



# Apport du Dosage des Chaînes Légères Libres sériques en Hématologie Clinique

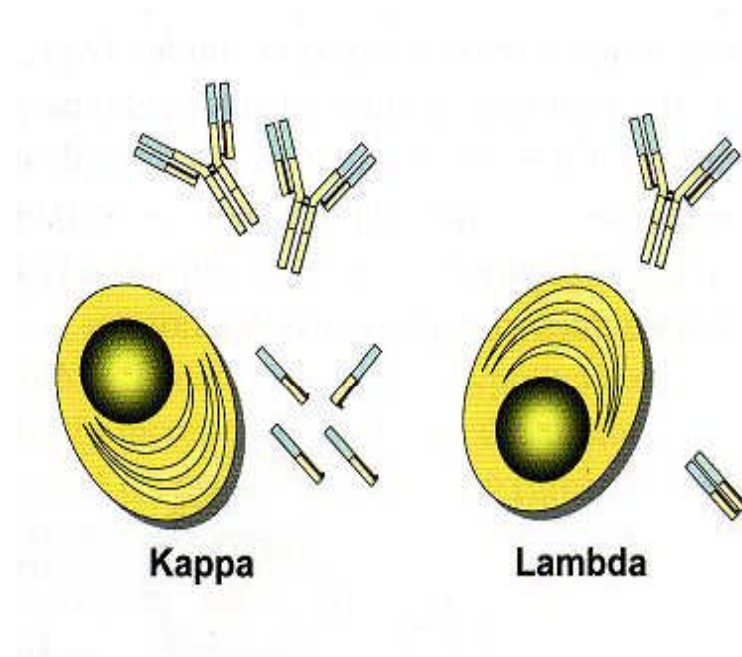
40ème Colloque National des Biologistes des Hôpitaux

Angers 2011

Bernadette HENNACHE  
CHRU LILLE - France

# Mise en évidence d'un composant monoclonal

- Electrophorèse des protéines sériques :  
présence d'un pic monoclonal ou hypogammaglobulinémie  
quantification par intégration du pic monoclonal  
difficulté d'individualiser un pic en bêta
- Immunofixation sérique :  
isotype de l'Ig monoclonale  
affirme le caractère clonal
- Immunofixation urinaire (qualitatif) :  
présence ou non d'une protéine de Bence-Jones  
et/ou d'une Ig monoclonale
- Dosage des Ig polyclonales résiduelles
- Dosage des chaînes légères libres



Production d'Ig complète, de CLL monomère  $\kappa$  et dimère  $\lambda$

# Production de chaînes légères libres (CLL) sériques

Lors de la production d'immunoglobulines (Ig) par les plasmocytes, les CLL sont produites en excès par rapport à la chaîne lourde (40 %) pour permettre la conformation de l'Ig complète

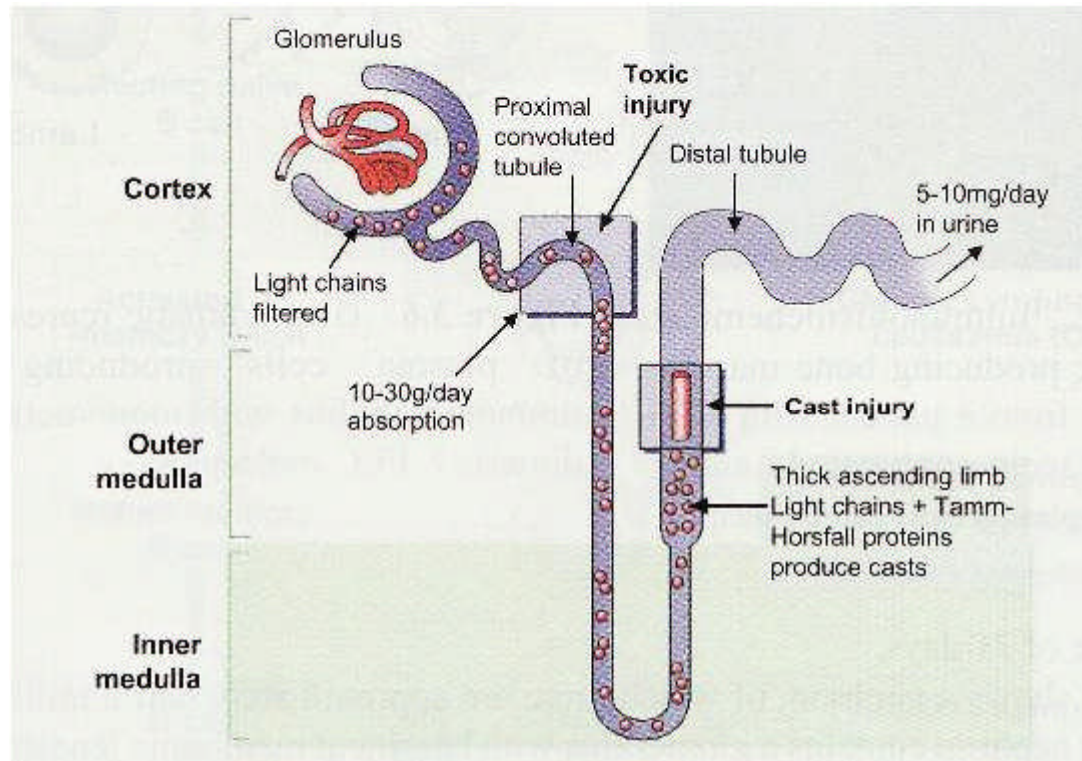
- CLL kappa ( $\kappa$ ) monomère de PM 25 kDa  
CLL lambda ( $\lambda$ ) dimère de PM 50 kDa, ou multimère
- Production dans un rapport de 2 CLL  $\kappa$  pour 1 CLL  $\lambda$   
500 mg / jour chez un sujet sain
- $\frac{1}{2}$  vie CLL  $\kappa$  monomérique : 2H  
 $\frac{1}{2}$  vie CLL  $\lambda$  dimérique : 4 - 6H  
 $\frac{1}{2}$  vie IgA : 6 jours  
 $\frac{1}{2}$  vie IgG : 21 jours

# Métabolisme des CLL sériques

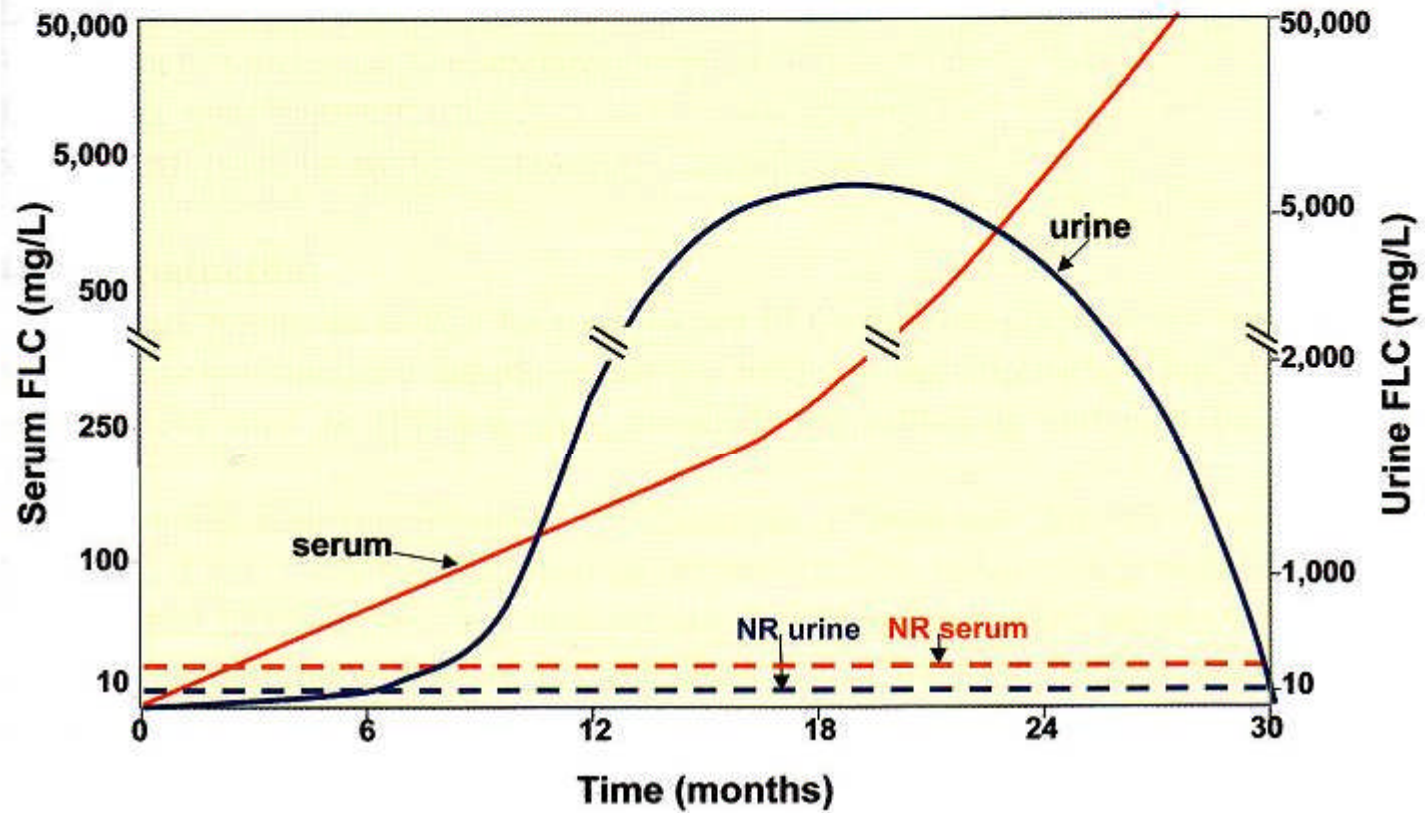
- Production de CLL par le système lymphoïde :  
500 mg / jour
- Filtration glomérulaire ( CLL < 60 kDa)
- Réabsorption au niveau du tube proximal.  
Capacité de réabsorption des protéines : 10 à 30 g / jour  
Pas de protéines dans les urines chez un sujet sain,  
concentration physiologique urinaire < 100 mg / 24H
- Au niveau du tube distal, fixation des CLL sur la protéine de Tamm – Horsfall (uromucoïde, 80 kDa) par une séquence peptidique spécifique

# Excrétion urinaire des CLL

- Une faible quantité de CLL est excrétée dans les urines : 1 à 10 mg / jour chez un sujet sain provenant de la muqueuse de la partie proximale du néphron et de l'urètre
- Si seuil de réabsorption dépassé, passage des CLL monoclonales dans les urines chez patients atteints de désordres lymphoplasmocytaires
- Si précipitation de cristaux de CLL niveau tubule distal, inflammation puis mort néphron. ↑ CLL sériques, filtration par néphrons moins nombreux, cercle vicieux qui accélère l'atteinte rénale et continue d'augmenter les CLL sériques.
- Les CLL sont responsables de l'atteinte rénale du myélome



Filtration glomérulaire, réabsorption tubulaire, excrétion des CLL



Evolution des CLL sériques et urinaires au cours d'un myélome :

Toujours doser les CLL dans le sérum



# Clairance des CCL sériques

- Elimination rapide, métabolisées au niveau des reins, dépend du PM :

Monomères CCL  $\kappa$  éliminés en 2 à 4H

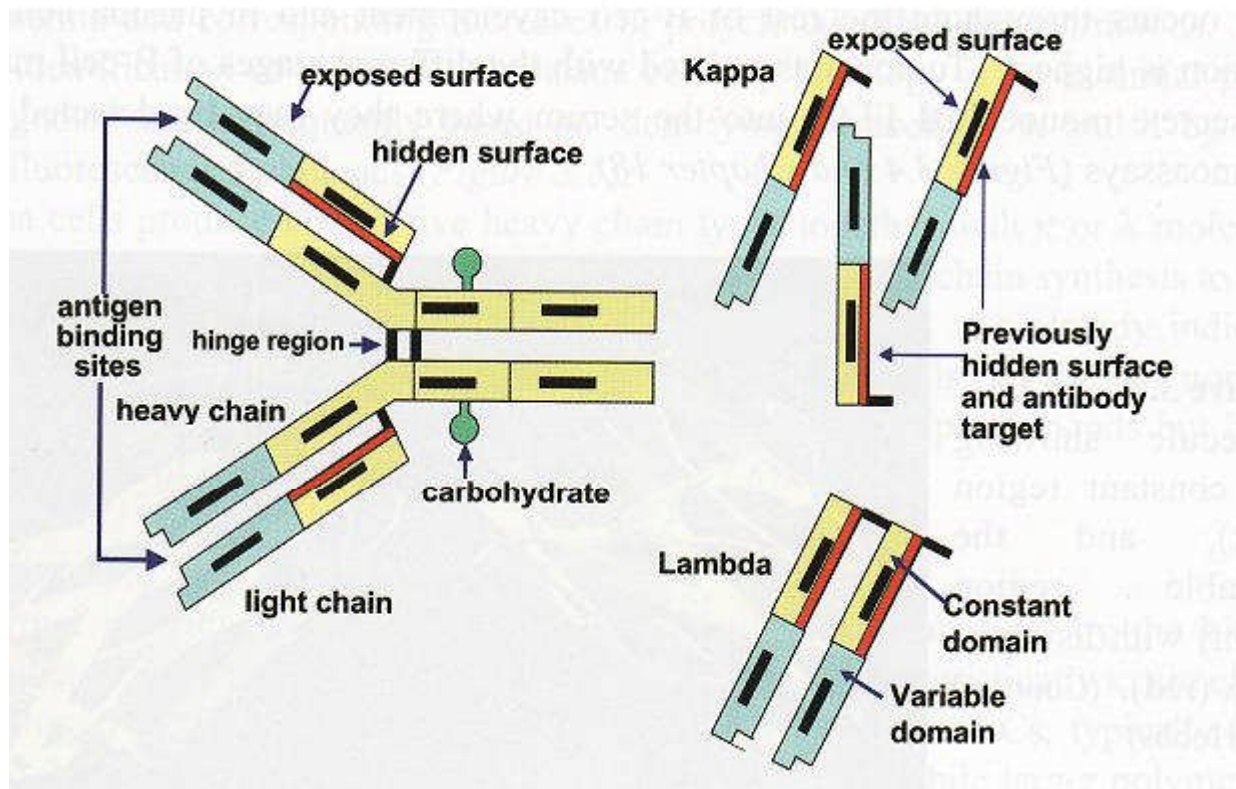
Dimères CCL  $\lambda$  éliminés en 3 à 6H

Multimères CLL  $\lambda$  éliminées plus lentement

- Plus de CLL  $\kappa$  produites mais élimination plus rapide, ce qui en final, dans le sang, donne : CLL  $\lambda$  > CLL  $\kappa$
- Si insuffisance rénale, perte de la clairance des CLL  $\kappa$  et le rapport  $\kappa/\lambda$  augmente avec la dégradation de l'IR

Dosage des CLL sériques (sFLC)

Test Freelite™ Binding Site

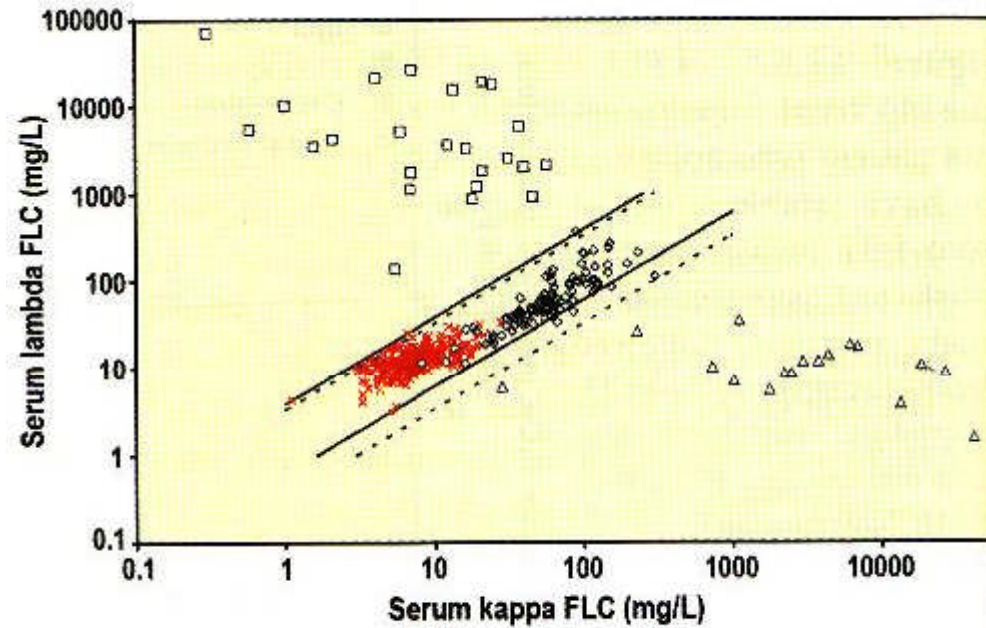


Structure d'une Ig et des CLL monomère  $\kappa$  et dimère  $\lambda$

- Purification de Kappa et de Lambda à partir d'urines contenant des protéines de Bence – Jones
- Immunisation de moutons rendus tolérants
- Antisérums (polyclonaux) adsorbés sur gel de sépharose contenant
  - des protéines monoclonales purifiées IgA, IgG, IgM
  - des chaînes légères libres Kappa ou Lambda
- Plusieurs cycles d'adsorption
- Analyse des critères de spécificité, affinité, titre, avidité...
- Etude de précision, d'exactitude, standardisation, excès d'Ag, linéarité, stabilité
- Conditionnement

# Valeurs de référence des sFLC

- Valeurs sériques de référence chez un patient sain  
CCL Kappa : 7.3 mg/L (3.3 – 19.4)  
CCL Lambda : 12.7 mg/L (5.71 – 26.3)  
Rapport  $\kappa / \lambda$  : 0.6 (0.26 – 1.65)
- Si rapport  $\kappa / \lambda$  augmente : CLL  $\kappa$  monoclonale  
Si rapport  $\kappa / \lambda$  diminue : CLL  $\lambda$  monoclonale
- Si rapport  $\kappa / \lambda$  normal avec augmentation des CLL  $\kappa$  et des CLL  $\lambda$  : augmentation polyclonale ou insuffisance rénale (hors contexte désordre lymphoplasmocytaire)
- $\frac{1}{2}$  vie CLL  $\kappa$  si atteinte rénale : 2 - 3 jours  
Rapport  $\kappa / \lambda$  si insuffisance rénale :  $>1$  (0.37 – 3.1)



Valeurs de référence du rapport  $\kappa/\lambda$  modifié  
chez des patients dialysés ou en insuffisance rénale

# Avantages du dosage: marqueur idéal

- Sensibilité analytique ++ plus basse limite de détection :  
< 0.1 mg / L de CLL  $\kappa$  ou  $\lambda$  dans urines et LCR  
< 0.5 mg / L dans sérum (lipides)
- Spécificité ++ : pas d'interférence avec les Ig entières
- Précocité :  $\frac{1}{2}$  vie courte
- Quantitatif : suivi des patients par le rapport  $\kappa / \lambda$
- Interprétation facile
- Liquide biologique accessible : sérum
- Automatisable : néphélométrie et turbidimétrie
- Valeur additive : diagnostic, suivi, pronostic
- Amélioration de la prise en charge du patient

# Limites du dosage des sFLC

Comme tout dosage par immunoprécipitation Ag-Ac:

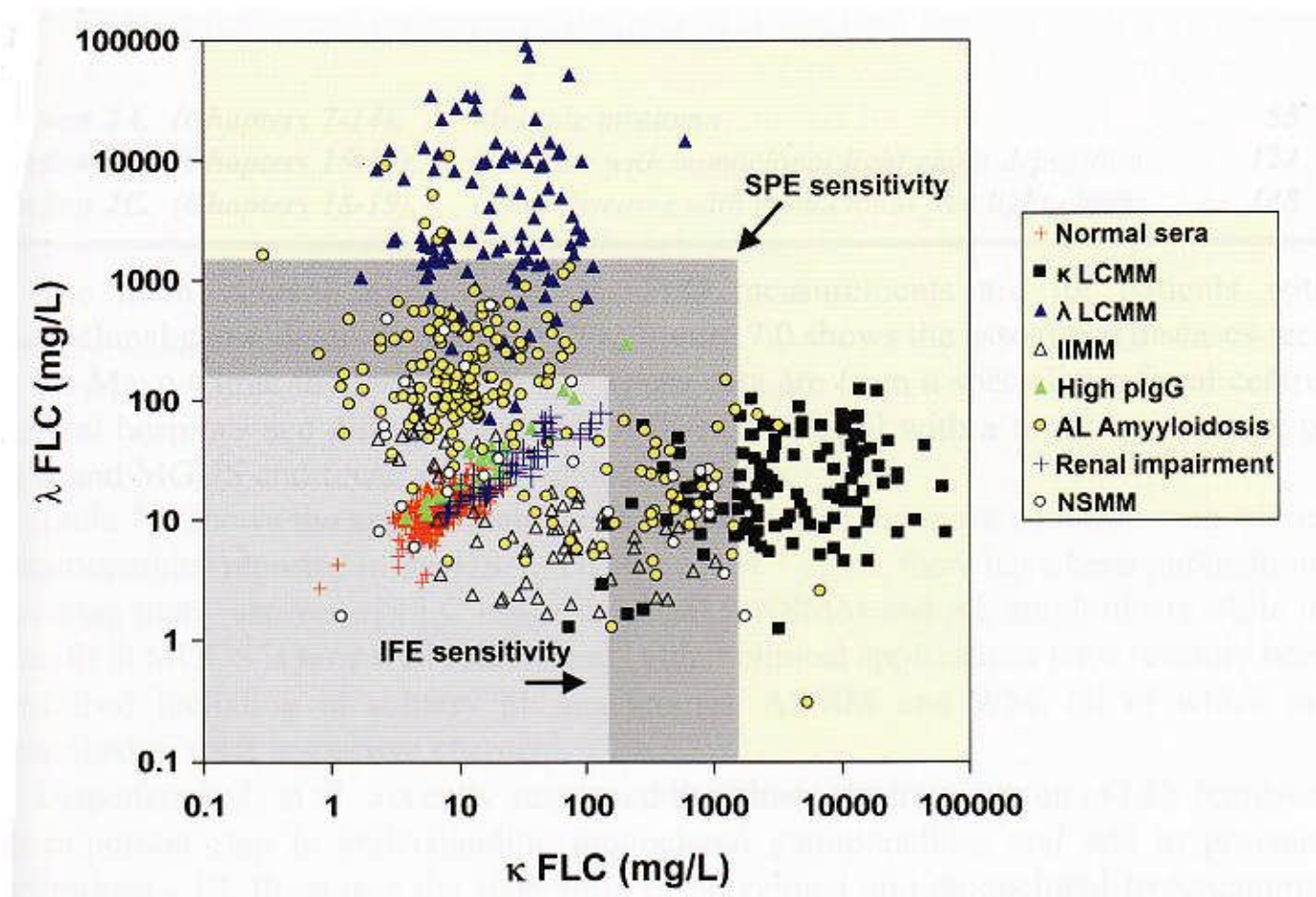
- Si excès d'Ag : sous-évaluation du taux de CLL par redissolution du précipité Ag-Ac (néphélométrie)
- Si polymérisation des CLL : surestimation du taux par augmentation de la taille du complexe Ag-Ac
- Variabilité selon le lot de réactifs (calibration, contrôles)
- CQI bas pas assez bas et CQI haut pas assez haut
- Attention aux dilutions trop élevées qui n'assurent plus la linéarité. Valeurs très élevées de sFLC en g/L sans pic à l'électrophorèse (déroutant)
- Coût BHN 150 : choix des paramètres du bilan

**Cependant reconnu unanimement par les experts internationaux en raison de sa grande sensibilité**



# Comparaison sensibilité analytique

	Kappa mg/L	Lambda mg/L	Diagnostic
Electrophorèse des protéines	500 - 2000	500 - 2000	bande monoclonale
Immunofixation sérique	150 - 500	150 - 500	bande monoclonale
Chaîne légère libre (sFLC)	1.5	3.0	rapport $\kappa / \lambda$ anormal



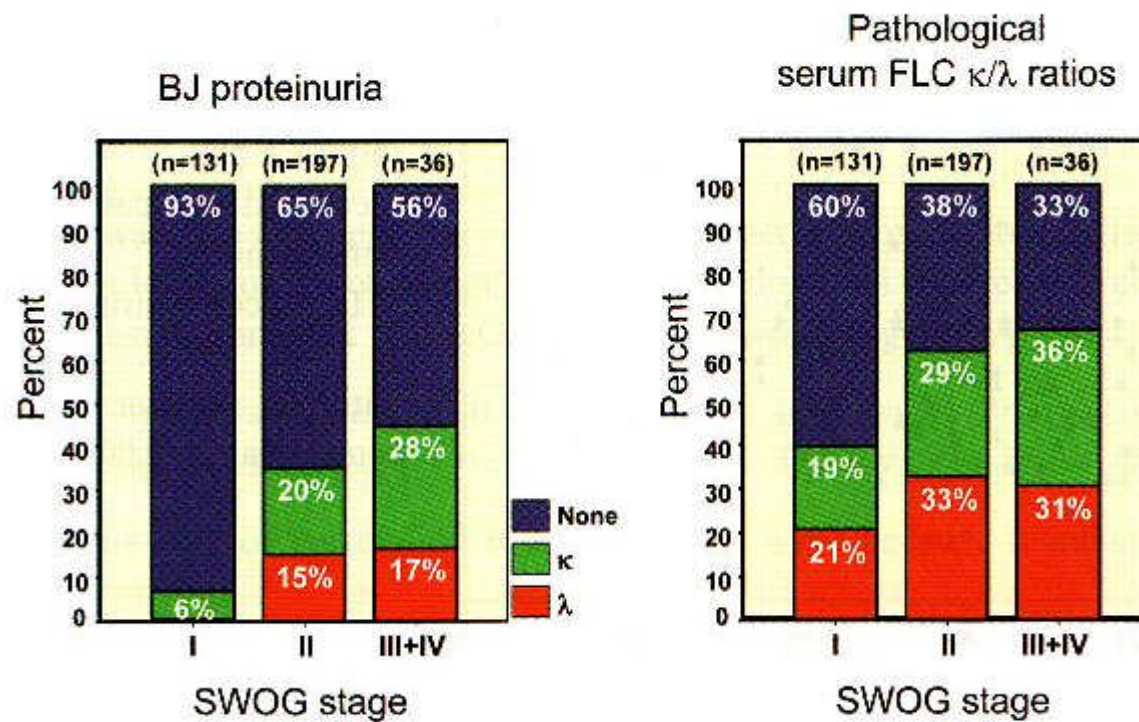
Patients avec rapport  $\kappa/\lambda$  perturbé et négatifs en électrophorèse ou IF  
toutes dyscrasies plasmocytaires confondues

# Applications du dosage des CLL en hématologie clinique

- 2001 : Mise sur le marché du test sFLC (dépistage de 100% des myélomes à chaînes légères libres et 82% des myélomes non sécrétants) FDA
- 2004 : Aide à la stratification du risque de progression des MGUS vers un myélome ou une autre hémopathie maligne (1% / an) grâce au rapport  $\kappa/\lambda$
- 2005 : consensus international sur les amyloses AL
- 2006 : La normalisation du rapport  $\kappa/\lambda$  fait partie des critères de « réponse complète stringente » dans le myélome multiple. Valeur pronostique amylose AL
- 2007 : Valeur pronostique dans le myélome multiple
- 2008 : Recommandations de l'IMWG

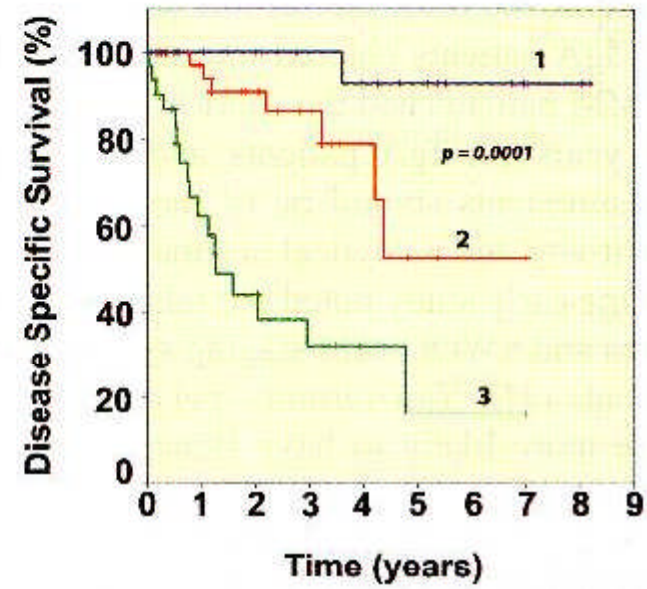
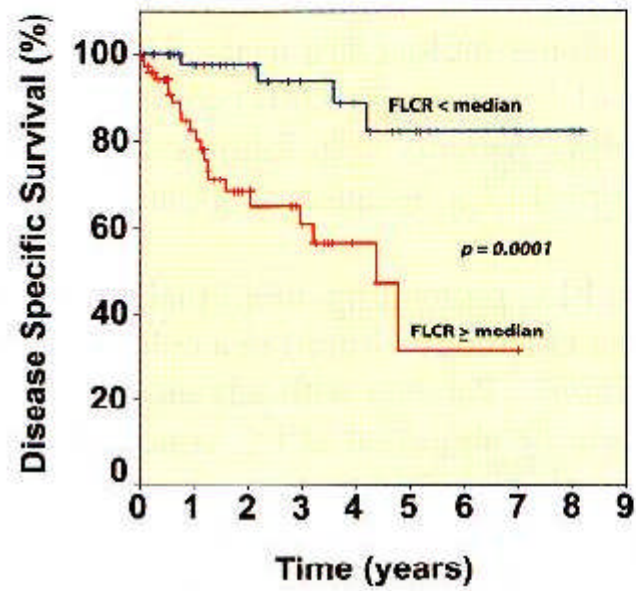
Examen biologique	Sensibilité
Electrophorèse sérique (EPS)	79%
Immunofixation sérique (IFS)	87%
Rapport $\kappa/\lambda$ sérique (R $\kappa/\lambda$ )	74.3%
EPS + IFS	94.3%
EPS + IFS + R $\kappa/\lambda$	97.4%
EPS + EPU + IFS + IFU + R $\kappa/\lambda$	98.6%

Sensibilité clinique des examens biologiques toutes pathologies confondues  
 Amylose AL, myélome multiple, Waldenström, MGUS, POEMS, plasmocytome, MDCLL



Relation entre stade SWOG et présence de B2 ou rapport  $\kappa/\lambda$  perturbé

SWOG : South West Oncology Group



% survie selon rapport  $\kappa/\lambda$  (A) ou score ISS (B)

Score ISS selon rapport  $\kappa/\lambda$  (< 0.03 ou > 32), sérumalbumine (< 35g/L)

$\beta$ 2 microglobuline (>3.5 mg/L)

# Recommandations IMWG en pratique clinique (1)

- Recherche d'un désordre lymphoplasmoctaire :  
EPS + IFS + CLL (ne plus faire EPU ni IFU)  
Tenir compte de l'insuffisance rénale  
En France : EPS + CLL (diagnostic) puis IFS (typage)  
Si recherche positive : EPU + IFU
- Pronostic :  
Dosage CLL au diagnostic du myélome et de amylose AL =  
recommandation  
Pas de recommandation mais suggestion pour MGUS,  
myélome multiple asymptomatique ou plasmocytome  
osseux solitaire



# Recommandations IMWG en pratique clinique (2)

- Suivi évolutif et évaluation de la réponse au traitement :
  - objectif dans myélome peu ou pas sécrétant =  
Ig monoclonale < 10 g/L ou protéinurie < 200 mg/24H
  - utilisation du rapport  $\kappa/\lambda$  :  
pour sa sensibilité à détecter la maladie résiduelle  
critère de rémission complète stricte
  - CLL recommandé pour le suivi des amyloses AL

# Myélome et atteinte rénale (1)

- CLL responsable de l'IR du myélome multiple  
40% ont IR au diagnostic (réversible)  
10% seront dialysés
- Causes de l'atteinte rénale :
  - tubulopathie myélomateuse (CLL dans urines) : stress oxydatif, production d'agents chimiotactiques et de protéines pro inflammatoires qui favorisent l'apparition de lésions fibreuses intersticielles
  - liaison des CLL à la protéine de Tamm-Horsfall, formation de cylindres dans les tubules distaux entraînant une obstruction
- Respecter les valeurs de référence de CLL établies en cas d'insuffisance rénale : rapport  $\kappa/\lambda$  0.3 - 3.1

# Myélome et atteinte rénale (2)

- Atteinte rénale = facteur de mauvais pronostic
- Corrélation entre taux de CLL et fonction rénale (cystatine C)
- Quel que soit l'âge l'augmentation des CLL est liée à la dégradation de la fonction rénale
- Si atteinte rénale au diagnostic de myélome :
  - diminution de la médiane de survie
  - moins bonne réponse au traitement
- Récupération de la fonction rénale :
  - augmentation de la médiane de survie

# Conclusion (1)

Utilisations du dosage des CLL (Freelite™)

- Pour le diagnostic car :
    - taux de détection +++
    - précocité du marqueur
    - CLL devrait remplacer l'IFU
  - Pour la valeur pronostique, dosage des CLL au moment du diagnostic chez patients atteints de:
    - MGUS
    - myélomes multiples ou asymptomatiques
    - plasmocytomes solitaires
    - amyloses AL
- Démontré mais pas utilisé car pas validé

# Conclusion (2)

- Pour le suivi CLL si :  
amyloses AL, adaptation des traitements  
myélomes à chaîne légère  
myélomes pauci ou oligosécrétants  
patients en réponse complète et RCs  
indicateur de rechute  
suivi de l'efficacité des dialyses
- Evaluation du risque de progression pour:  
MGUS  
Myélome indolent  
plasmocytomes osseux solitaires  
**Démonstré mais pas utilisé car pas validé**

# Conclusion (3)

- Les CLL sont un marqueur idéal pour l'étude des désordres lymphoplasmocytaires.
- Le dosage des CLL par le test Freelite™ proposé par Binding Site répond à l'attente des biologistes quant à la qualité et l'excellente sensibilité de ce marqueur.
- Cependant le biologiste doit s'assurer du respect des procédures analytiques et doit veiller à la bonne interprétation des bilans en s'assurant de la cohérence des paramètres dosés (EPS, IFS, CLL, EPU et IFU).
- La bonne utilisation du dosage des CLL et du rapport  $\kappa/\lambda$  est une aide précieuse pour les cliniciens aux différents stades de diagnostic, de pronostic, du suivi évolutif et de l'évaluation de la réponse au traitement de ces pathologies.