à réaliser en fonction des éventuelles antécédents du patient
- Le risque de sous-estimation de la concentration réelle par effet « crochet » peut toujours survenir
- Le coefficient de variation est élevé pour des faibles concentrations (interférence des immunoglobulines complètes ?): toujours suivre l'effet du traitement sur la concentration de la CLL, pas sur le rapport!

Reproductibilité sur BN II

Kappa free	Moyenne (mg/l)	C.V.
contr N	17	6,70%
contr H	34,1	7,90%

Lambda free	Moyenne (mg/l)	C.V.
Contr N	28,1	6,50%
Contr H	55,8	5,90%

Performances du rapport κ/λ dans le diagnostic des proliférations monoclonales des cellules B

- Cette étude du Professeur Bossuyt a été publiée en août 2008 dans le British Journal of Haematology
- L'étude a porté sur 833 patients qui étaient vus pour la première fois pour une suspicion d'une prolifération lymphocytaire B maligne.
- Une électrophorèse de protéines sériques (sur CZE Paragon), une IF (sur HYDRASYS), le rapport κ/λ sérique (sur BN II) et une IF des protéines urinaire sur urine concentrée (sur HYDRASYS) ont été déterminés systématiquement.
- On a diagnostiqué:
 - une prolifération plasmocytaire maligne chez 28 patients (dont myélomes: 18 Ig intacte et 2 à CLL, amylose: 3, Waldenström: 1)
 - un lymphome non Hodgkinien chez 25 patients
 - une MGUS chez 156 patients

L'immunofixation reste
indispensable....



- Rapport κ/λ anormal chez:
 - 24 des 28 patients avec prolifération plasmocytaire maligne (86%)
 - 9 des 25 patients avec lymphomes non Hodgkinien (36%)
 - 44 des 156 MGUS(28%)
- Quelques faux rapport κ/λ anormaux en cas d'insuffisance rénale et d'hypergammaglobulinémie

P. Vermeersch, L. Van Hoovels, M. Delforge, G. Mariën and X. Bossuyt: British Journal of Haematology 2008,143,496-502.



Tests réalisés	Sensibilité	Spécificité
κ/λ	36,8	96,8
ELEC	80,4	77,9
IF si bande ELEC	78,5	100
IF si bande ELEC + IFU	81,8	100
IF si bande ELEC +κ/λ	82,3	96,8
IF	91,9	100
IF +κ/λ	93,8	96,8
IF+ IFU	92,3	100

P. Vermeersch, L. Van Hoovels, M. Delforge, G. Mariën and X. Bossuyt: British Journal of Haematology 2008,143,496-502.

Tests réalisés	Pathologies et MGUS non révélées
κ/λ	3 myelo, 1 plasmo, 112 MGUS, 16 lymphomes
ELEC	1myelo, 1 amyl, 1 plasmo, 25 MGUS, 13 lymphomes
ELC + IF si bande ELEC	1myelo, 1 amyl, 1 plasmo, 26 MGUS, 16 lymphomes
IF si bande ELEC + IFU	24 MGUS, 14 lymphomes
IF si bande ELEC + κ/λ	1 plasmo, 23 MGUS, 13 lymphomes
IF	15 lymphomes, 2 MGUS
IF +κ/λ	12 lymphomes, 1 MGUS
IF+ IFU	14 lymphomes, 2 MGUS

	Electrophorèse + rapport κ/λ	IF sérique +IF urinaire	IF sérum + rapport κ/λ
sensibilité	82.3 %	92.3 %	93.8
spécificité	96.8 %	100 %	96.8
Pathologie des cas non détectés	1 plasmocytome 23 MGUS	2 MGUS	1 MGUS

P. Vermeersch, L. Van Hoovels, M. Delforge, G. Mariën and X. Bossuyt: British Journal of Haematology 2008,143,496-502.

Conclusions

- Nous ne pouvons pas mettre en évidence tous les CM observés chez les patients de manière simple et économique: une multiplication des tests s'impose
- Lorsque le clinicien est confronté à une gammopathie monoclonale ou qu'il suspecte une prolifération lymphocytaire B, il devrait avoir la possibilité d'effectuer une demande spéciale qui comporterait d'office une recherche de protéine de Bence Jones. Le dosage des CLL dans le sérum serait réalisé à condition que ces tests soient négatifs (et facturé au patient).
- Les CM bi ou triclonaux présents en faible concentration associés à des syndromes inflammatoires chroniques ont-ils une signification clinique qui justifie le temps et l'argent qu'on y consacre? Dans le cas où ils ne feraient pas l'objet d'une demande spécifique, on pourrait se limiter à un commentaire de type « tracé inflammatoire, présence possible d'un ou plusieurs CM en faible concentration » et arrêter les investigations.

Conclusions(2)

- Le dosage des CLL dans l'urine ne doit être réalisé ni pour dépister la protéine de Bence Jones ni pour estimer la masse tumorale. Il doit être réservé au suivi thérapeutique (des CLL <200 mg/24H pendant 6 semaines est un critère d'efficacité du traitement)
- Il faudrait pouvoir définir une concentration de CLL à partir de laquelle une toxicité rénale doit être envisagée. Le dosage de cette dernière devrait pouvoir être réalisé chez les patients qui dépassent ce seuil quelle que soit leur situation clinique.



Remerciements

- Aux technicien(e)s:
 - A. Bogdan et J.-P. Verlaine (électrophorèses)
 - F. Detroz et J. Vanherque
 - F. Dom et M.-C. Lutgens (dosage des CLL)
- Aux stagiaires:
 - R. Stephan
 - S. Henry
- A la firme Sebia et à Madame I. Dewaele
- A la firme Binding Site pour les documents en provenance de l'ouvrage:
Serum Free Light Chain Analysis de A. R. Bradwell
(5^{ième} édition , 2008)
- Au service informatique du laboratoire:
Docteur Nève et J. L. Grevesse

Merci de votre attention!

