



UNIVERSITÉ DE LILLE

FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2019

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Dosage des chaînes légères libres sériques par ELISA : du
biologiste au clinicien**

Présentée et soutenue publiquement le 8 octobre 2019 à 18 heures
au Pôle Recherche

Par Jean-David Pekar

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Pascal PIGNY

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU

Madame le Docteur Susanna SCHRAEN

Monsieur le Docteur Louis TERRIOU

Directeur de Thèse :

Madame le Docteur Brigitte ONRAED

**Travail du Laboratoire de Biochimie des Protéines du centre
hospitalier universitaire de Lille**

AVERTISSEMENT

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|----|
| Introduction | 12 |
| 1 Généralités..... | 12 |
| 2 La lymphopoïèse B | 13 |
| 3 Les immunoglobulines | 15 |
| 3.1 Rappels | 15 |
| 3.2 Structure..... | 15 |
| 4 Chaînes légères libres sériques..... | 19 |
| 5 Gammopathies monoclonales | 21 |
| 5.1 Généralités | 21 |
| 5.2 Myélome Multiple | 21 |
| 5.3 Cas particulier du myélome à chaînes légères libres..... | 23 |
| 5.4 Maladie de Waldenström..... | 24 |
| 5.5 MGUS..... | 25 |
| 5.6 Amylose AL | 25 |
| 5.7 Leucémie lymphoïde chronique | 26 |
| 5.8 Lymphome malin non-hodgkinien | 26 |
| 6 FLC : marqueurs diagnostiques et pronostiques dans les pathologies monoclonales plasmocytaires | 27 |

| | | |
|-----|--|----|
| 7 | Les méthodes de dosages des FLC | 31 |
| 7.1 | Historique | 31 |
| 7.2 | Freelite® | 33 |
| 7.3 | N-Latex FLC® | 34 |
| 7.4 | Diazyme's Human Free Light Chain Assays® | 35 |
| 7.5 | κλOneous® Free Light Chains | 35 |
| 7.6 | Seralite® | 35 |
| 7.7 | Sebia FLC® | 37 |
| 7.8 | Difficultés des méthodes de dosage des chaînes légères libres..... | 38 |
| 8 | Objectifs | 42 |
| | Matériel et méthodes | 43 |
| 1 | Population étudiée | 43 |
| 2 | Dosage des chaînes légères libres sériques | 44 |
| 3 | Validation de la méthode Sebia FLC® | 45 |
| 3.1 | Répétabilité | 46 |
| 3.2 | Fidélité intermédiaire | 46 |
| 3.3 | Contamination | 46 |
| 3.4 | Interférences | 47 |
| 3.5 | Evaluation externe de la qualité | 50 |
| 4 | Méthodes statistiques | 51 |

| | |
|--|-----|
| Résultats | 55 |
| 1 Performances analytiques | 55 |
| 1.1 Répétabilité | 55 |
| 1.2 Fidélité intermédiaire | 55 |
| 1.3 Contamination | 56 |
| 1.4 Interférences | 56 |
| 2 Évaluation externe de la qualité | 57 |
| 3 Comparaison de méthodes Freelite® et Sebia FLC® | 57 |
| 3.1 Population étudiée | 57 |
| 3.2 Analyses statistiques | 59 |
| 3.3 Suivi prospectif | 64 |
| 3.4 Nombre de dilutions | 70 |
| 4 Intervalles de référence | 74 |
| 4.1 Analyse de la population | 74 |
| 4.2 Intervalles de référence Sebia FLC® et Freelite® | 75 |
| Discussion | 80 |
| Conclusion | 88 |
| Références | 89 |
| Annexes | 100 |

LISTE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|---|----|
| Figure 1. Les étapes de la lymphopoïèse B | 14 |
| Figure 2. Structure d'une immunoglobuline | 16 |
| Figure 3. Support génétique d'une immunoglobuline | 18 |
| Figure 4. Filtration rénale des FLC | 20 |
| Figure 5. Critères de l'IMWG 2014 pour le diagnostic de myélome multiple | 22 |
| Figure 6. Physiopathologie de la néphropathie à cylindres myélomateux..... | 24 |
| Figure 7. Production de FLC dans le cadre de gammopathies monoclonales | 28 |
| Figure 8. Schématisation d'une production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux à partir d'animaux | 32 |
| Figure 9. Schématisation des techniques photométriques en milieu trouble..... | 34 |
| Figure 10. Schématisation de la technique immunochromatographique Seralite® | 36 |
| Figure 11. Schématisation d'une technique ELISA | 38 |
| Figure 12. Mécanisme de l'excès d'antigène d'après Heidelberger et Kendall | 40 |
| Figure 13. Conséquence de l'excès d'antigène..... | 40 |
| Figure 14. Organigramme de dilution de la technique Sebia FLC® sur DAS AP22 ELITE et de la technique Freelite® sur SpaPLUS® | 45 |
| Figure 15. Comparaison de méthode entre la technique Freelite® et Sebia FLC® | 62 |
| Figure 16. Comparaison de méthode entre la technique Freelite® et Sebia FLC® (suite)..... | 63 |

| | |
|---|----|
| Figure 17. Suivi prospectif du ratio κ/λ d'un homme de 61 ans atteint d'un MM à IgG κ depuis 2013 | 65 |
| Figure 18. Suivi prospectif du ratio κ/λ d'un homme de 61 ans atteint d'un MM à IgA κ depuis 2010 | 66 |
| Figure 19. Suivi prospectif du ratio κ/λ d'une femme de 72 ans atteinte d'un MM à FLC κ depuis 2004 | 67 |
| Figure 20. Suivi prospectif du ratio κ/λ d'un homme de 61 ans atteint d'un MM à IgG κ depuis 2017 | 67 |
| Figure 21. Suivi prospectif du ratio κ/λ d'un homme de 73 ans atteint d'un MM à IgG κ depuis 2016 | 68 |
| Figure 22. Suivi prospectif de la dFLC d'une femme de 67 ans atteinte d'une amylose AL depuis 2017 | 69 |
| Figure 23. Suivi prospectif de la dFLC d'une femme de 76 ans atteinte d'une amylose AL depuis 2018 | 69 |
| Figure 24. Économie attendue du nombre de dilutions en Sebia FLC [®] par rapport à Freelite [®] | 73 |
| Figure 25. Intervalles de référence Sebia FLC [®] selon l'estimation du DFG | 76 |
| Figure 26. Intervalles de référence Freelite [®] selon l'estimation du DFG | 78 |

LISTE DES TABLES

| | |
|---|----|
| Table 1. Critères pour l'évaluation de la réponse hématologique du MM après traitement, basés sur les recommandations internationales de l'IMWG..... | 29 |
| Table 2. Critères pour l'évaluation de la réponse hématologique de l'amylose AL après traitement, basés sur les recommandations internationales du consortium de la recherche clinique sur l'amylose AL (52)..... | 30 |
| Table 3. Protocole pour la réalisation du test de surcharge en hémoglobine..... | 48 |
| Table 4. Protocole pour la réalisation du test de surcharge en triglycérides. | 49 |
| Table 5. Protocole pour la réalisation du test de surcharge en bilirubine. | 50 |
| Table 6. Répétabilité de la technique Sebia FLC®..... | 55 |
| Table 7. Fidélité intermédiaire de la technique Sebia FLC®. | 56 |
| Table 8. Essai de contamination de la technique Sebia FLC®. | 56 |
| Table 9. Influence de l'aspect du sérum sur la technique Sebia FLC®..... | 57 |
| Table 10. Caractéristiques de la population utilisée pour la comparaison de méthodes entre la technique Freelite® et Sebia FLC®..... | 58 |
| Table 11. Tableau de concordance du ratio κ/λ entre la technique Freelite® et Sebia FLC®..... | 64 |
| Table 12. Détail des dilutions nécessaires aux rendus de résultats des chaînes κ en techniques Freelite® et Sebia FLC®..... | 70 |
| Table 13. Détail des dilutions nécessaires aux rendus de résultats des chaînes λ en techniques Freelite® et Sebia FLC®..... | 70 |

| | |
|--|----|
| Table 14. Comparaison du nombre de dilutions nécessaires aux rendus de résultats des chaînes κ en technique Freelite® entre l'activité 2017 du laboratoire de Biochimie des Protéines du CHU de Lille et la cohorte utilisée pour la comparaison de méthode..... | 71 |
| Table 15. Comparaison du nombre de dilutions nécessaires aux rendus de résultats des chaînes λ en technique Freelite® entre l'activité 2017 du laboratoire de Biochimie des Protéines du CHU de Lille et la cohorte utilisée pour la comparaison de méthode..... | 71 |
| Table 16. Description de la population utilisée pour la réalisation des intervalles de référence en technique Freelite® et Sebia FLC®. | 74 |
| Table 17. Intervalles de référence Sebia FLC® selon l'estimation du DFG | 77 |
| Table 18. Intervalles de référence Freelite® selon l'estimation du DFG | 79 |
| Table 19. Comparaison des intervalles de références du ratio κ/λ à partir de notre cohorte de sujets sains (MDRD \geq 60 et MDRD \geq 90) et la littérature | 83 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|-----------|--|
| BCR | B-Cell Receptor |
| CKD-EPI | Chronic Kidney Disease Epidemiology |
| CLSI | Clinical & Laboratory Standards Institute |
| COFRAC | COmité FRançais d'ACcréditation |
| CQI | Contrôle de Qualité Interne |
| CV | Coefficient de Variation |
| DFG | Débit de Filtration Glomérulaire |
| dFLC | Difference between involved free light chains and uninvolved free light chains |
| EEQ | Évaluation Externe de la Qualité |
| EFS | Établissement Français du Sang |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| FLC | Free Light Chains |
| iFLC/uFLC | involved Free Light Chains / uninvolved Free Light Chains |
| Ig | Immunoglobuline |
| IMWG | International Myeloma Working Group |
| LBM | Laboratoire de Biologie Médicale |
| LCS | Liquide Cérébro-Spinal |
| LLC | Leucémie Lymphoïde Chronique |
| LNH | Lymphome Non Hodgkinien |
| MALDI-TOF | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight |
| MDRD | Modification of Diet in Renal Disease |
| MGUS | Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance |
| MM | Myélome Multiple |
| MW | Maladie de Waldenström |
| rpm | Revolutions per minute |
| VPD | Velcade-Pomalidomide-Dexamethasone |

RÉSUMÉ

Contexte : Les chaînes légères libres sériques sont devenues des biomarqueurs utilisés quotidiennement dans le cadre de gammopathies monoclonales. De nombreuses difficultés analytiques subsistent néanmoins avec les techniques classiques de turbidimétrie et néphélémétrie. Récemment, une nouvelle approche par ELISA pourrait permettre de s'affranchir de certaines de ces difficultés. L'objectif de ce travail est d'étudier les performances analytiques du nouveau coffret Sebia FLC® par rapport au coffret Freelite® utilisé au laboratoire, de vérifier les intervalles de référence du fournisseur et d'évaluer la transférabilité de cette méthode vis-à-vis des référentiels existants.

Méthode : Nous avons inclu 1155 patients de façon prospective au laboratoire de Biochimie des Protéines du CHU de Lille. Les dosages des FLC ont été réalisés avec la technique Freelite® sur l'analyseur SpaPLUS® et avec la technique Sebia FLC® sur l'analyseur DAS AP22 ELITE. La validation de méthode suit la méthodologie décrite par le COFRAC et les recommandations du CLSI. Nous avons également suivi 96 patients afin de vérifier que les résultats obtenus avec la technique Sebia FLC® renseignent le clinicien de façon identique à ceux de la méthode Freelite®.

Résultats : Notre étude montre une bonne corrélation ainsi qu'une bonne concordance entre les deux méthodes. Néanmoins, les résultats obtenus avec la technique Sebia FLC® sont surestimés dans les valeurs basses et sous-estimés dans les valeurs hautes par rapport à Freelite®. Nous avons pu observer un nombre de dilutions nécessaires significativement inférieur avec la technique Sebia FLC® et une absence d'excès d'antigène sur notre cohorte. L'évolution du ratio κ/λ et de la dFLC semblent suivre la même tendance avec les deux techniques malgré des différences d'amplitude plus marquées avec la technique Freelite®.

Conclusion : Le nouveau coffret Sebia FLC adopte une nouvelle approche pour le dosage des FLC en s'appuyant sur une technique ELISA plutôt que sur la turbidimétrie ou la néphélométrie. D'un point de vue analytique, Sebia FLC® présente plusieurs avantages. Cependant, les variations de résultats conséquentes entre les deux techniques interrogent sur la transférabilité de seuils tels que l'iFLC/uFLC et la dFLC qui ont été définis à l'aide de Freelite®. D'autres études à l'aide de cohortes multicentriques ciblées seront nécessaires afin de calculer ces nouveaux seuils spécifiques au coffret Sebia FLC® et aux autres techniques disponibles sur le marché.

Introduction

1 Généralités

Les chaînes légères libres sériques kappa (κ) et lambda (λ) sont devenus des biomarqueurs utilisés quotidiennement par le clinicien, selon les recommandations internationales du groupe de travail international sur le myélome (MM), en anglais *International Myeloma Working Group* (IMWG), pour le diagnostic, le pronostic et le suivi de gammopathies monoclonales. D'autres applications sont amenées à se développer dans les années à venir avec notamment l'intérêt des chaînes légères libres κ dans le diagnostic de maladies neuro-inflammatoires telles que la sclérose en plaques.

Jusqu'à récemment, leur dosage pouvait être réalisé par photométrie en milieu trouble en techniques turbidimétrique ou néphélométrique. Ces dosages restent délicats, notamment en raison du risque d'excès d'antigène, de la variabilité inter-lot des réactifs, du manque de linéarité aux paliers de dilution et de la sensibilité variable des techniques à la polymérisation des chaînes légères. Récemment, une nouvelle méthode a été proposée. Son principe diffère puisqu'il s'agit d'une technique ELISA qui permettrait d'éviter certains inconvénients des méthodes classiquement utilisées.

Ce travail de thèse comporte deux parties. Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier les performances analytiques de cette nouvelle méthode et la comparer avec la technique utilisée au laboratoire de Biochimie des Protéines du centre hospitalier universitaire de Lille. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de ces résultats par le clinicien dans le cadre de gammopathies monoclonales.

En effet, les recommandations internationales de l'IMWG ont été établies sur la base d'études n'utilisant qu'un seul des coffrets disponibles sur le marché. Or, l'absence de standardisation entre les dosages des chaînes légères libres sériques rend difficile la transférabilité des résultats.

Avant la présentation de ce travail, nous rappellerons quelques éléments concernant l'origine des chaînes légères libres et les principales pathologies au cours desquelles leur dosage prend tout son intérêt.

2 La lymphopoïèse B

Les immunoglobulines (Ig) sont produites par les plasmocytes, stade final de la différenciation des lymphocytes B. Les lymphocytes B représentent environ 5 à 15% des lymphocytes circulants et sont définis par la présence d'Ig de surface. Ces immunoglobulines, produites par la cellule elle-même, jouent le rôle de récepteur spécifique pour l'antigène, en anglais *B-cell receptor* (BCR), qui est caractérisé par sa diversité. On peut séparer l'ontogenèse des lymphocytes B en deux phases principales, dépendantes ou non de la présence d'antigène (Figure 1).

- La première phase de différenciation et de maturation des lymphocytes B est indépendante de l'antigène. Elle se déroule dans la moelle osseuse et aboutit à la génération de lymphocytes B immatures exprimant une immunoglobuline de surface capable de reconnaître un antigène.
- La seconde phase, d'activation et de différenciation finale, est dépendante d'abord des antigènes du soi puis du non-soi en périphérie, au niveau des

organes lymphoïdes secondaires. Elle aboutit à la formation de plasmocytes et de cellules B mémoires spécifiques d'un antigène. Les plasmocytes, exprimant le CD38 et le CD138, sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire humorale en produisant des immunoglobulines.

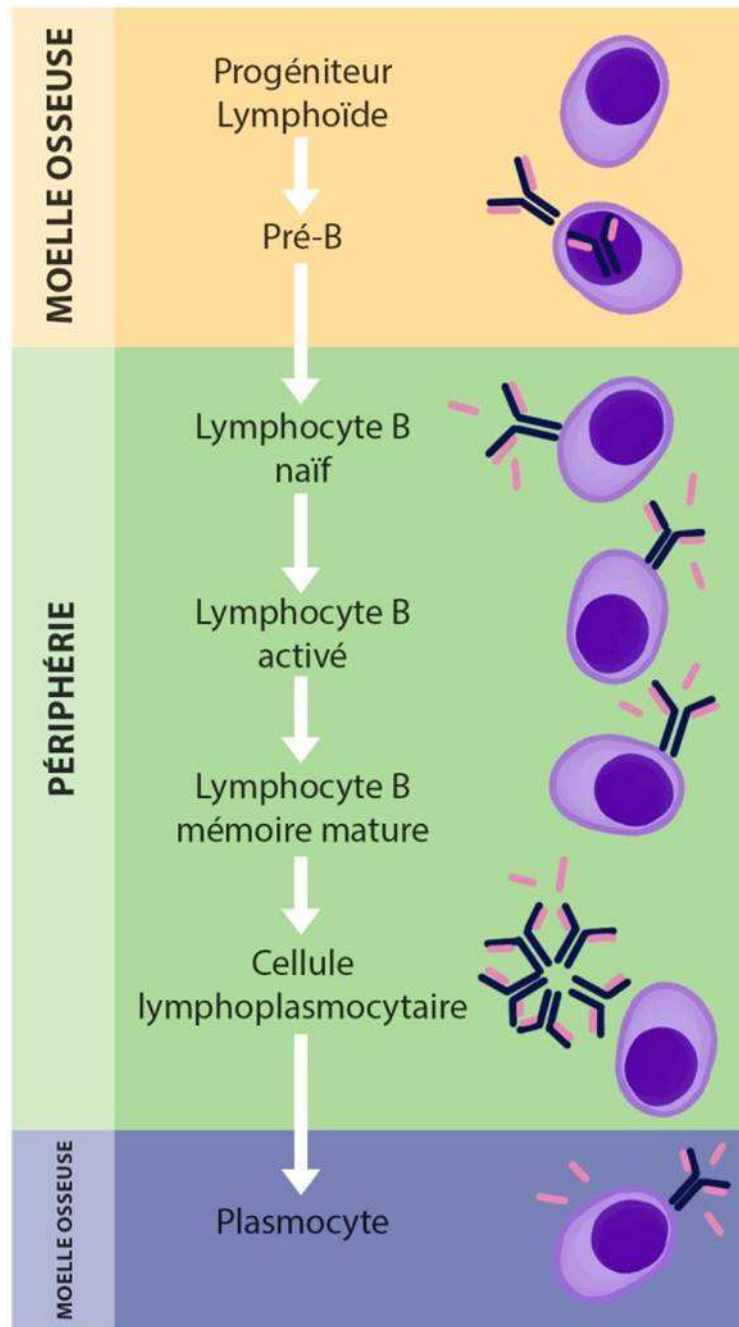


Figure 1. Les étapes de la lymphopoïèse B

3 Les immunoglobulines

3.1 Rappels

Une immunoglobuline, également appelée anticorps, est une glycoprotéine spécifique d'un antigène exprimée à la surface des lymphocytes B, au sein d'un complexe moléculaire permettant l'activation cellulaire. Les formes solubles sont présentes et donc analysables dans la circulation sanguine. En situation normale, les Ig produites par l'ensemble des clones plasmocytaires d'un individu forment un répertoire polyclonal. Lors d'une réponse immunitaire, l'expansion temporaire de cellules activées par l'antigène peut induire la formation d'un répertoire oligoclonal, caractérisée par la présence de quelques Ig monoclonales émergeant discrètement du répertoire polyclonal.

3.2 Structure

Un monomère d'Ig est une glycoprotéine bivalente constituée par 4 chaînes polypeptidiques identiques deux à deux qui forment ainsi une structure en Y disposée de façon symétrique autour d'un axe double (Figure 2) :

- 2 chaînes lourdes identiques reliées entre elles par des ponts disulfures au niveau d'une zone charnière
- 2 chaînes légères identiques reliées chacune à une chaîne lourde par un pont disulfure et des interactions non-covalentes

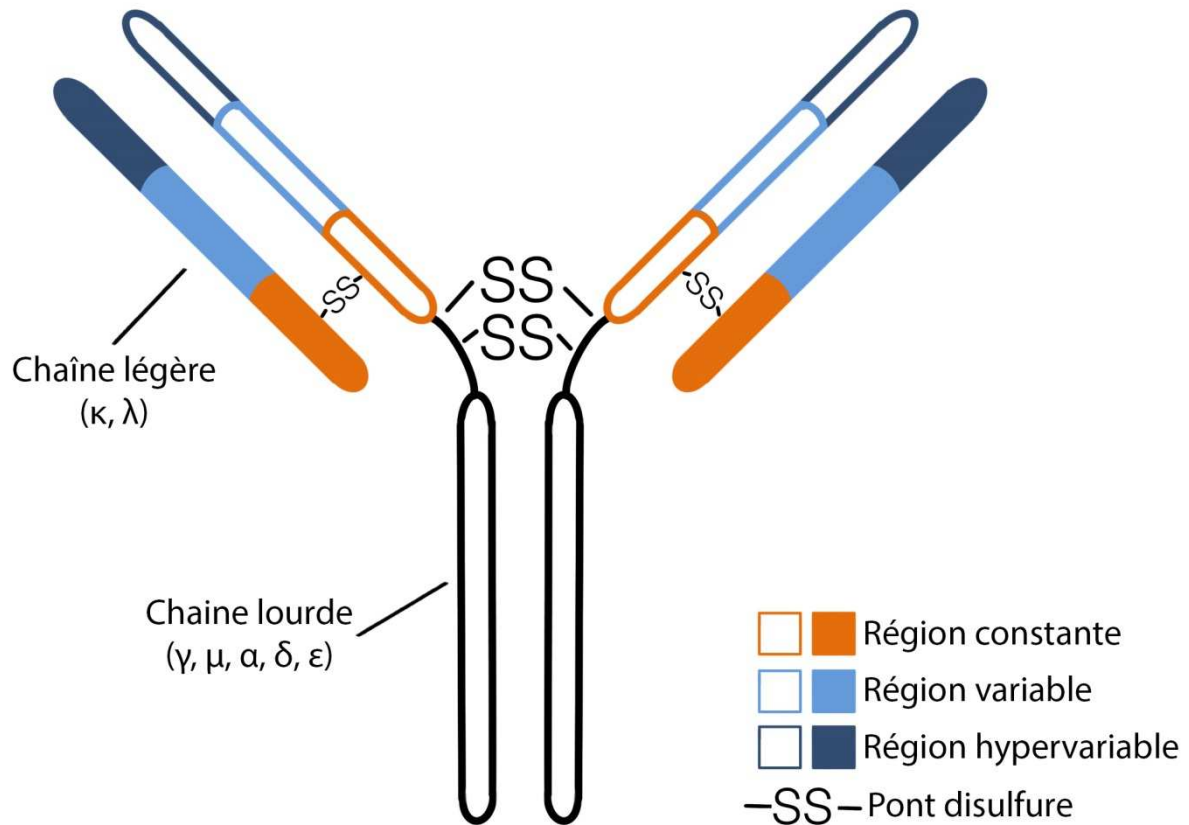


Figure 2. Structure d'une immunoglobuline

Au cours de la synthèse des Ig par les plasmocytes, des chaînes légères sont produites en parallèle des chaînes lourdes, permettant ainsi la constitution d'une Ig fonctionnelle.

Les chaînes lourdes et légères d'Ig ont chacune des régions constantes et des régions variables. Le domaine N-terminal de chaque chaîne lourde et légère comporte à son extrémité une zone dite « hypervariable » qui est spécifique de chaque Ig et qui permet la reconnaissance de l'antigène. Chez l'homme, les chaînes légères sont codées par deux loci différents, ce qui induit deux types de chaînes légères différenciables : κ et λ (1). Les Ig sont synthétisées avec des chaînes légères exclusivement κ ou λ, jamais les deux.

De la même façon, les petites différences de composition en acides aminés des domaines situés en C-terminal par rapport à la zone charnière déterminent le type (classe) d'Ig : IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE dont les chaînes lourdes correspondantes sont respectivement γ , α , μ , δ ou ϵ . De plus, il existe quatre sous-classes d'IgG (IgG 1 à 4) et deux d'IgA (IgA 1 et 2). La majorité des anticorps sécrétés sont des monomères, bien que plusieurs isotypes d'Ig forment des oligomères, tels que les IgA et IgM. Dans les cellules B, les chaînes lourdes, les chaînes légères κ et les chaînes légères λ sont chacune codées par des locus chromosomiques indépendants contenant de multiples copies de segments de gènes analogues.

Pour ce qui concerne les chaînes légères, le domaine variable de la chaîne légère est construit à partir de segments de gènes variables (V) et de jonction (J), tandis que le domaine constant est codé par un segment de gènes constant (C). Chez l'homme, il existe au moins 1011 variants structurels d'anticorps uniques permettant la reconnaissance d'un grand nombre d'antigènes différents (2).

Les chaînes légères κ sont construites à partir d'environ 40 segments de gène $V\kappa$ fonctionnels, d'un des 5 segments de gène $J\kappa$ et d'un seul gène $C\kappa$ (Figure 3). Les chaînes légères λ sont construites à partir de l'un des 30 segments du gène $V\lambda$ et de l'une des quatre paires (ou plus) de segments du gène $J\lambda$ fonctionnels et de gènes $C\lambda$. Des variations sont également trouvées dans une région du domaine variable correspondant aux 23 premiers acides aminés de la première région de la structure. À l'aide d'anticorps monoclonaux, quatre sous-groupes κ ($V\kappa$ I - $V\kappa$ IV) et six sous-groupes λ ($V\lambda$ I - $V\lambda$ VI) ont été identifiés (3).

Les structures spécifiques des sous-groupes influencent le potentiel de polymérisation des chaînes légères libres. Par exemple, l'amylose AL est associée à $V\lambda$ VI et la maladie des dépôts de chaînes légères à $V\kappa$ I et $V\lambda$ IV. Outre la recombinaison

génétique et l'hypermutation somatique des domaines variables, l'hétérogénéité des chaînes légères découle également de la variation isotypique et allotypique des domaines constants. Le génome humain contient un nombre variable de gènes constants λ , donnant lieu à de multiples isotypes de la chaîne λ , qui peuvent être distingués sérologiquement par l'expression des marqueurs Mcg et Kern-Oz (4). De plus, le génome contient un seul gène constant k pour lequel trois allotypes définis sérologiquement ont été identifiés, appelés Km1, Km2 et Km3 (5). Ces allotypes définissent trois allèles de Km, qui diffèrent par deux acides aminés.

Les Ig et leurs chaînes légères présentent donc une grande diversité de structure. C'est un élément expliquant les difficultés rencontrées dans les immunodosages et présentées plus loin.

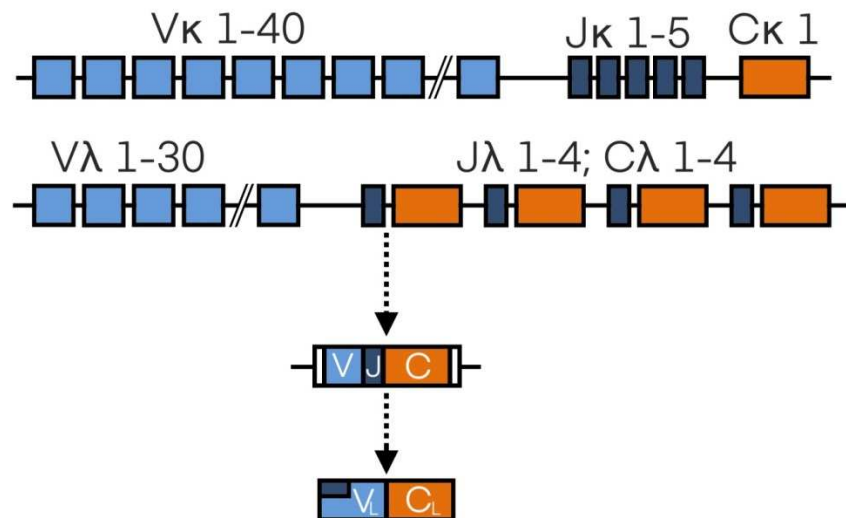


Figure 3. Support génétique d'une immunoglobuline

V : Gène variable
 J : Gène de jonction
 C : Gène constant

4 Chaînes légères libres sériques

Au cours de la production d'une Ig par le plasmocyte, il est toujours produit un excès de chaînes légères κ ou λ par rapport à la chaîne lourde de l'ordre de 40% (6), ce qui permet une conformation correcte de l'Ig complète. Cet excès est sécrété sous forme de chaînes légères libres, en anglais *free light chains* (FLC), en même temps que l'immunoglobuline entière, avec une proportion deux fois plus importante des FLC κ par rapport au FLC λ . Les FLC κ sont généralement monomériques, alors que les FLC λ ont tendance à être dimériques, reliés par des ponts disulfures ; cependant, des formes polymériques κ et λ peuvent se rencontrer. Les concentrations sériques de FLC reflètent l'équilibre entre leurs taux de production et de clairance rénale. Les FLC sont rapidement éliminées et métabolisées par les reins (Figure 4). D'une taille d'environ 25 kDa, les FLC monomériques, typiquement κ , sont éliminées en 2 à 4 heures. Les FLC dimériques d'environ 50 kDa, typiquement λ , sont éliminées en 3 à 6 heures, tandis que les polymères sont éliminés plus lentement (6,7). L'élimination des FLC peut être prolongée jusqu'à 2-3 jours chez les patients atteints d'insuffisance rénale (3,6–8). Ainsi, chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique, les concentrations de FLC κ et λ augmentent (9). Lorsque la clairance rénale diminue, une plus grande proportion de FLC est éliminée par pinocytose par les cellules du système réticulo-endothélial (10). Ce mécanisme de pinocytose élimine les FLC κ et λ de façon équivalente, de sorte que les concentrations relatives de FLC changent pour refléter plus précisément le taux plus élevé de production de κ : le rapport κ / λ augmente donc légèrement (9).

Au cours d'une infection chronique ou d'une maladie auto-immune, la moelle osseuse peut contenir 5 à 10% de plasmocytes sécréteurs d'Ig à l'origine d'une hypergammaglobulinémie polyclonale. Dans ce contexte, les concentrations sériques

de FLC peuvent être élevées mais le rapport κ/λ reste normal. En dehors de ces situations, on observe des anomalies de production d'Ig et/ou de FLC lors des gammopathies monoclonales. En effet, quand la prolifération plasmocytaire est monoclonale, un seul type de chaînes légères sera produit en excès et les FLC seront monoclonales avec un déséquilibre du ratio κ/λ .

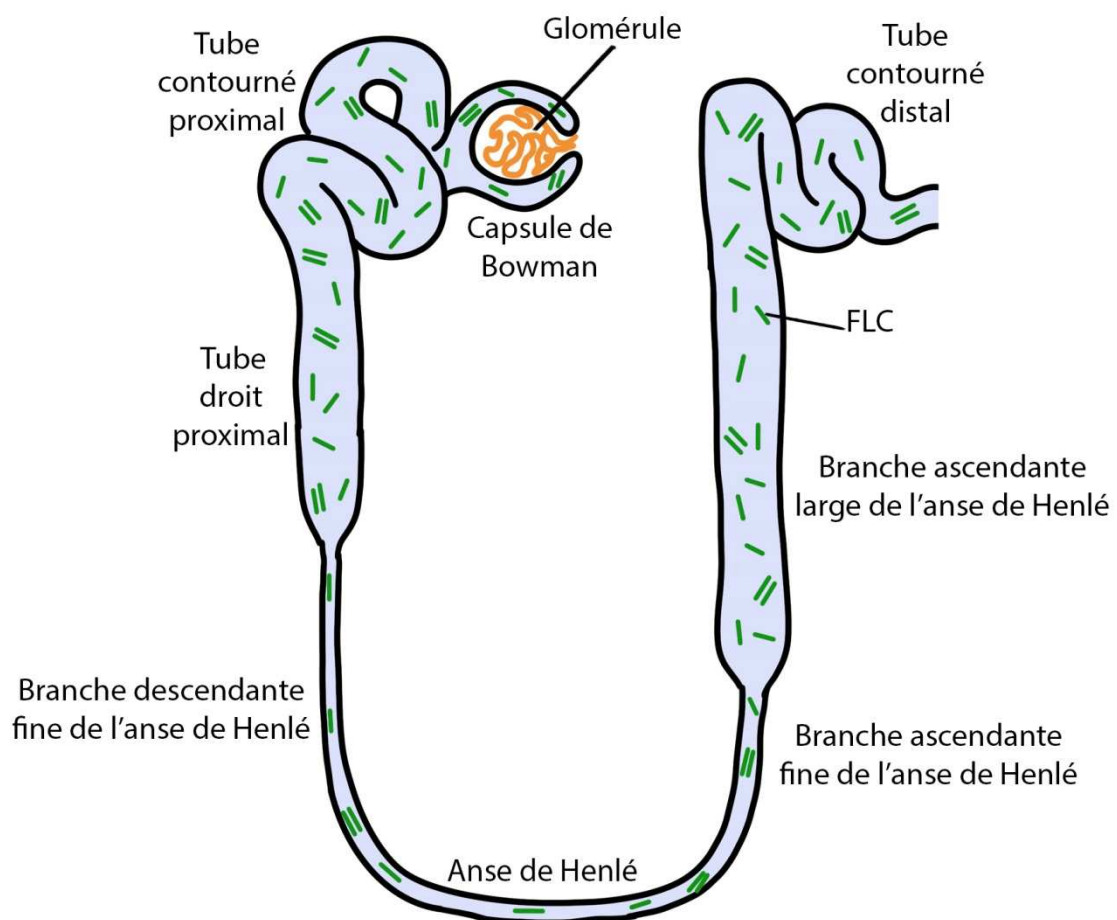


Figure 4. Filtration rénale des FLC

5 Gammopathies monoclonales

5.1 Généralités

En situation pathologique, l'expansion autonome d'un clone plasmocytaire peut conduire à l'émergence d'un composant monoclonal produit en grande quantité qui est soit une Ig complète, soit une chaîne légère libre, soit les deux ; soit exceptionnellement une chaîne lourde isolée. On parle alors de gammopathie ou de dysglobulinémie monoclonale, terme général regroupant différentes pathologies.

5.2 Myélome Multiple

Le MM est le deuxième cancer hématologique après le lymphome non hodgkinien et représente environ 1% de tous les cancers. Dans les populations caucasiennes, l'incidence annuelle est d'environ 60 pour un million et augmente avec l'âge. Le nombre de nouveaux cas diagnostiqués chaque année est d'environ 40 000 en Europe. Dans le monde, ce chiffre atteint environ 114 000 individus (11). Le MM est défini par la prolifération maligne d'un clone de cellules plasmocytaires matures dans la moelle osseuse, s'accompagnant de la sécrétion d'une Ig monoclonale complète ou de l'un de ses fragments (12) :

- Les MM à Ig intacte sont les plus fréquents (environ 80%)
- Les MM à FLC représentent 15 à 20% des cas.
- Les MM non-sécrétants sont rares (1 à 3% des cas) (13).

Selon les recommandations internationales (14), l'électrophorèse des protéines sériques et le dosage des FLC sériques constituent un moyen efficace de rechercher les troubles prolifératifs plasmocytaires monoclonaux.

Jusque 2014, le diagnostic de MM était uniquement basé sur la présence de cellules plasmocytaires monoclonales en excès dans la moelle osseuse, parallèlement à la présence d'une protéine monoclonale dans le sang ou les urines et au moins une atteinte apparentée d'organes ou de tissus appelés critères CRAB :

- Hypercalcémie (C)
- Insuffisance rénale, en anglais *Renal insufficiency* (R)
- Anémie (A)
- Lésions osseuses, en anglais *Bone lesions* (B)

Depuis, les recommandations internationales définissent également des critères de malignité pour le diagnostic du MM (15) qui incluent un envahissement médullaire plasmocytaire de plus de 60% et/ou plus d'une lésion focale en IRM et/ou un ratio chaînes légères impliquées / non impliquées ≥ 100 , en anglais *involved free light chains / uninvolved free light chains* (iFLC/uFLC) par la technique Freelite® (The Binding Site, Birmingham, UK) (Figure 5) (16–19). Leur but est de pouvoir prendre en charge plus rapidement un MM considéré asymptomatique avant les critères IMWG de 2014, mais présentant un risque d'évolution rapide en MM symptomatique (20,21).

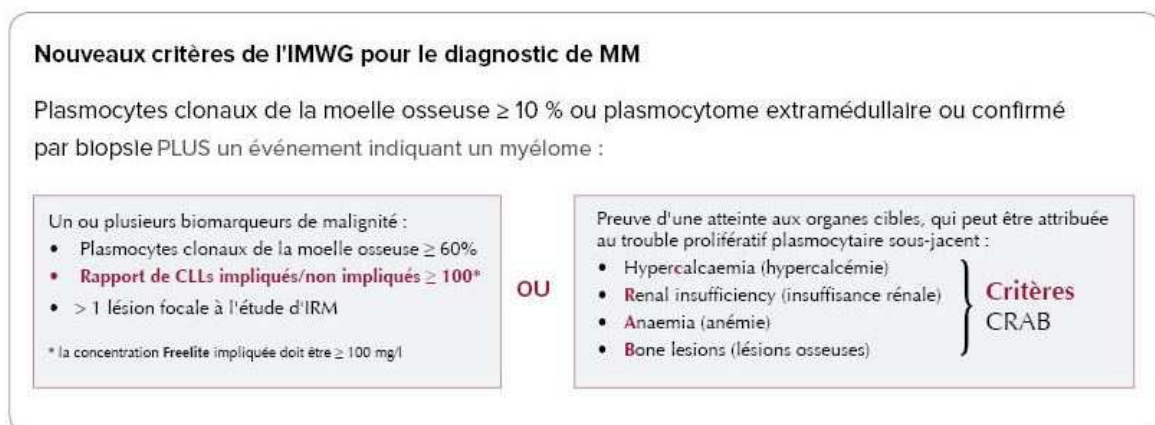


Figure 5. Critères de l'IMWG 2014 pour le diagnostic de myélome multiple d'après The Binding Site (Birmingham, UK).

5.3 Cas particulier du myélome à chaînes légères libres

Le myélome à FLC est une forme clinique marquée par la sécrétion d'une immunoglobuline incomplète où seules les chaînes légères κ ou λ sont synthétisées sans chaîne lourde associée. Ces chaînes légères libres monoclonales habituellement filtrées par le glomérule peuvent précipiter dans la lumière des tubules rénaux avec l'uromoduline (22) (protéine de Tamm-Horsfall) entraînant ainsi l'apparition de cellules géantes multinucléées à leur contact, un reflux urinaire vers les segments tubulaires d'amont, et une fibrose interstitielle proximale responsable d'une insuffisance rénale : on parle alors de néphropathie à cylindres myélomateux qui est la complication rénale la plus fréquente du MM (Figure 6). L'atteinte rénale peut cependant être d'origine multiple (hypercalcémie, dépôts amyloïdes, cryoglobuline) (23).

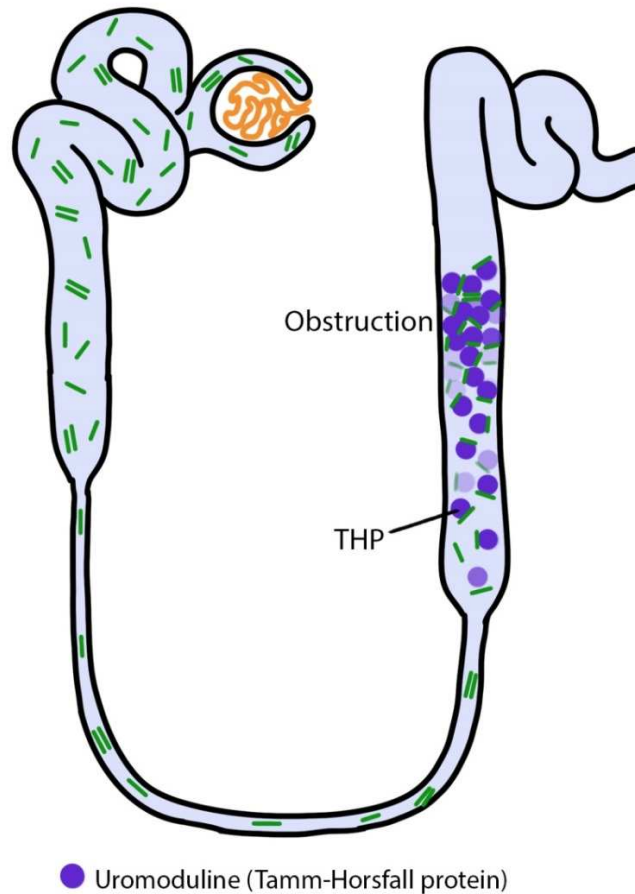


Figure 6. Physiopathologie de la néphropathie à cylindres myélomateux

5.4 Maladie de Waldenström

Le lymphome lymphoplasmocytaire est un lymphome non hodgkinien (LNH) rare à cellules B matures caractérisé par la présence de cellules lymphoplasmocytaires dans la moelle osseuse (24). La présence en plus d'une protéine IgM monoclonale dans le sérum définit la maladie de Waldenström (MW) (25). Le taux d'incidence de la MW est d'environ 5 cas par million d'habitants et par an (26). L'IgM sérique est appelée également macroglobuline de par sa capacité à polymériser en pentamères, expliquant que la MW est encore appelée « macroglobulinémie de Waldenström » ; cette polymérisation peut impacter la quantification de l'IgM au laboratoire (27) et être responsable d'interférences sur d'autres paramètres biologiques (28,29).

5.5 MGUS

La gammopathie monoclonale de signification indéterminée, en anglais *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance* (MGUS), se caractérise par la présence d'une protéine monoclonale dans le sérum d'individus asymptomatiques ne répondant pas aux critères de diagnostic du myélome multiple, de l'amylose AL, de la maladie de Waldenström ou d'autres étiologies malignes. Une MGUS est retrouvée chez environ 3% des sujets de plus de 50 ans et 5% chez ceux de plus de 70 ans (30). Alors que la plupart des patients atteints de MGUS sont stables et restent asymptomatiques, une petite proportion peut évoluer vers une pathologie maligne telle que le MM avec un risque annuel d'environ 0,5 à 1% (31–33). L'IMWG distingue trois catégories ; les MGUS non-IgM (IgG ou IgA), les MGUS IgM et MGUS à FLC (15). Ces derniers ont un risque d'évolution élevé vers un myélome à chaînes légères (34,35). Plusieurs études ont montré un lien entre un ratio κ/λ anormal et la progression vers un MM de patients suivis pour une MGUS (33,36,37).

5.6 Amylose AL

L'amylose AL, en anglais *light-chain amyloidosis*, dont le taux d'incidence est d'environ 12 cas par million d'habitants et par an (38), est un trouble de la conformation protéique caractérisé par une accumulation de chaînes légères libres monoclonales ou de leurs fragments, sous forme de fibrilles amyloïdes insolubles extra-cellulaires occasionnant des lésions fonctionnelles et structurelles d'organes. On retrouve classiquement un clone plasmocytaire sécrétant des FLC monoclonales, le plus souvent du sous-type λ (39).

Le diagnostic de l'amylose repose initialement sur une biopsie tissulaire où les dépôts amyloïdes se colorent au rouge Congo et produisent une biréfringence pathognomonique jaune-verte en lumière polarisée ; Il est complété par le typage du dépôt par immunohistochimie, immunofluorescence ou *immunogold* (40,41). L'amylose AL est ainsi une maladie systémique qui touche principalement le rein (74%), le cœur (60%), le foie (27%) et le système nerveux périphérique (22%) (42). La nature de la chaîne légère impliquée influe sur le spectre d'organes atteints : les chaînes κ affectent principalement le tractus digestif et le foie, tandis que les chaînes λ vont davantage toucher le rein (39). La distribution tissulaire peut être aussi associée aux caractéristiques structurales de la chaîne monoclonale impliquée qui peut favoriser sa potentielle polymérisation (43).

5.7 Leucémie lymphoïde chronique

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) correspond à une prolifération monoclonale de lymphocytes B matures, de siège médullaire et sanguin. Les lymphocytes sont le plus souvent normaux morphologiquement, mais anormaux au plan fonctionnel. La LLC peut s'accompagner dans environ 10% des cas d'une dysglobulinémie monoclonale, le plus souvent à IgM.

5.8 Lymphome malin non-hodgkinien

Le lymphome malin non-hodgkinien est un syndrome lymphoprolifératif à cellules matures T ou B qui peut s'accompagner d'une gammopathie monoclonale autre qu'une protéine monoclonale IgM (cas de la MW).

6 FLC : marqueurs diagnostiques et pronostiques dans les pathologies monoclonales plasmocytaires

À ce jour, les dosages de FLC sont essentiellement utilisés dans l'exploration du MM et de l'amylose AL. La majorité des patients atteints de MM produisent une immunoglobuline monoclonale complète qui est utilisée pour surveiller la réponse au traitement. Cependant des études ont rapporté que 96% de ces patients produisent également des FLC monoclonales détectables dans le sérum (Figure 7) (44).

- De nombreuses études ont montré la valeur pronostique des FLC lors du diagnostic de MM (45–47) amenant ainsi l'introduction du rapport iFLC/uFLC par l'IMWG en 2014 (15).
- Le dosage des FLC est également un marqueur de réponse au traitement dans le cadre du MM, en effet, depuis 2016, l'IMWG intègre le ratio κ/λ dans les critères de réponse aux traitements (48) (Table 1) qui est un indicateur pronostique fort de la survie du patient à long-terme (49). De plus, la demi-vie courte des FLC comparativement à celles des immunoglobulines complètes permet de donner une indication plus précoce sur la réponse aux traitements produisant une réduction tumorale rapide comme le bortézomib (50,51).
- Le dosage des FLC est également essentiel dans la réponse hématologique de l'amylose AL avec la notion de dFLC (iFLC – uFLC) (52) (Table 2). La cinétique de la diminution de la dFLC est aussi importante d'un point de vue pronostique pour le patient (53).

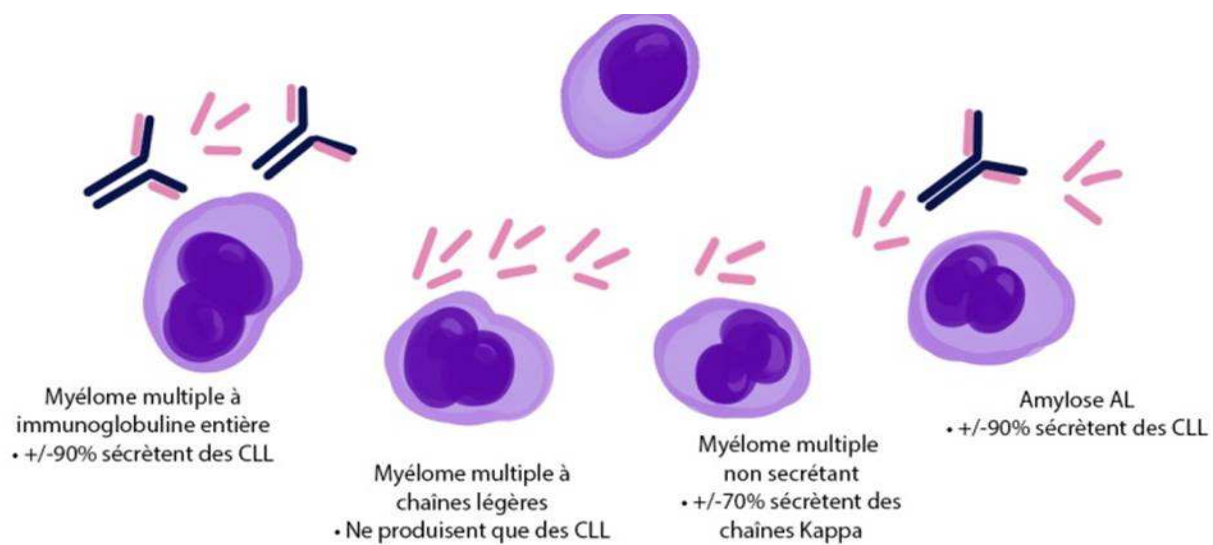


Figure 7. Production de FLC dans le cadre de gammopathies monoclonales

Table 1. Critères pour l'évaluation de la réponse hématologique du MM après traitement, basés sur les recommandations internationales de l'IMWG

MYÉLOME MULTIPLE

| CATÉGORIE DE RÉPONSE | Définition |
|--|---|
| RÉPONSE COMPLETE (RC) | <ul style="list-style-type: none"> - Immunofixation sérique et urinaire négatives avec disparition des plasmocytomes des tissus mous et plasmocytose médullaire <5% - En cas de maladie uniquement mesurable par le taux de FLC : κ/λ normal en complément des autres critères |
| RÉPONSE COMPLETE STRINGENTE (RCS) | <ul style="list-style-type: none"> - Réponse complète avec κ/λ normal - Absence de cellules clonales dans la moelle osseuse en immunohistochimie ou immunofluorescence. |
| TRÈS BONNE RÉPONSE PARTIELLE (TBRP) | <ul style="list-style-type: none"> - Composant monoclonal détectable dans le sang ou dans les urines en immunofixation mais pas à l'électrophorèse - Ou réduction d'au moins 90% du composant monoclonal sérique avec un composant monoclonal urinaire <100 mg/24h. <p>En cas de maladie uniquement mesurable par le taux sérique de FLC : réduction de plus de 90% de la dFLC</p> |
| RÉPONSE PARTIELLE (RP) | <p>Réduction d'au moins 50% du composant monoclonal sérique et réduction du composant monoclonal urinaire d'au moins 90 % (ou <200 mg/24h).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Si le composant monoclonal n'est pas mesurable dans le sang ou dans les urines : réduction d'au moins 50% de la dFLC. - Si le composant monoclonal et les FLC ne sont pas mesurables : diminution d'au moins 50% de la plasmocytose médullaire (à condition d'un pourcentage initial de plasmocytes $\geq 30\%$). |
| MALADIE STABLE (MS) | Absence des critères de RC, RCS, TBRP, RP et de maladie progressive. |
| MALADIE PROGRESSIVE (MP) | <p>Augmentation de 25% par rapport à la valeur la plus basse d'un ou de plusieurs des marqueurs suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Composant monoclonal sérique - Composant monoclonal urinaire - Plasmocytose médullaire <p>Ou apparition de lésions osseuses ou augmentation de taille des lésions osseuses ou plasmocytomes existants.</p> <p>Chez les patients dont le composant monoclonal n'est pas mesurable dans le sang ou dans les urines :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la dFLC d'au moins 100 mg/L |

Table 2. Critères pour l'évaluation de la réponse hématologique de l'amylose AL après traitement, basés sur les recommandations internationales du consortium de la recherche clinique sur l'amylose AL (52).

AMYLOSE AL

| CATEGORIE DE RÉPONSE | Définition |
|-------------------------------------|---|
| RÉPONSE COMPLÈTE | Normalisation de la concentration sérique des chaînes légères libres et immunofixation négative dans le sérum et les urines |
| TRÈS BONNE RÉPONSE PARTIELLE | dFLC <40mg/L |
| RÉPONSE PARTIELLE | Diminution de la dFLC d'au moins 50% |
| NON-RÉPONDEUR | Diminution de la dFLC de moins de 50% |

7 Les méthodes de dosages des FLC

7.1 Historique

L'identification des molécules κ et λ est devenue possible avec l'utilisation d'anticorps spécifiques de chaque type de protéine. L'immunodiffusion fut initialement utilisée (54), puis l'immunoélectrophorèse (55), suivies de l'immunodiffusion radiale et enfin la photométrie avec la turbidimétrie et la néphélémétrie. Les premières tentatives de dosage des chaînes légères libres sériques remontent à 1975 par chromatographie (56–58), néanmoins ces tests étaient difficilement adaptables pour une utilisation en routine.

Par la suite, les études se sont concentrées sur la mise au point d'anticorps dirigés contre des épitopes situés entre l'interface chaînes lourdes / chaînes légères pour ne cibler que les formes libres. Les dosages radio-immunologiques et immuno-enzymatiques utilisant des antisérums polyclonaux dirigés contre les FLC ont été développés pour analyser des échantillons d'urine, mais la spécificité n'était pas suffisante pour des mesures sériques (59,60) ; de plus la polymérisation hétérogène des FLC fut responsable d'artéfacts de mesure (61) ; en effet, seuls quelques épitopes à domaine constant sont disponibles pour la reconnaissance des FLC et la formation de multimères, en particulier pour les chaînes λ , réduit encore le nombre de liaisons possibles (62,63).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux était une approche évidente pour améliorer la spécificité de l'analyse (Figure 8), mais les réactifs étaient difficiles à développer et leur utilisation était initialement limitée aux dosages radio-immunologiques et aux analyses immuno-enzymatiques (64–66).

En 2001, des dosages immunologiques basés sur des anticorps polyclonaux ont finalement été développés (Figure 8), permettant de mesurer les FLC à des concentrations sériques normales (67). Par la suite, des concentrations élevées de FLC étaient retrouvées chez 224 patients atteints de MM à chaînes légères et présentant une protéinurie de Bence-Jones confirmant ainsi l'efficacité du dosage (68).

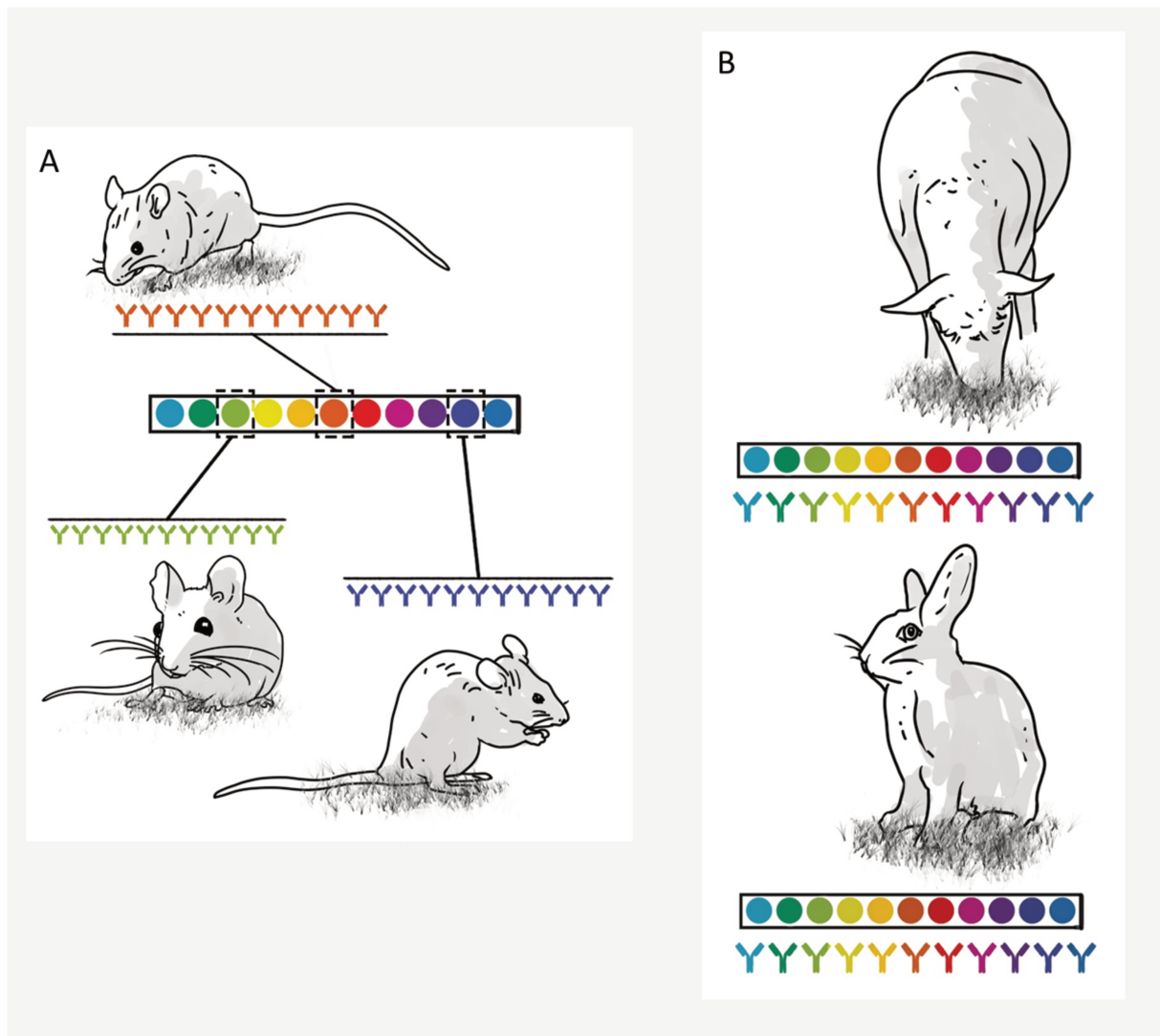


Figure 8. Schématisation d'une production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux à partir d'animaux
A : Anticorps monoclonaux
B : Anticorps polyclonaux

7.2 Freelite®

Le dosage Freelite® (The Binding Site, Birmingham, UK) est un test photométrique en milieu trouble développé en 2001 permettant la quantification des FLC (67). Il utilise des antisérums polyclonaux de moutons immunisés contre des chaînes κ et λ , purifiées, provenant d'échantillons d'urine humaine contenant une protéinurie de Bence-Jones.

Ces anticorps sont dirigés contre des épitopes des FLC situés à l'interface entre les chaînes légères et lourdes des immunoglobulines qui ne sont accessibles que lorsque la chaîne légère est libre ce qui offre la possibilité de reconnaître un large spectre de protéines monoclonales. Ce test repose sur l'apparition d'un trouble dans le milieu réactionnel lié à la formation d'un complexe immun lors de l'ajout d'anticorps anti- κ ou anti- λ dans le sérum du patient (Figure 9). Une source lumineuse traverse le milieu et la lumière transmise parvient à un détecteur : l'intensité lumineuse transmise diminue de façon inversement proportionnelle à la concentration en chaînes légères libres sériques ; cette technique correspond à la turbidimétrie.

Il est également possible de mesurer la lumière diffusée par le milieu réactionnel ce qui correspond cette fois à la néphélémétrie. Dans ce cas, l'intensité de la lumière diffusée augmente de façon proportionnelle à la concentration en FLC.

Le test Freelite® dose les FLC par turbidimétrie sur les analyseurs SpaPLUS®, Optilite® (The Binding Site, Birmingham, UK) et Cobas® (Roche, Bâle, Suisse) ou par néphélémétrie sur les analyseurs BNII®, BN ProSpec® (Siemens, Munich, Allemagne), IMAGE® 800 (Beckman Coulter, Brea, USA) et MININEPHplus® (The Binding Site, Birmingham, UK).

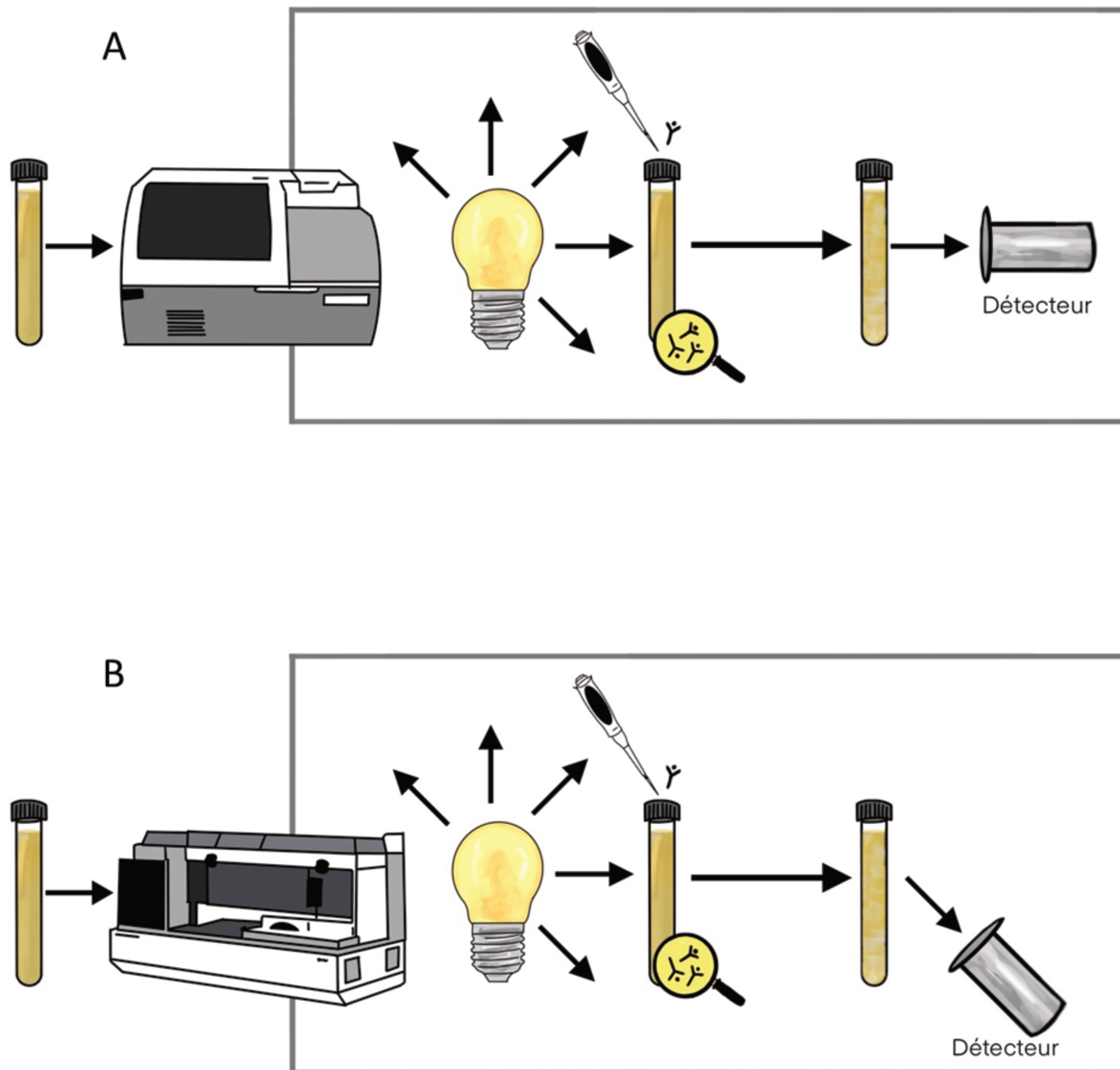


Figure 9. Schématisation des techniques photométriques en milieu trouble
 A : Turbidimétrie
 B : Néphélémétrie

7.3 N-Latex FLC®

Le dosage N-Latex® FLC (Siemens, Munich, Allemagne) est un test néphélométrique de quantification des FLC disponible uniquement sur les analyseurs BNII®, BN ProSpec® et Atellica NEPH 630® de ce fournisseur. Développé en 2011 (69), il utilise des antisérums monoclonaux de souris. Des lymphocytes B sont ainsi isolés et combinés avec une lignée immortelle pour former un hybridome qui produira

l'anticorps de spécificité souhaitée. Les anticorps sont ensuite purifiés par chromatographie à débit rapide et couplés par liaison covalente à des particules de polystyrène micronisées. Enfin, différents lots de particules sont mélangés afin de garantir une collection d'anticorps monoclonaux dans le réactif final qui puisse détecter l'ensemble des chaînes κ et λ .

7.4 Diazyme's Human Free Light Chain Assays[®]

Le dosage Diazyme's Human Free Light Chain Assays[®] (Diazyme laboratories, Poway, USA) est un nouveau test turbidimétrique de quantification des FLC disponible sur les analyseurs Cobas[®], Advia 1800 (Siemens, Munich, Allemagne) et Architect C[®] (Abbott, Chicago, USA) développé en 2018 (70) qui utilise des antisérums polyclonaux de lapin.

7.5 KλOneous[®] Free Light Chains

Le dosage κλOneous[®] Free Light Chains (Trimero Diagnostics, Barcelone, Espagne) est un test photométrique en milieu trouble de quantification des FLC disponible par turbidimétrie sur l'analyseur Advia 1800 (Siemens, Munich, Allemagne) ou par néphélométrie sur les analyseurs BNII[®], BN ProSpec[®] (Siemens, Munich, Allemagne) et IMMAGE[®] 800 (Beckman Coulter, Brea, USA) qui utilise des antisérums polyclonaux.

7.6 Seralite[®]

Le dosage Seralite[®] (Abingdon Health, Sand Hutton, UK), développé en 2016 (71), est un test immunochromatographique, en anglais *lateral flow test*, de quantification des

FLC basé sur une inhibition compétitive. Il utilise des anticorps monoclonaux de souris. Cette technologie repose sur un principe de capillarité via une membrane de nitrocellulose (Figure 10) :

- L'échantillon s'écoule le long du dispositif de test en passant à travers des particules d'or coatées avec un anticorps anti- κ ou anti- λ avant d'atteindre la zone de test contenant des FLC.
- Plus la concentration en FLC de l'échantillon est élevée, moins le nombre de conjugués d'or pouvant former un complexe immun avec la ligne de test κ ou λ est important, si bien que l'intensité de la bande de test est inversement proportionnelle à la concentration en FLC.
- La lecture est ensuite automatisée avec l'analyseur ADxLR5[®] Reader du même fournisseur.

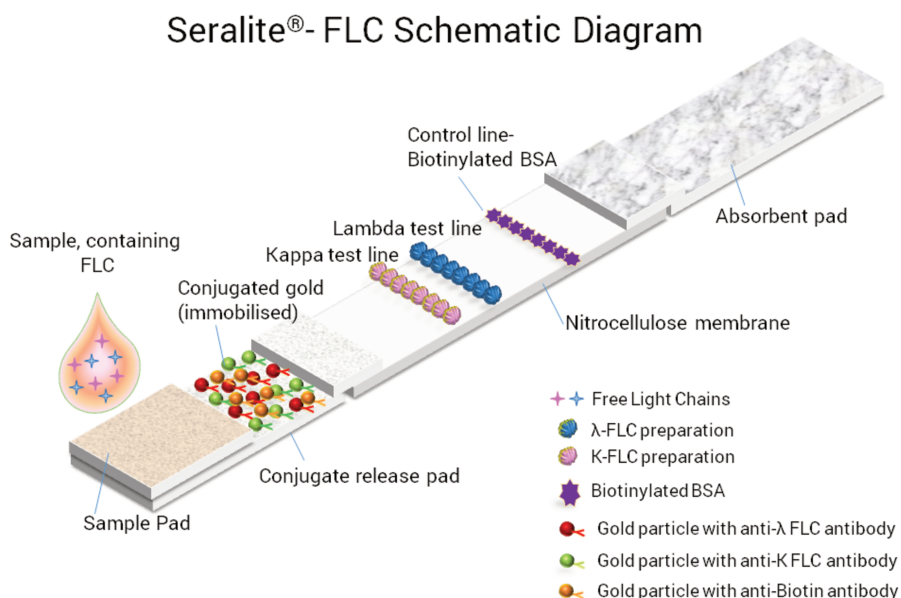


Figure 10. Schématisation de la technique immunochromatographique Seralite[®] d'après Abingdon Health (Sand Hutton, UK).

7.7 Sebia FLC®

Le dosage Sebia FLC® (Sebia, Lisses, France) que nous évaluons dans ce travail, est un nouveau test immunoenzymatique ELISA de quantification des FLC sur l'analyseur AP22 ELITE (DAS, Rome, Italie). Il a été développé en 2017 (72), et utilise des antisérums polyclonaux de lapin.

Ce test ELISA repose sur l'ajout du sérum du patient, fortement dilué au préalable au 1/1000, sur une microplaque coâtée avec un anticorps dit de capture anti-k ou anti- λ en excès (Figure 11) : ceci induit la formation de complexes immuns après incubation de l'échantillon. Après lavage, un anticorps secondaire conjugué à une enzyme (peroxydase) est ajouté en excès. Cet anticorps est spécifique d'un autre épitope de l'antigène ce qui crée un « sandwich ». La plaque est rincée à nouveau pour éliminer l'excès du deuxième anticorps. Le substrat de la peroxydase est ensuite ajouté. Une fois le substrat clivé, une coloration jaune apparaît. Enfin, la lecture de la densité optique est réalisée par spectrophotométrie d'absorbance à 450 nm.

L'intensité du signal est ainsi directement proportionnelle à la concentration en FLC, elle-même obtenue à partir d'une courbe de calibration issue de calibrateurs de concentrations connues analysés sur la même microplaque que le sérum du patient.

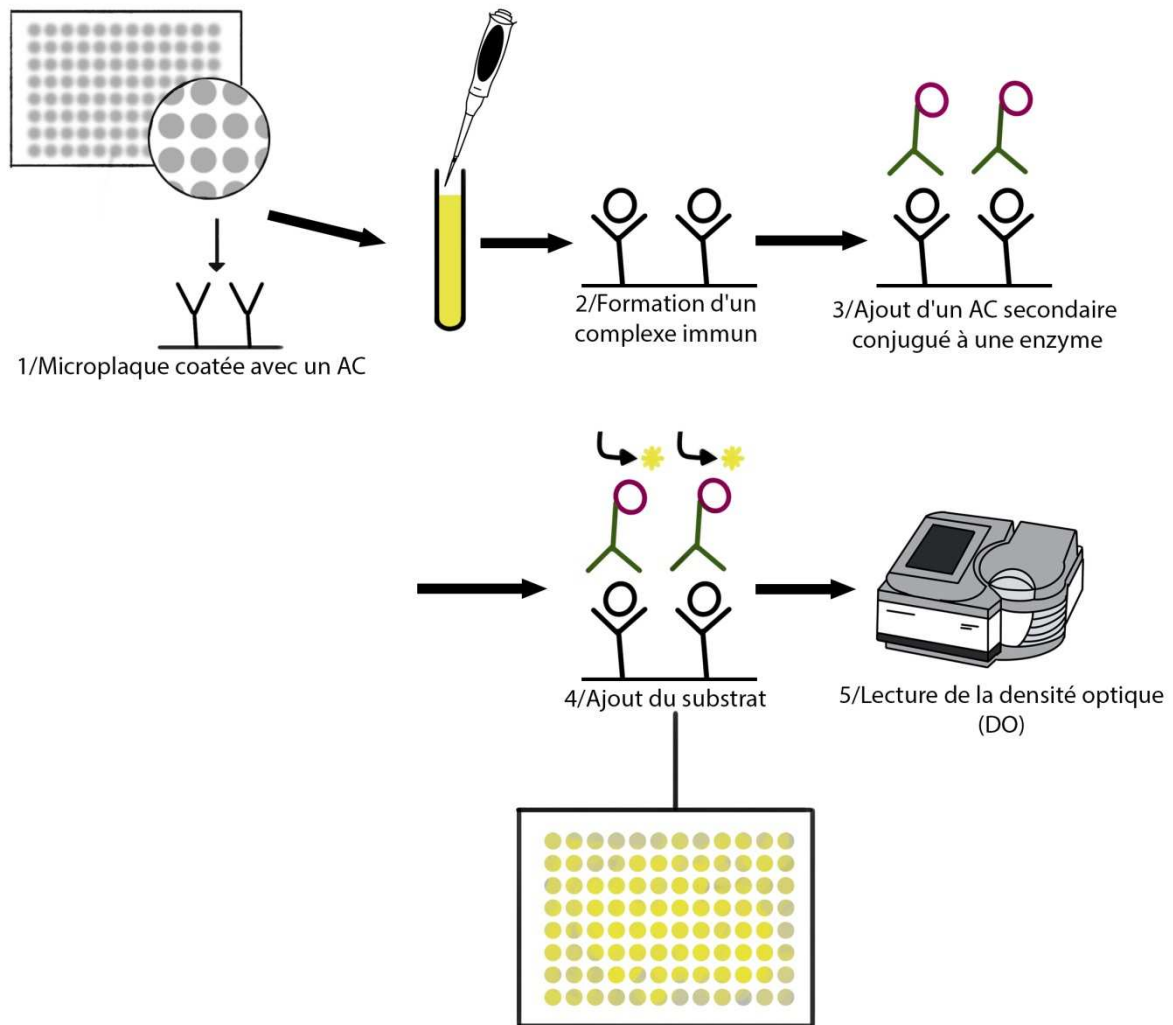


Figure 11. Schématisation d'une technique ELISA

7.8 Difficultés des méthodes de dosage des chaînes légères libres

Les dosages des chaînes libres κ et λ restent délicats, notamment en raison du phénomène d'excès d'antigène, de la variabilité inter-lot, du manque de linéarité aux paliers de dilution des techniques, de la possible polymérisation des FLC et de l'absence de standardisation entre les techniques.

a) Le phénomène d'excès d'antigène, ou phénomène de zone, se produit lorsqu'un antigène est présent à des niveaux si élevés qu'il interfère avec la réticulation antigène-anticorps (Figure 12), entraînant la formation de complexes immuns plus petits, ce qui conduit à des résultats sous-estimés dans les techniques photométriques en milieu trouble. En effet, selon la courbe d'Heidelberger et Kendall, une intensité de signal y peut correspondre à deux concentrations d'antigène x_1 ou x_2 (Figure 13). C'est pourquoi la zone de mesure doit se limiter à la partie ascendante de la courbe (zone d'excès d'anticorps).

Certaines études ont essayé de quantifier l'incidence de ce phénomène lors des dosages et ont rapporté une fréquence de 0,12% à 5,4% (73–75) ; les concentrations mesurées en chaînes légères libres présentent une grande amplitude de valeurs (0.5 mg/L à plus de 100000 mg/L) : cette gamme de mesure est parmi les plus importantes retrouvées pour une protéine, si bien qu'une proportion non négligeable d'échantillons peut être impactée par l'excès d'antigène. De par l'hétérogénéité des formes existantes en chaîne κ et λ et les différents points d'équivalences associés, il est très difficile de prédire la concentration de survenue d'un excès d'antigène.

Les analyseurs SpaPLUS® et Optilite® disposent d'un système de détection d'excès d'antigène par étude de la cinétique de réaction en 3 temps : les échantillons avec une cinétique de réaction très rapide sont susceptibles de présenter un excès d'antigène. Ils sont signalés à l'opérateur et une dilution supplémentaire est réalisée (76). Néanmoins, ce système est parfois pris en défaut et de nombreux cas d'excès d'antigène ont été rapportés dans la littérature (77–79).

Ces situations illustrent l'importance de travailler dans la zone d'excès d'anticorps. De plus, le biologiste doit pouvoir interpréter les dosages de FLC conjointement aux résultats de l'électrophorèse et de l'immunofixation sériques.

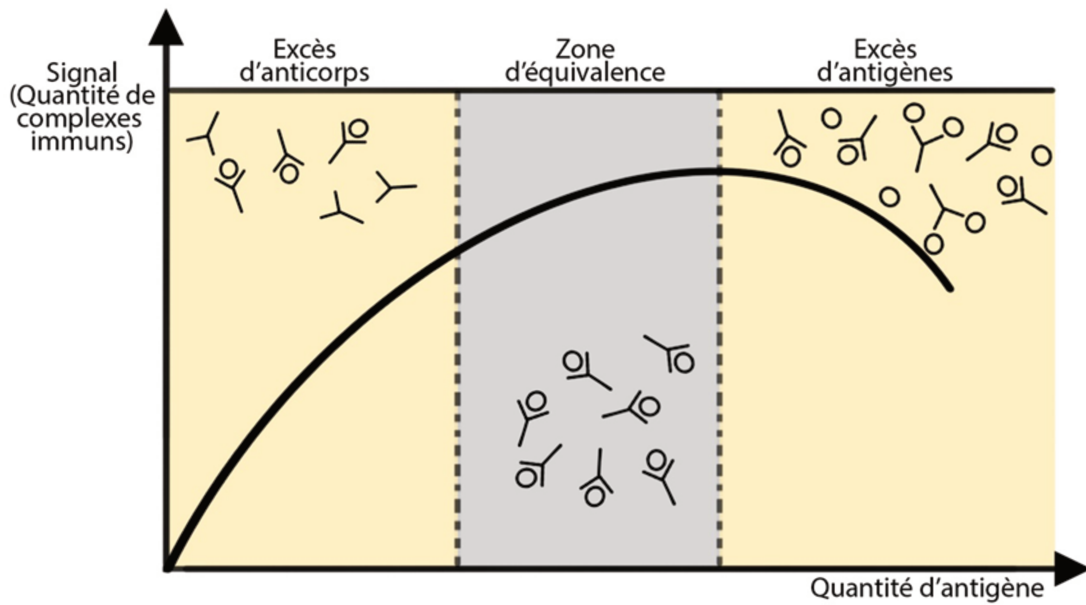


Figure 12. Mécanisme de l'excès d'antigène d'après Heidelberger et Kendall

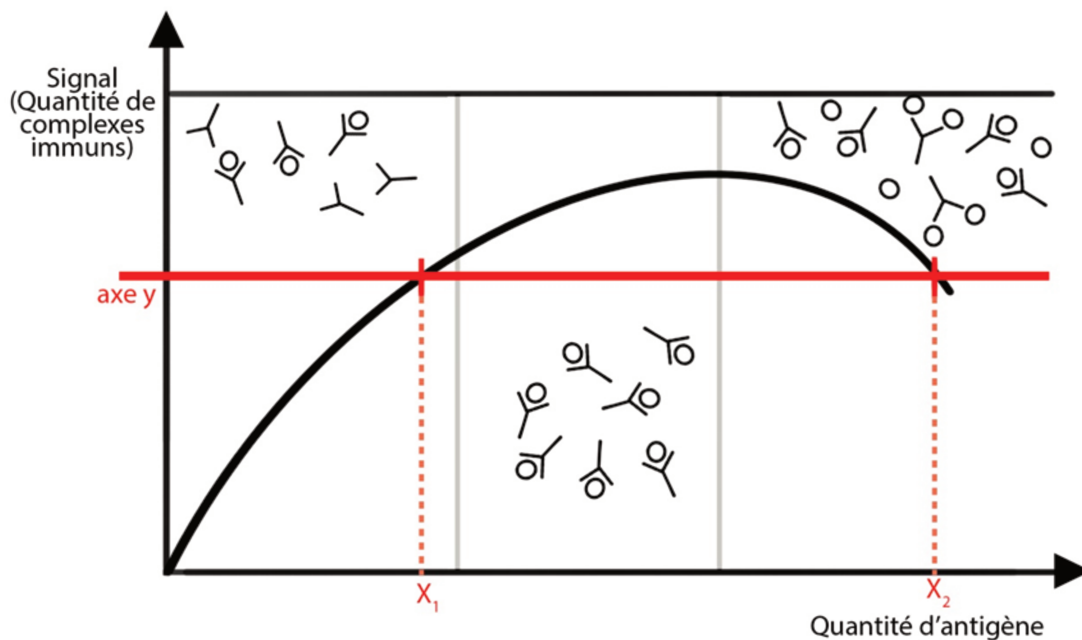


Figure 13. Conséquence de l'excès d'antigène

- b) Une autre difficulté réside dans la variabilité inter-lot des anticorps polyclonaux : le suivi des patients s'effectuant la plupart du temps sur plusieurs années, il est essentiel de minimiser toute modification de la composition des réactifs. Le fournisseur The Binding Site garantit une homologie d'au moins 90% entre deux lots de réactifs successifs.
- c) Le manque de linéarité aux paliers de dilution est un problème connu du dosage des FLC par méthodes photométriques (80). Ce phénomène correspond au cas où la concentration en FLC de l'échantillon mesuré à différentes dilutions peut donner des résultats sensiblement différents.
- d) Le phénomène de polymérisation des chaînes légères agit comme une cible multi-antigénique dans les tests d'immunoprécipitation ce qui accélère la formation d'agrégats et peut conduire à une surestimation des concentrations (81). Les concentrations mesurées paraissent alors discordantes avec le profil électrophorétique et/ou d'immunofixation.
- e) La méthode Freelite® est aujourd'hui la seule technique évaluée dans les recommandations internationales de l'IMWG ce qui pose le problème de la transférabilité des résultats lorsqu'une autre méthode est utilisée.

8 Objectifs

Le coffret Sebia FLC® récemment commercialisé adopte une nouvelle approche dans le dosage des chaînes légères libres en s'appuyant sur une technique ELISA sandwich plutôt que sur la turbidimétrie ou la néphélométrie. La meilleure sensibilité attendue de ce nouveau test permet de travailler à des dilutions 100 fois plus importantes que Freelite®, si bien que le risque d'excès d'antigène devrait s'en trouver diminué.

L'objectif de ce travail est d'étudier les performances analytiques du coffret Sebia FLC® encore peu documenté par rapport au coffret Freelite®, en réalisant une validation de méthode d'après les recommandations internationales, dans le contexte de l'activité du laboratoire de Biochimie des protéines du CHU de Lille.

Nous voulons également vérifier les intervalles de référence du fournisseur par rapport à notre recrutement de patients hospitaliers.

Enfin, nous souhaitons également étudier la transférabilité de cette méthode dans la prise en charge du myélome multiple et de l'amylose AL compte-tenu du fait que les référentiels ont été établis avec la méthode Freelite®.

Matériel et méthodes

1 Population étudiée

Nous avons inclus 1155 patients ayant fait l'objet d'une demande de dosage des FLC sériques dont les sérums ont été recueillis de façon prospective au laboratoire spécialisé de Biochimie des Protéines du CHU de Lille sur une période allant du 27 juin 2017 au 15 juillet 2019. Ces sérums ont été obtenus après prélèvement sur un tube sec Vacutainer® avec activateur de coagulation de 4 mL (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) et centrifugation à 3000 rpm pendant 10min.

Nous avons également suivi 96 patients de cette cohorte initiale de façon randomisée afin d'analyser l'évolution de leur ratio κ/λ ou de la dFLC du 1^{er} décembre 2017 au 15 juillet 2019. Cette étude a pour but de vérifier que les résultats obtenus par la technique Sebia FLC® renseignent sur le suivi du patient de façon identique à ceux de la méthode Freelite®.

Enfin, nous avons recueilli les données épidémiologiques de notre cohorte (date de naissance, sexe, présence d'une gammopathie monoclonale, fonction rénale) au moyen du système de gestion de l'information du laboratoire MOLIS® (CompuGroup Medical, Koblenz, Allemagne). Toutes les données ont été extraites de la base de données sur la biologie humaine précédemment autorisée par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (n°DC-2008-642). Par conséquent, aucun consentement éclairé écrit n'était nécessaire pour cette étude.

2 Dosage des chaînes légères libres sériques

Les tests Freelite® (réf. LK016.S et LK018.S, The Binding Site, Birmingham, UK) ont été réalisés par turbidimétrie sur automate SpaPLUS®. La dilution initiale du sérum du patient est de 1/10 (Figure 14) : lorsque la limite inférieure de détection est atteinte, un nouveau passage de l'échantillon est programmé au 1/1 ; et lorsque la limite supérieure de détection est atteinte ou que l'échantillon est susceptible de présenter un excès d'antigène, l'automate permet d'effectuer des passages à une dilution automatisée de 1/100 puis manuelle de 1/1000 ou 1/10 000. L'intervalle de référence de la technique Freelite® est de 3,3-19,4 mg/L pour les FLC κ , de 5,71-26,3 mg/L pour les FLC λ et de 0,26-1,65 pour le ratio κ/λ (82)

Les tests Sebia FLC® (réf. N°5100 et 5101, Sebia, Lisses, France) ont été réalisés sur automate AP22 ELITE. La dilution initiale est de 1/1000 (Figure 14) : lorsque la limite inférieure de détection est atteinte, un nouveau passage de l'échantillon est programmé à une dilution de 1/250 ; et lorsque la limite supérieure de détection est atteinte, l'automate permet d'effectuer des passages à des dilutions automatisées de 1/10 000 puis 1/100 000. Ces dilutions supplémentaires sont à réaliser lors d'une nouvelle série ou peuvent-être anticipées en complément de la dilution initiale sur la même micro-plaque. L'intervalle de référence de la technique Sebia FLC® est de 5,2-15,3 mg/L pour les FLC κ , de 8,2-18,1 mg/L pour les FLC λ et de 0,37-1,44 pour le ratio κ/λ (72).

Le nombre de dilutions réalisées pour chaque échantillon a été comptabilisé afin d'évaluer le gain possible pour le laboratoire.

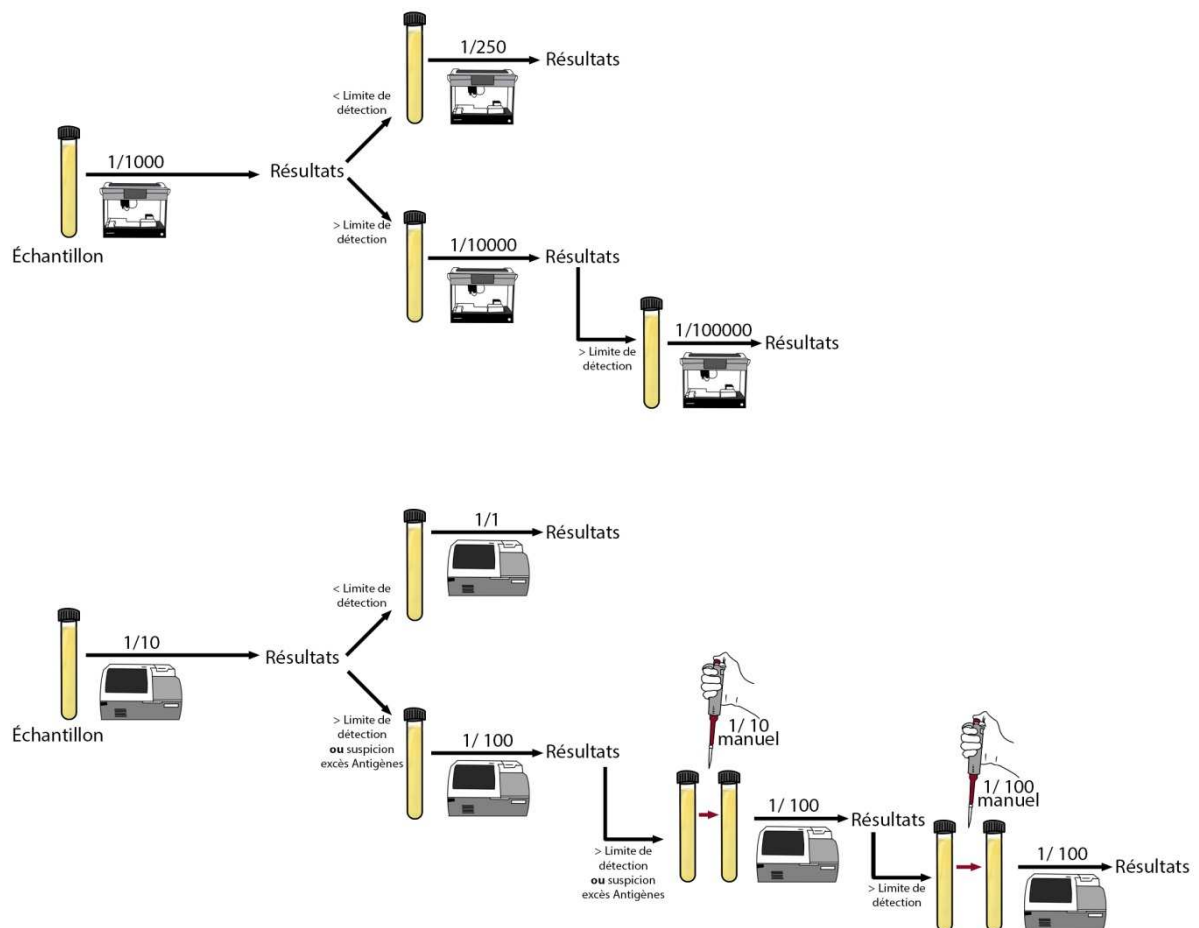


Figure 14. Organigramme de dilution de la technique Sebia FLC[®] sur DAS AP22 ELITE et de la technique Freelite[®] sur SpaPLUS[®]

3 Validation de la méthode Sebia FLC[®]

La norme ISO 15189 est une norme internationale spécifique aux laboratoires de biologie médicale (LBM). Elle traduit les exigences particulières concernant la qualité et la compétence professionnelle et couvre la totalité des activités du laboratoire afin de garantir la fiabilité des examens de Biologie médicale réalisés et la qualité de la prestation médicale offerte par un LBM. L'article L. 6221-1 du Code de la santé publique rend obligatoire l'accréditation des LBM sur l'ensemble de l'activité qu'ils réalisent d'ici 2020. Cette accréditation est délivrée par le Comité français d'accréditation (COFRAC). Nous avons donc suivi la méthodologie décrite par le

COFRAC dans le SH GTA 04 (Révision 1 – avril 2015) pour la réalisation du plan expérimental nécessaire à la validation de méthode en portée A. Nous avons réalisé une vérification sur site des tests de répétabilité, de fidélité intermédiaire, de contamination et d'interférences pour cette nouvelle technique ELISA Sebia FLC® qui dispose du marquage CE. Les critères de limite de détection, d'étendue de mesure et de robustesse retenus sont ceux de la notice technique du fournisseur.

3.1 Répétabilité

La répétabilité correspond à la fidélité des résultats obtenus sur un même échantillon soumis à l'essai dans les mêmes conditions : opérateur, lot de réactifs, instrument, étalonnage. Nous avons donc constitué un mélange de sérums issus d'échantillons de notre cohorte initiale afin d'obtenir un volume suffisant pour la réalisation de 30 dosages Sebia FLC® successifs au sein de la même série.

3.2 Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire correspond à la fidélité des résultats obtenus sur un même échantillon soumis à l'essai dans des conditions différentes. Nous avons donc sélectionné deux échantillons de notre cohorte initiale, le contrôle de qualité interne (CQI) du coffret réactif et des contrôles complémentaires Sebia afin de réaliser de multiples dosages Sebia FLC® dans différentes séries sur plusieurs jours.

3.3 Contamination

La contamination inter-échantillons est un phénomène qui résulte du transfert d'une partie d'un échantillon dans un autre. Un échantillon de concentration élevée de

l'analyte peut altérer l'exactitude de la mesure d'un autre échantillon de niveau faible dosé à la suite. Nous avons donc constitué un mélange de concentration élevé en chaînes légères κ et λ et un autre à une concentration basse. Cette contamination a été évaluée en analysant le mélange de concentration élevé (H) 3 fois consécutivement suivi du mélange de concentration basse (B) également dosé 3 fois. La séquence a été répétée 5 fois au sein d'une même série (H1H2H3-B1B2B3-H1H2H3-B1B2B3-H1H2H3-B1B2B3-H1H2H3-B1B2B3-H1H2H3-B1B2B3).

Afin d'éviter l'introduction d'un biais, nous avons volontairement choisi de ne pas diluer les échantillons en dehors des limites de détection du dosage. Une unique mesure à une dilution supérieure en fin de série a permis d'obtenir la concentration de chaînes légères libres κ et λ de notre mélange par la technique Sebia FLC®. Le % de contamination est obtenu selon la formule suivante d'après le SH GTA 04 (Révision 1 – avril 2015) :

$$\text{Contamination (\%)} = (mB1 - mB3) / (mH - mB3) \times 100$$

- mB1 = moyenne des échantillons B1
- mB3 = moyenne des échantillons B3
- mH = moyenne des échantillons H

3.4 Interférences

Des interférences pré-analytiques liées à l'aspect du sérum (hémolyse, ictère, lactescence) peuvent conduire à des résultats erronés, en cas de dosage utilisant des méthodes optiques de détection. L'influence de ces interférences a été évaluée sur une sélection de sérum de notre cohorte. Pour cela, nous avons réalisé des

surcharges in vitro d'hémoglobine, de bilirubine et de lipides pour évaluer respectivement l'impact de l'hémolyse, de l'ictère et de la lactescence sur les dosages Sebia FLC®. La différence de résultats observés après surcharge est comparée à 2,8 x coefficient de variation (CV) de fidélité intermédiaire du niveau de contrôle de concentration la plus proche (83). Si la différence entre les deux valeurs est inférieure à 2,8 x CV de fidélité intermédiaire (limite acceptable en cas de repasse), il n'y a pas de différence significative.

3.4.1 Hémolyse

L'influence de l'hémoglobine a été testée à partir d'un hémolysat obtenu à l'aide d'une solution d'hématies lavées, hémolysées et diluées. La concentration du milieu en hémoglobine a ensuite été dosée par méthode spectrophotométrique (cyanméthémoglobine) sur automate XN-1000® (Sysmex Corporation, Kobe, Japon).

Les surcharges ont été effectuées selon la table 3 ci-dessous :

Table 3. Protocole pour la réalisation du test de surcharge en hémoglobine.

| Tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Volume sérum (µL) | 450 | 450 | 450 | 450 | 450 | 450 |
| Volume hémolysat (µL) | 0 | 2 | 6 | 9 | 13 | 18 |
| Volume NaCl 150 mmol/L (µL) | 50 | 48 | 44 | 41 | 37 | 32 |
| Hémoglobine théorique (g/L) | 0 | 0,8 | 2,5 | 3,8 | 5,5 | 7,6 |

3.4.2 Lactescence

L'influence de la lactescence a été testée à partir d'une solution d'Intralipide® (Fresenius, Bad Homburg vor der Höhe, Allemagne) à 20% diluée selon la table 4 ci-dessous :

Table 4. Protocole pour la réalisation du test de surcharge en triglycérides.

| Tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------------------------------------|-------|------------|------------|------------|------------|
| Dilution Intralipide® | | 1/80 | 1/40 | 1/20 | 1/10 |
| Volume (µL) | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| NaCl 150mmol/L (µL) | 100 | | | | |
| Sérum (µL) | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 |
| [Triglycérides] théorique (mmol/L) | 2 | 3 | 4,6 | 5 | 7 |
| Aspect | Clair | Opalescent | Lactescent | Lactescent | Lactescent |

3.4.3 Ictère

L'influence de l'ictère a été testée à partir d'une solution de bilirubine à 5,1 mmol/L obtenue de la façon suivante :

- Bilirubine (Merck, Darmstadt, Allemagne) : 30 mg
- NaOH 0,1 mol/L : 2,5 mL
- Eau distillée : 7,5 mL

Les surcharges ont été effectuées selon la table 5 ci-dessous :

Table 5. Protocole pour la réalisation du test de surcharge en bilirubine.

| Tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|
| Volume de sérum (μL) | 450 | 450 | 450 | 450 | 450 | 450 | 450 |
| Solution de bilirubine (μL) | 0 | 2,5 | 5 | 10 | 25 | 37,5 | 50 |
| NaCl 150 mmol/L (μL) | 50 | 47,5 | 45 | 40 | 25 | 12,5 | 0 |
| Surcharge théorique ($\mu\text{mol/L}$) | 0 | 25 | 50 | 100 | 250 | 375 | 500 |

En raison du caractère photosensible de la bilirubine, nous nous sommes assurés que celle-ci n'ait pas été dégradée durant notre étude. Nous avons réalisé pour cela un dosage de la bilirubine totale par méthode colorimétrique (diazoréaction) sur analyseur Cobas C502® (Roche, Bâle, Suisse) à T0 puis à T+4H (données non présentées).

3.5 Evaluation externe de la qualité

Le LBM se doit de participer à des comparaisons inter-laboratoires, telles que celles organisées dans le cadre de programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ) afin de bénéficier d'une évaluation, par rapport à ses pairs, de l'exactitude des résultats rendus. Le laboratoire de Biochimie des Protéines de Lille participe à différents programmes :

- *RIQAS Specific Protein EQA* (Randox Laboratories, Crumlin, UK) qui propose de suivre de façon bimensuelle les performances analytiques de 26 protéines spécifiques dont les chaînes légères libres κ et λ .

- *UK Neqas Monoclonal Protein Identification* (Sheffield, UK) qui propose de suivre de façon bimestrielle la capacité du laboratoire à identifier une gammopathie monoclonale et qui comprend une évaluation du dosage des FLC.
- ProBioQual Biochimie Sérique CQH (Lyon, France) qui propose une évaluation six fois par an de protéines spécifiques dont les FLC.

Nous avons donc dosé 10 échantillons RIQAS EQA, 1 UK Neqas et 3 échantillons ProBioQual par méthode Sebia FLC®.

4 Méthodes statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel MedCalc® (version 17.4, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium) et les figures ont été construites à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Les paramètres qualitatifs ont été décrits par les effectifs et pourcentages. Les paramètres quantitatifs ont été exprimés en médiane (écart interquartile). Les comparaisons de populations ont été réalisées par l'intermédiaire des tests de Student pour les variables quantitatives, et par le test exact de Fisher pour les variables qualitatives.

La comparaison des kits de dosage de chaînes légères libres Freelite® et Sebia FLC® a été réalisée selon les recommandations du *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (84) :

- a) Étude de la corrélation entre les taux de chaînes légères libres κ , λ et le ratio κ/λ mesurés pour chaque fournisseur, par l'intermédiaire de régressions linéaires de type II (dites « de Deming ») et le calcul de coefficients de corrélation de Pearson, après log-transformation des données en cas de distribution initiale non-normale.
- b) Étude du biais moyen entre les kits des deux fournisseurs, basée sur la construction de diagrammes des différences. Les diagrammes de type *rank-order difference plots* (représentation en abscisse du rang de chaque paire de mesures utilisée et en ordonnée de la différence brute et de la différence exprimée en pourcentage de la moyenne des deux mesures) ont été choisis pour optimiser la représentation en raison de la large gamme de mesure des techniques. La gamme de mesure était par la suite découpée en différents intervalles, selon le signe et la distribution des différences calculées. Le biais moyen (intervalle de confiance à 95 %) et les limites d'agrément étaient calculés pour chaque intervalle de mesure.
- c) Enfin la concordance des valeurs de ratios de chaînes légères libres a été étudiée par le calcul du kappa de Cohen sur les ratios catégorisés en 3 classes : ratio bas, ratio normal ou ratio élevé, selon les normes publiées actuellement en vigueur pour chaque kit de dosage.

Concernant l'étude du nombre de dilutions requis pour chaque technique, celui-ci a été étudié par des tests du Chi² en regroupant les échantillons en 3 catégories : 1 dilution, 2 dilutions ou ≥ 3 dilutions nécessaires, pour le dosage des chaînes légères κ ou λ , et pour chaque technique.

La comparabilité de la base utilisée pour la comparaison de méthode avec l'activité de routine du laboratoire de Biochimie des Protéines du CHU de Lille (activité de l'année 2017) a été contrôlée, avant d'estimer le gain moyen annuel en nombre de tests avec le nouveau kit de dosages Sebia FLC[®].

Pour la définition d'intervalles de référence pour les taux de chaînes légères libres κ , λ et pour le ratio κ/λ avec chaque technique de dosage, nous avons utilisé une approche par échantillonnage direct/*a posteriori* (85). Les différentes analyses statistiques ont suivi les recommandations du CLSI pour la détermination de valeurs de référence :

- 1) La présence d'éventuelles valeurs aberrantes a été recherchée à l'aide du test de Grubb en cas de distribution normale des données, ou par l'application d'une transformation Box-Cox et le test de Tukey pour les variables à distribution log-normale.
- 2) La recherche d'éventuelles partitions a été réalisée par l'intermédiaire du test de Harrys et Boyd pour les variables catégorielles (sexe). L'effet potentiel de variables continues (âge, fonction rénale estimée par la MDRD et la CKD-EPI) a été étudié par la construction d'équations de régression polynomiales pondérées, avec les taux de chaînes légères libres κ , λ ou le ratio κ/λ en tant que variable indépendante. En partant du troisième degré (introduction du terme simple, au

carré et au cube), l'équation était progressivement réduite en supprimant le(s) terme(s) non significatif(s). La validité de chaque modèle a été contrôlée par le calcul de z-scores pour chaque observation (86). Enfin, les différentes variables significatives en univarié étaient introduites simultanément à la recherche d'un effet persistant en multivarié.

- 3) Au terme des différents tests, des bornes de référence assorties de leurs intervalles de confiance à 90% CI étaient estimées en fonction de la variable d'intérêt.

Pour l'ensemble des tests statistiques réalisés, le niveau de significativité était fixé à 5%.

Résultats

1 Performances analytiques

1.1 Répétabilité

Nous observons un CV inférieur aux données fournisseurs pour le dosage des FLC κ . Le CV du dosage des FLC λ est supérieur aux données fournisseurs.

En l'absence de données pour ces paramètres dans les tables de Ricos *et al.* (87), le laboratoire considère les CV acceptables (< 15%) en terme de pertinence médicale compte tenu des variations biologiques intra-individuelles importantes de ces paramètres (28%) (88,89).

Table 6. Répétabilité de la technique Sebia FLC®.

| | Échantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne | Écart-type | CV (%) | CV (%) fournisseur |
|-----------|--------------|-----------------------|---------|------------|--------|--------------------|
| κ | Sérum | 30 | 55,56 | 3,82 | 6,88 | 8,0 |
| λ | Sérum | 30 | 40,44 | 5,67 | 14,01 | 11,7 |

1.2 Fidélité intermédiaire

Nous observons un CV inférieur aux données fournisseurs pour le dosage des FLC λ sur l'échantillon de sérum. Le CV du dosage des FLC κ avec le CQI comme matrice est légèrement supérieur aux données fournisseurs mais il s'agit d'une cible plus faible : en l'absence de données pour ces paramètres dans les tables dans les tables de Ricos *et al.* (87), le laboratoire considère les CV acceptables (< 15%) en terme de pertinence médicale compte tenu des variations biologiques intra-individuelles importantes de ces paramètres (28%) (88,89).

Table 7. Fidélité intermédiaire de la technique Sebia FLC®.

| | Échantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne | Écart-type | CV (%) | CV (%) fournisseur |
|---|--------------|-----------------------|---------|------------|--------|--------------------|
| κ | CQI | 15 | 15,45 | 1,69 | 10,92 | 9,2 |
| | Sérum | 9 | 25,38 | 2,10 | 8,28 | 9,2 |
| λ | CQI | 15 | 53,08 | 3,09 | 5,81 | 10,8 |
| | Sérum | 9 | 27,28 | 6,64 | 13,35 | 16,7 |

1.3 Contamination

Nous observons un pourcentage de contamination que le laboratoire considère acceptable ($\leq 5\%$) pour les paramètres FLC κ et λ ce qui est compatible avec une disposition aléatoire des échantillons sur la micro-plaque.

Table 8. Essai de contamination de la technique Sebia FLC®.

| | Échantillons | Nombre de valeurs (N) | Moyenne | Contamination (%) |
|---|--------------|-----------------------|---------|-------------------|
| κ | Sérum | 15 | 3,21 | 3,27 |
| | Sérum | 15 | 1449,8 | |
| λ | Sérum | 15 | 3,1 | 0,6 |
| | Sérum | 15 | 321,4 | |

1.4 Interférences

L'étude d'interférences générées par l'aspect du sérum sur la technique Sebia FLC® est conforme aux données fournisseurs. Des concentrations supérieures ont été testées au laboratoire et ne retrouvent pas d'interférence notable. (Annexe 2)

Table 9. Influence de l'aspect du sérum sur la technique Sebia FLC®.

| INTERFÉRENCES | |
|---------------------------|---|
| Hémolyse | Notice fournisseur : pas d'interférence notable jusque 5,7 g/L d'hémoglobine Vérification au laboratoire : pas d'interférence notable jusque 7,6 g/L d'hémoglobine |
| Turbidité | Notice fournisseur : pas d'interférence notable jusque 5,0 g/L de triglycérides Vérification au laboratoire : pas d'interférence notable jusque 6,2 g/L de triglycérides |
| Bilirubine, ictère | Notice fournisseur : pas d'interférence notable jusque 200 mg/L de bilirubine Vérification au laboratoire : pas d'interférence notable jusque 265 mg/L de bilirubine |

2 Évaluation externe de la qualité

Les résultats des EEQ en technique Sebia FLC® présentent parfois des biais importants par rapport aux cibles « toutes techniques » (données non présentées). Ceci concorde avec les résultats de la comparaison de méthodes présentée dans le paragraphe suivant. À ce jour, ces EEQ ne sont donc pas encore adaptés et la constitution d'un groupe de pairs s'avèrera indispensable

3 Comparaison de méthodes Freelite® et Sebia FLC®

3.1 Population étudiée

Nous avons inclus 1155 patients dans notre étude, dont les échantillons étaient systématiquement testés avec les deux techniques de dosage (Table 10). Concernant les distributions des effectifs, 762 étaient suivis à Lille et 393 en périphérie. Le *sex-ratio* était équilibré avec pratiquement 581 hommes et 574 femmes pour une médiane d'âge à 64,6 ans. Nous avons pu documenter la fonction rénale estimée par MDRD (90) et CKD-EPI (91) pour 870 patients, l'immunofixation pour 829 patients et le

diagnostic de 831 d'entre eux. Au total, notre cohorte comprend 730 patients pour lesquels ces trois données ont été renseignées. Parmi ces patients, nous avons répertorié 304 cas de MM, 80 cas de MGUS, 28 cas d'amylose AL, 11 cas de Waldenström, 29 cas d'autres cancers hématologiques, 25 cas de cancers solides, 32 cas de pathologies inflammatoires locales ou systémiques et 221 sujets indemnes de pathologies susceptibles d'entraîner une élévation monoclonale des FLC.

Table 10. Caractéristiques de la population utilisée pour la comparaison de méthodes entre la technique Freelite® et Sebia FLC®.

Paramètres quantitatifs exprimés en médiane (écart interquartile).

| | |
|---------------------------------------|---------------|
| Population totale | N=1155 |
| Sexe (% d'hommes) | 50,3 |
| Age (année) | 66 (19) |
| Diagnostic : | |
| MM | 304 |
| MGUS | 80 |
| Amylose AL | 28 |
| Autres atteintes hématologiques | 29 |
| Cancer solide | 25 |
| Waldenström | 11 |
| Maladies inflammatoires | 32 |
| Témoins | 221 |
| Diagnostic non connu | 425 |
| <hr/> | |
| Population MM | 304 |
| % d'hommes | 54,3 |
| Age (année) | 67,0 (13,0) |
| MDRD (ml/min/1,73 m ²) | 75,6 (40,2) |
| CKD-EPI (ml/min/1,73 m ²) | 79,2 (37,2) |
| MM à Ig intacte | 273 |
| Avec excès de FLC | 16 |
| MM à FLC | 31 |
| κ Freelite® (mg/L) | 15,8 (120,3) |
| κ Sebia FLC® (mg/L) | 12,2 (41,2) |
| λ Freelite® (mg/L) | 9,6 (19,0) |
| λ Sebia FLC® (mg/L) | 10,1 (15,2) |

3.2 Analyses statistiques

Les régressions linéaires simples sur données log-transformées ont permis de mettre en évidence des coefficients de corrélation de Pearson de 0,95 pour les FLC κ , de 0,89 pour les FLC λ et de 0,94 pour le ratio κ/λ entre les deux techniques ($p < 0,001$ pour tous) (Figure 15-A).

Les équations des régressions de Deming ont permis d'obtenir des pentes respectivement à 0,743, 0,611 et 0,743 pour le dosage des FLC κ , λ et pour le ratio κ/λ ; ainsi que des ordonnées à l'origine respectivement à 0,152, 0,456 et - 0,138 pour le dosage des FLC κ , λ et pour le ratio κ/λ (Figure 15-A).

Les diagrammes des différences (Bland-Altman) représentant les différences brutes (Figure 15-B) ou exprimées en pourcentage de la moyenne des mesures (Figure 15-C) ne permettaient pas d'analyser les biais de mesures entre les techniques, principalement en raison de la très large distribution des valeurs.

Pour améliorer la lisibilité, nous avons pris la décision de construire des « *rank-order difference plots* », en attribuant un rang croissant à chaque valeur de moyenne des mesures, tout en projetant sur l'axe des ordonnées les différences exprimées en pourcentage de la moyenne. Les nouveaux diagrammes sont représentés en Figure 16-A.

À la lecture, trois plages ont pu être identifiées pour chaque analyte, avec des distributions des différences spécifiques.

Pour le dosage des FLC κ :

- Il existait un biais positif jusqu'au rang 57, correspondant à une moyenne de 2,7 mg/L, soit 2,4 mg/L en Freelite® et 3 mg/L en Sebia FLC®. Le biais moyen [IC 95%] était estimé à +52,2 % [41,6 ; 62,7] sur cette plage de mesure, avec des limites d'agrément de -25,5 à 129,8 % (Figure 16-B).
- Il existait un biais négatif entre le rang 58 et le rang 586, correspondant à une moyenne de 20,0 mg/L, soit 20,8 mg/L en Freelite® et 19,1 en Sebia FLC®. Le biais moyen était estimé à -26,8 % [-29,5 ; -24,1] sur cette plage de mesure, avec des limites d'agrément de -89,2 à 35,5% (Figure 16-C).
- Il existe un biais négatif au-delà du rang 586 avec la persistance d'une corrélation entre le % de différences et la moyenne si bien que l'expression du biais en % n'est pas exploitable (Figure 16-D).

Pour le dosage des FLC λ :

- Il existait un biais positif jusqu'au rang 101, correspondant à une moyenne de 3,5 mg/L, soit 0,9 mg/L en Freelite® et 6,1 mg/L en Sebia FLC®. Le biais moyen était estimé à +94,1 % [85,3 ; 102,8] sur cette plage de mesure, avec des limites d'agrément de 7,0 à 181,2 % (Figure 16-B).
- Il existait un biais positif du rang 102 au rang 652, correspondant à une moyenne de 18,0 mg/L, soit 14,7 mg/L en Freelite® et 21,2 en Sebia FLC®. Le biais moyen sur cette plage était estimé à +10,1 % [7,1 ; 13,1], avec des limites d'agrément de -60,0 à 80,1% (Figure 16-C).
- Il existait un biais négatif au-delà du rang 652 avec la persistance d'une corrélation entre le % de différences et la moyenne si bien que l'expression du biais en % n'est pas exploitable (Figure 16-D).

Pour le dosage du ratio κ/λ :

- Il existait un biais positif jusqu'au rang 175, correspondant à une moyenne de 0,56, soit 0,78 en Freelite® et 0,34 en Sebia FLC®. Le biais moyen était estimé à +44,0 % [30,5 ; 57,6] sur cette plage de mesure, avec des limites d'agrément de -133,9 à 222,0 % (Figure 16-B).
- Il existait un biais négatif du rang 176 au rang 650, correspondant à une moyenne de 1,28, soit 1,35 en Freelite® et 1,2 en Sebia FLC®. Le biais moyen était estimé à -35,6 [-38,4 ; -32,8] sur cette plage de mesure, avec des limites d'agrément de -96,1 à 24,9% (Figure 16-C).
- Il existe un biais négatif au-delà du rang 650 avec la persistance d'une corrélation entre le % de différences et la moyenne si bien que l'expression du biais en % n'est pas exploitable (Figure 16-D).

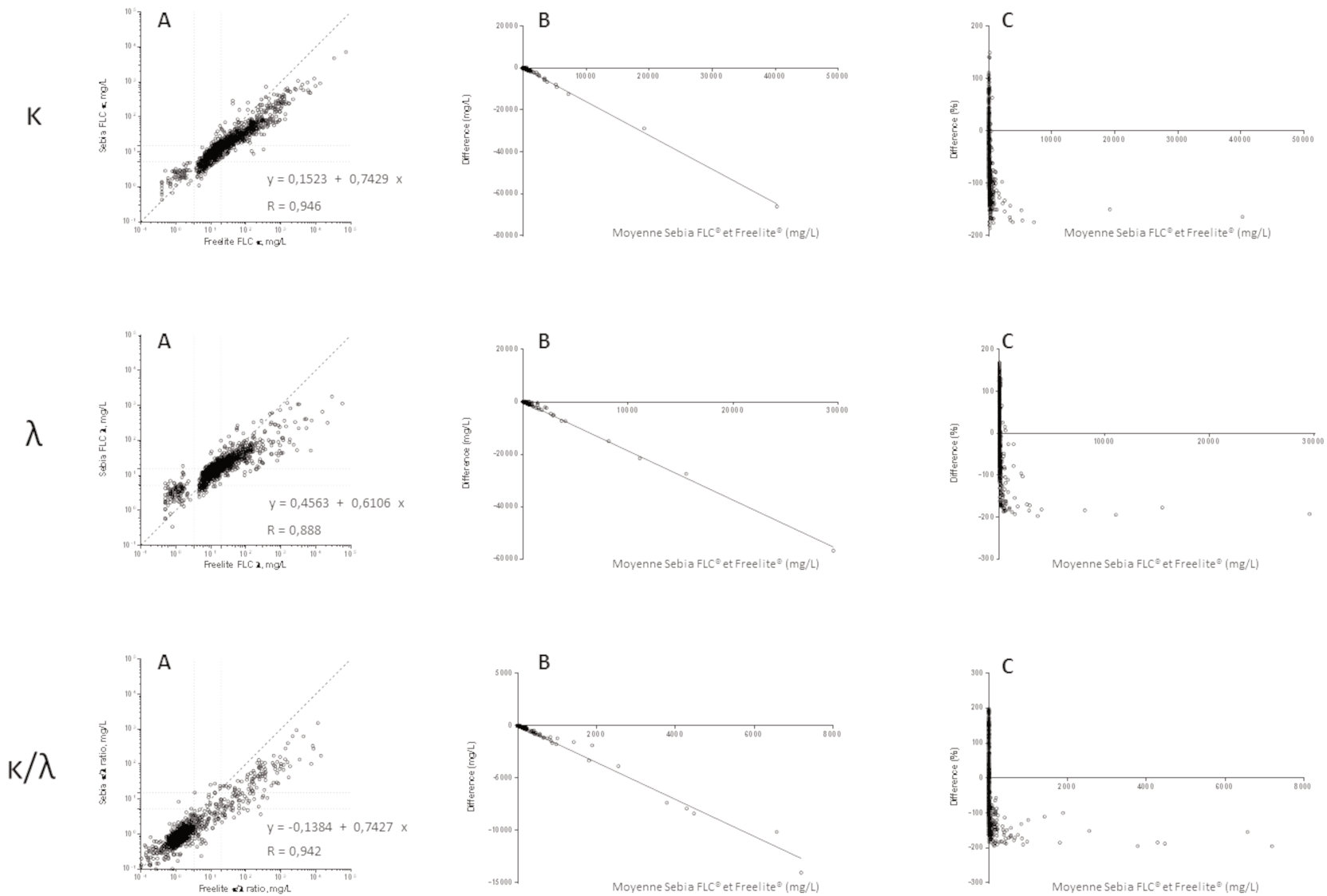


Figure 15. Comparaison de méthode entre la technique Freelite[®] et Sebia FLC[®]

A : Régressions de Deming après log-transformation des données

B : Bland-Altman en différence brute

C : Bland-Altman en % de différence de la moyenne des deux mesures

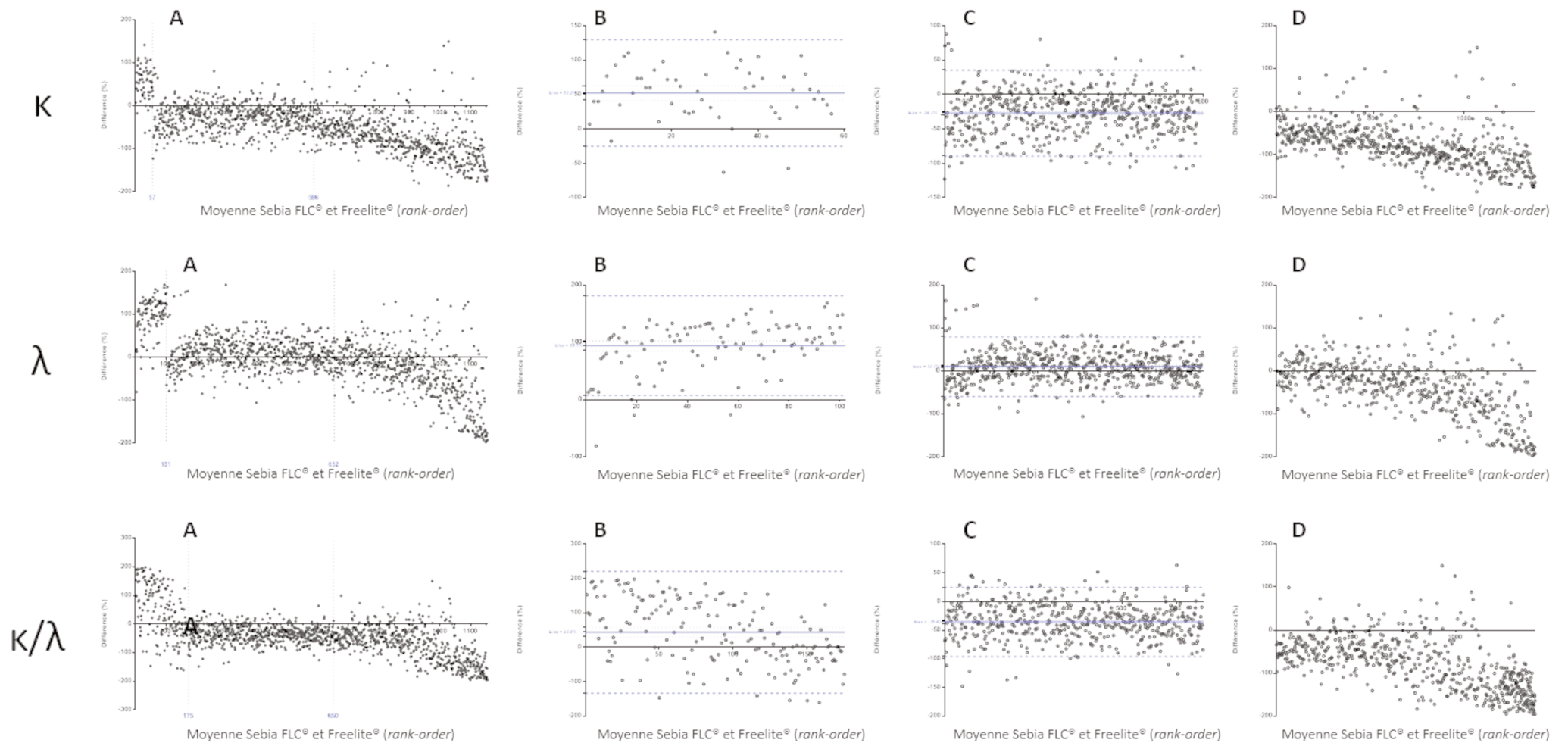


Figure 16. Comparaison de méthode entre la technique Freelite[®] et Sebia FLC[®] (suite)

A : Bland-Altman en rank-order difference plots

B : Plage de mesure 1

C : Plage de mesure 2

D : Plage de mesure 3

Le taux de concordance observé du ratio κ/λ entre les deux techniques est de 78,7% (Table 11) pour un κ de Cohen à 0,67 ce qui correspond à une bonne concordance ($0,6 \leq N < 0,8$).

Table 11. Tableau de concordance du ratio κ/λ entre la technique Freelite® et Sebia FLC®.
 1 : Résultat inférieur à la norme ($< 0,26$ en Freelite® et $< 0,37$ en Sebia FLC®)
 2 : Résultat normal ($0,26 \leq N \leq 1,65$ en Freelite® et $0,37 \leq N \leq 1,44$ en Sebia FLC®)
 3 : Résultat supérieur à la norme ($> 1,65$ en Freelite® et $> 1,44$ en Sebia FLC®)

| | | κ/λ Freelite® | | | | |
|-----------------------------|---|----------------------------|-----|-----|-----|------|
| | | Seuils | 1 | 2 | | 3 |
| κ/λ Sebia FLC® | 1 | | 107 | 38 | 1 | 146 |
| | 2 | | 10 | 525 | 170 | 705 |
| | 3 | | 0 | 27 | 277 | 304 |
| | | | 117 | 590 | 448 | 1155 |

Les discordances observées sont principalement retrouvées pour des échantillons proches des valeurs seuils. Un seul échantillon présentait un saut de 2 catégories (supérieur à la norme Freelite® mais inférieur à la norme Sebia FLC®).

- Freelite® : $\kappa = 167,8$ mg/L et $\lambda = 31,1$ mg/L
- Sebia FLC® : $\kappa = 8,8$ mg/L et $\lambda = 37,2$ mg/L

La consultation *a posteriori* du dossier patient a révélé que le patient avait un MM à IgG λ , ce qui est en faveur du résultat de la technique Sebia FLC®.

3.3 Suivi prospectif

Nous avons suivi 96 patients de notre cohorte de façon randomisée du 1er décembre 2017 au 15 juillet 2019 et avons choisi d'en représenter graphiquement 7 avec les évènements intercurrents de leur pathologie associée. L'évolution du ratio κ/λ et de la dFLC semblent suivre la même tendance entre la technique Freelite® et Sebia FLC® malgré des différences d'amplitude plus marquées avec la technique Freelite®.

Nous observons pour le patient en figure 17 un suivi similaire avec la technique Freelite®. Un point semble discordant en Avril 2018 ; après consultation du dossier médical, ce relevé n'est pas associé à une rechute.

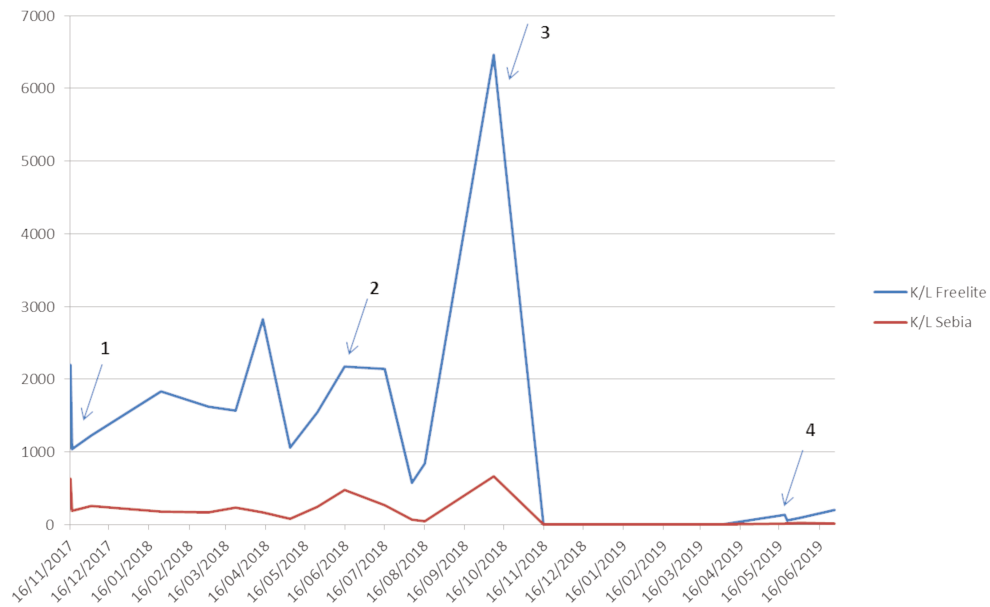


Figure 17. Suivi prospectif du ratio κ/λ d'un homme de 61 ans atteint d'un MM à IgG κ depuis 2013
 1 : Introduction du Daratumumab
 2 : Arthrite septique
 3 : Injection de CAR-T Cells
 4 : Rechute (leucémie à plasmocytes)

Nous observons pour le patient en figure 18 un décalage d'environ un mois sur la rechute entre la technique Freelite® et Sebia FLC®.

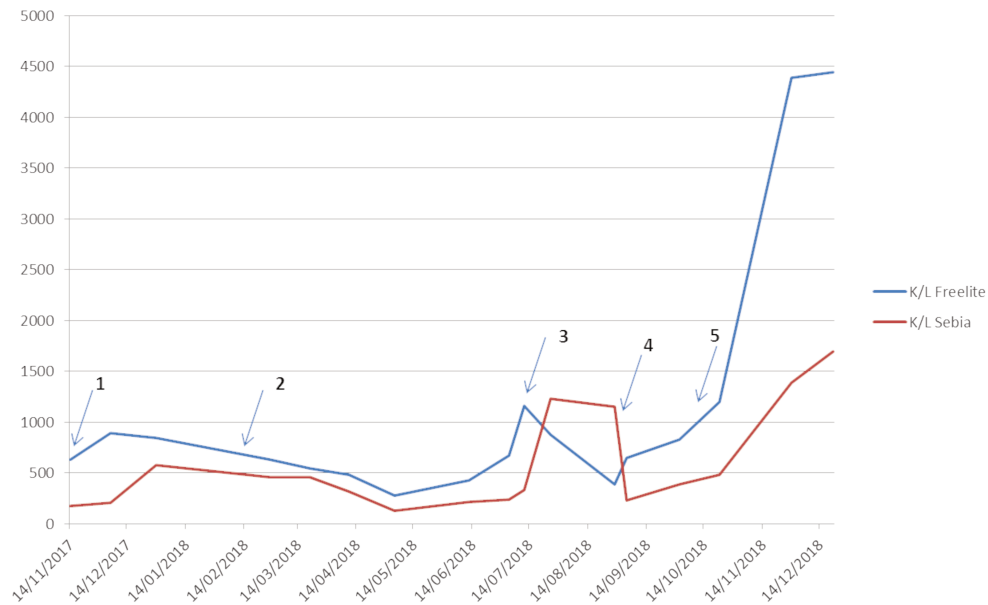


Figure 18. Suivi prospectif du ratio κ/λ d'un homme de 61 ans atteint d'un MM à IgA κ depuis 2010
 1 : Introduction du Daratumumab
 2 : Introduction de l'ixazomib
 3 : Rechute
 4 : Injection de CAR-T Cells
 5 : Rechute

Nous observons pour les patients en figure 19 et 20 un suivi similaire entre la technique Freelite® et Sebia FLC® malgré des différences d'amplitude plus marquées avec la technique Freelite®.

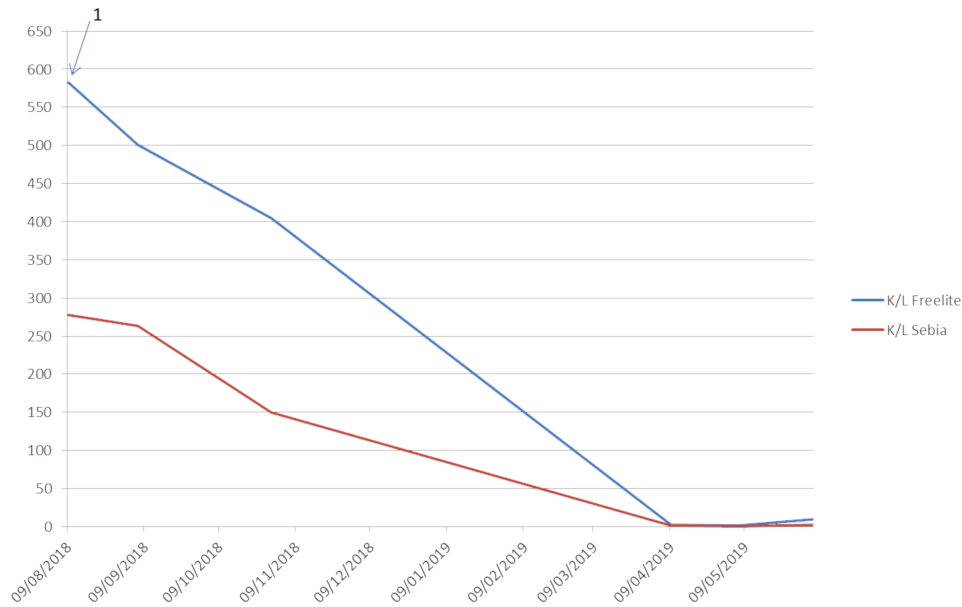


Figure 19. Suivi prospectif du ratio κ/λ d'une femme de 72 ans atteinte d'un MM à FLC κ depuis 2004
1 : Introduction du Carfilzomib-Dexamethasone

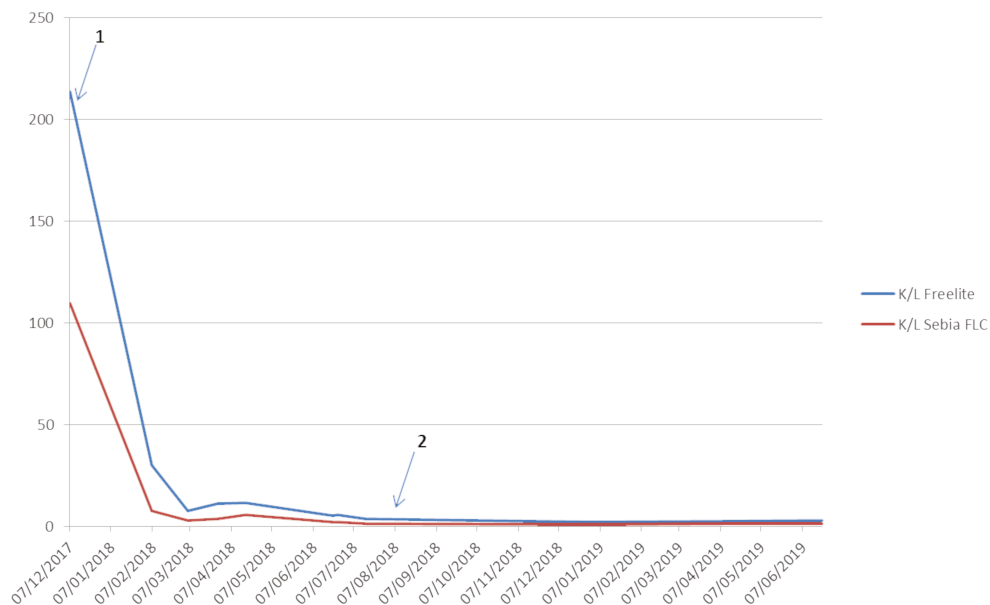


Figure 20. Suivi prospectif du ratio κ/λ d'un homme de 61 ans atteint d'un MM à IgG κ depuis 2017
1 : Diagnostic et introduction du protocole VRD (Velcade-Revlimid-Dexamethasone)
2 : Revlimid en monothérapie

Nous observons pour le patient en figure 21 une 2^{ème} rechute qui semble être visualisée plus précocement avec la technique Freelite®.

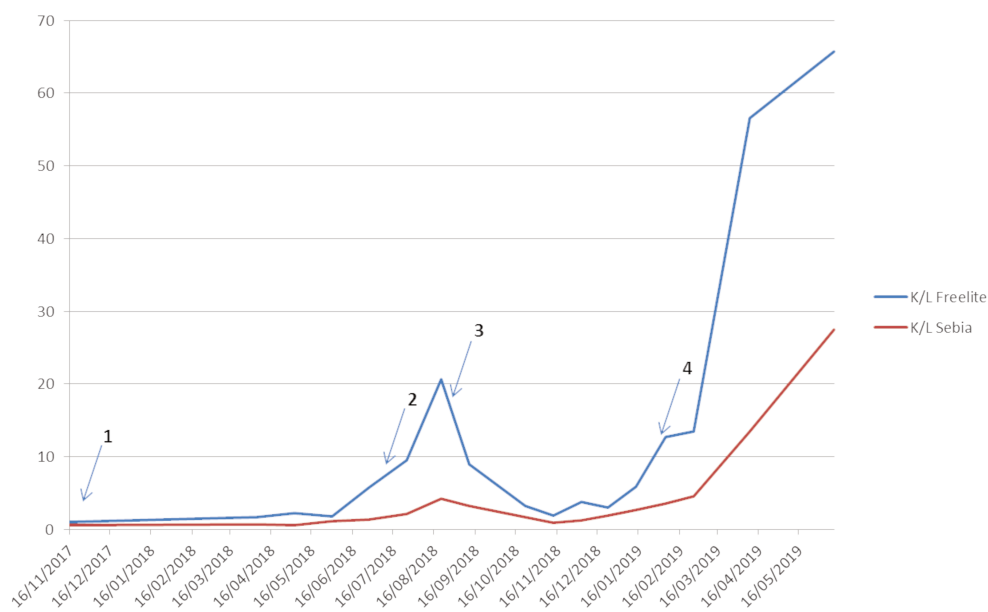


Figure 21. Suivi prospectif du ratio κ/λ d'un homme de 73 ans atteint d'un MM à IgG κ depuis 2016
1 : Introduction du protocole VPD (Velcade-Pomalidomide-Dexamethasone)
2 : Rechute
3 : Pomalidomide en monothérapie
4 : Rechute

Nous observons encore pour les patients en figures 22 et 23 un suivi similaire entre la technique Freelite® et Sebia FLC® malgré des différences d'amplitude plus marquées avec la technique Freelite®.

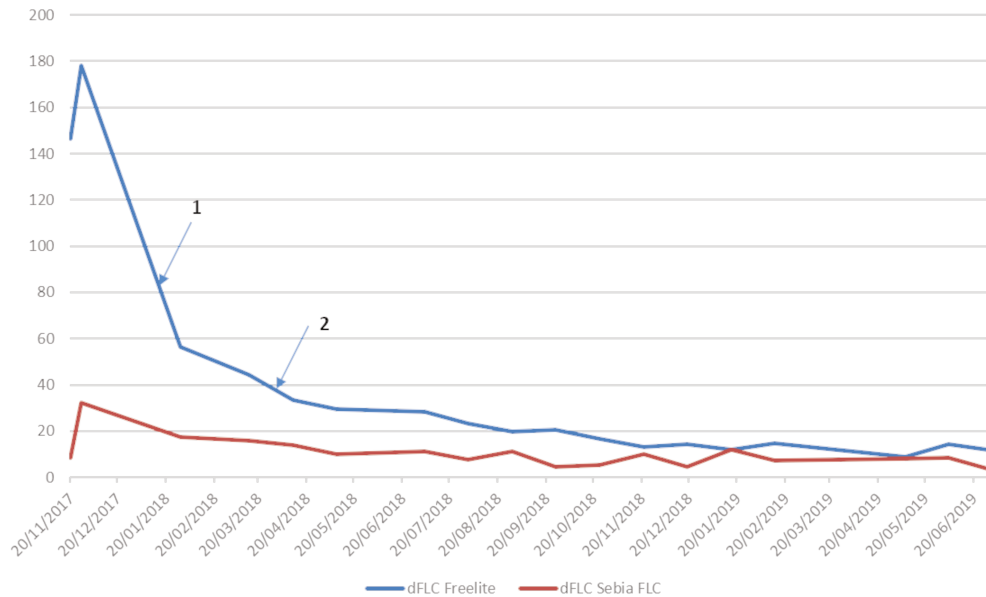


Figure 22. Suivi prospectif de la dFLC d'une femme de 67 ans atteinte d'une amylose AL depuis 2017
 1 : Réponse partielle
 2 : Très bonne réponse partielle

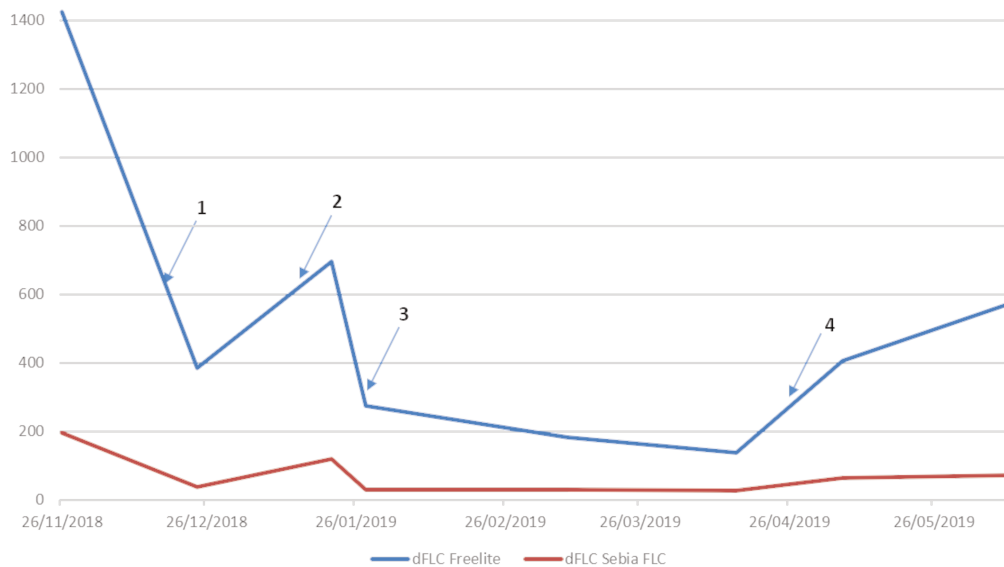


Figure 23. Suivi prospectif de la dFLC d'une femme de 76 ans atteinte d'une amylose AL depuis 2018
 1 : Réponse partielle
 2 : Progression
 3 : Réponse partielle
 4 : Progression

3.4 Nombre de dilutions

Il existe une différence significative de la répartition des dilutions entre la technique Sebia FLC® et Freelite® pour les FLC κ et λ ($p < 0,001$).

On observe que pour la technique Sebia FLC® κ, 1027 échantillons ont nécessité la dilution initiale, 123 la dilution au 1/10000 et 5 la dilution au 1/100000. Pour la technique Freelite® κ, 905 échantillons ont nécessité la dilution initiale, 209 la dilution au 1/100 et 41 la dilution au 1/1000 ou au 1/10000 (Table 12).

On observe que pour la technique Sebia FLC® λ, 1090 échantillons ont nécessité la dilution initiale, 61 la dilution au 1/10000 et 4 la dilution au 1/100000. Pour la technique Freelite® λ, 961 échantillons ont nécessité la dilution initiale, 165 la dilution au 1/100 et 29 la dilution au 1/1000 ou au 1/10000 (Table 13).

Table 12. Détail des dilutions nécessaires aux rendus de résultats des chaînes κ en techniques Freelite® et Sebia FLC®

| | | κ Freelite® | | | |
|--------------|---------------------|-------------|-----------|----------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | |
| κ Sebia FLC® | Nombre de dilutions | | | | |
| | 1 | 897 | 125 | 5 | 1027 |
| | 2 | 8 | 84 | 31 | 123 |
| | 3 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| | | 905 | 209 | 41 | 1155 |

Table 13. Détail des dilutions nécessaires aux rendus de résultats des chaînes λ en techniques Freelite® et Sebia FLC®

| | | λ Freelite® | | | |
|--------------|---------------------|-------------|-----------|----------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | |
| λ Sebia FLC® | Nombre de dilutions | | | | |
| | 1 | 947 | 134 | 9 | 1090 |
| | 2 | 14 | 31 | 16 | 61 |
| | 3 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| | | 961 | 165 | 29 | 1155 |

Après réalisation d'un test du Chi2, nous n'observons pas de différence significative de la répartition des dilutions entre notre cohorte et l'activité 2017 du laboratoire de Biochimie des Protéines du CHU de Lille en technique Freelite® pour les FLC κ ($p=0,196$) (Table 14).

Table 14. Comparaison du nombre de dilutions nécessaires aux rendus de résultats des chaînes κ en technique Freelite® entre l'activité 2017 du laboratoire de Biochimie des Protéines du CHU de Lille et la cohorte utilisée pour la comparaison de méthode

| Nombre de dilutions | κ Freelite® | |
|---------------------|--------------------|---------------------|
| | Effectif 2017 | Cohorte prospective |
| 1 | 4190 | 905 |
| 2 | 936 | 209 |
| 3 | 255 | 41 |
| | 5381 | 1155 |

Il existe néanmoins une différence statistique de la répartition des dilutions entre notre cohorte et l'activité 2017 du laboratoire de Biochimie des Protéines du CHU de Lille en technique Freelite® pour les FLC λ ($p=0,015$) (Table 15).

Table 15. Comparaison du nombre de dilutions nécessaires aux rendus de résultats des chaînes λ en technique Freelite® entre l'activité 2017 du laboratoire de Biochimie des Protéines du CHU de Lille et la cohorte utilisée pour la comparaison de méthode.

| Nombre de dilutions | λ Freelite® | |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Effectif 2017 | Cohorte prospective |
| 1 | 4311 | 961 |
| 2 | 854 | 165 |
| 3 | 216 | 29 |
| Total : | 5381 | 1155 |

À partir des données issues de notre cohorte, nous avons pu estimer avec la technique Sebia FLC® le gain attendu du nombre de dilutions sur l'activité du laboratoire 2017.

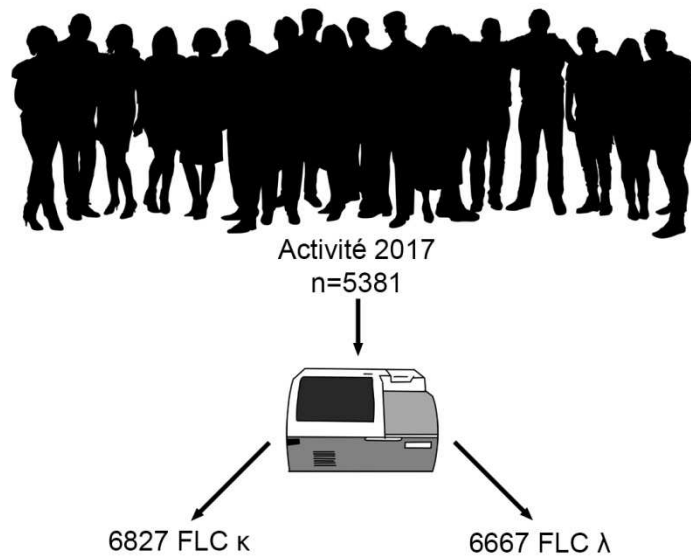
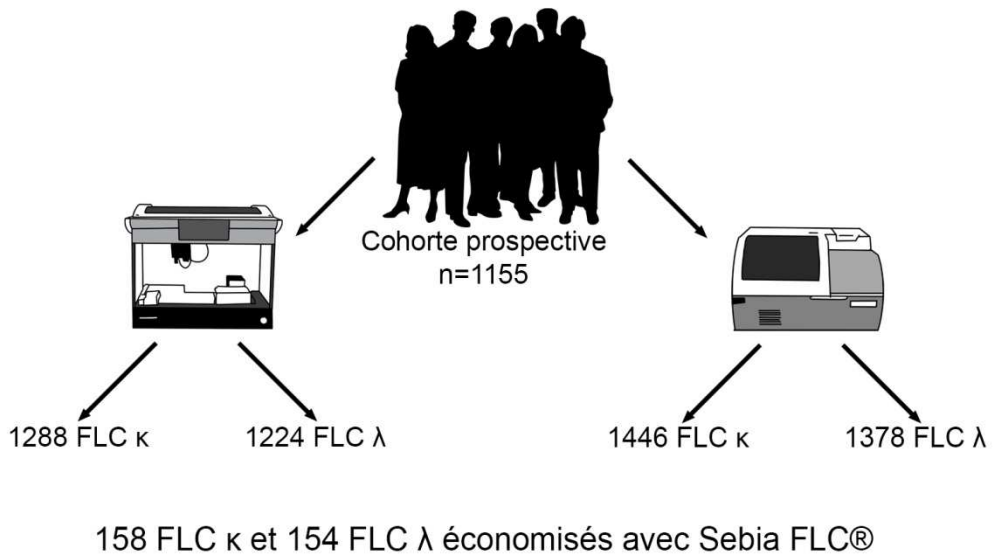
Concernant l'estimation pour le dosage des FLC λ , nos résultats constituent une première approche car la répartition des dilutions entre notre cohorte et l'activité 2017 n'est pas identique sur le plan statistique.

Sur notre cohorte :

- 1446 dosages FLC κ et 1378 FLC λ en Freelite® pour 1288 FLC κ et 1224 FLC λ en Sebia FLC®

Nous avons donc réalisé une économie de 158 FLC κ et 154 FLC λ avec la technique Sebia FLC® pour 1155 patients, ce qui correspond respectivement à 10,9% et 11,2% de tests en moins. En moyenne, et sous réserve de la distribution des échantillons pathologiques, on estime donc pouvoir économiser 1 test tous les 7,3 et 7,5 patients, respectivement pour les dosages de FLC κ et λ .

Au regard de l'activité du CHU de Lille en 2017 (6827 FLC κ et 6667 FLC λ pour 5381 patients), nous pouvons donc attendre une économie de 746 FLC κ et 745 FLC λ de l'utilisation de la technique Sebia FLC® au laboratoire (Figure 24).



En théorie, 746 FLC κ et 745 FLC λ économisés avec Sebia FLC®

Figure 24. Économie attendue du nombre de dilutions en Sebia FLC® par rapport à Freelite®

4 Intervalles de référence

4.1 Analyse de la population

Nous avons inclus 221 sujets de notre cohorte indemnes de pathologies susceptibles d'entraîner une élévation monoclonale des FLC afin d'établir de nouveaux intervalles de référence en fonction du DFG pour la technique Sebia FLC® et Freelite® selon les recommandations du *Clinical & Laboratory Standards Institute* (92) (Table 16). Le caractère sain de cette population a été défini sur la présence d'une immunofixation sérique négative concomitante au dosage des FLC et une consultation du dossier médical afin d'exclure les sujets atteints de gammopathies monoclonales, d'autres cancers hématologiques, de cancers solides ou de pathologies inflammatoires locales ou systémiques.

Table 16. Description de la population utilisée pour la réalisation des intervalles de référence en technique Freelite® et Sebia FLC®.

Sous catégorisation proposée selon l'estimation du DFG par MDRD. Paramètres quantitatifs exprimés en médiane (écart interquartile).

| | Totale | MDRD ≥ 60 | 30 ≤ MDRD < 60 | MDRD < 30 |
|--|----------------|------------------|--------------------------|---------------------|
| Population | 221 | 121 | 47 | 53 |
| % d'hommes | 44,8 | 39,7 | 44,6 | 56,6 |
| Age (année) | 60,0 (24,5) | 55 (28,5) | 67 (28,3) | 66 (23) |
| MDRD (ml/min/1,73 m²) | 66,6 (58,0) | 87,2 (27,0) | 47,2 (13,3) | 8,6 (10,7) |
| CKD-EPI (ml/min/1,73 m²) | 69,7 (61,4) | 93,8 (27,9) | 48,0 (14,1) | 8,3 (10,6) |
| κ Freelite® (mg/L) | 22,0 (39,0) | 14,5 (11,0) | 28,9 (21,2) | 148,1 (130,9) |
| κ Sebia FLC® (mg/L) | 16,4 (17,1) | 11,8 (8,1) | 17,5 (10,6) | 52,0 (42,0) |
| λ Freelite® (mg/L) | 17,4 (22,8) | 12,7 (7,9) | 20,0 (10,7) | 75,1 (81,4) |
| λ Sebia FLC® (mg/L) | 18,0 (14,0) | 15,7 (6,2) | 21,0 (8,0) | 42,1 (28,2) |

4.2 Intervalles de référence Sebia FLC® et Freelite®

Les trois paramètres suivants ont été étudiés : concentration de FLC κ , concentration de FLC λ , ratio κ/λ . Pour chacun de ces paramètres, l'effet des variables sexe, âge, et insuffisance rénale (estimation du DFG par le MDRD ou CKD-EPI) a été étudié à l'aide du test de Student pour les variables catégorielles, et de régressions linéaires pour les variables continues.

Il n'existe pas de corrélation entre le sexe et les résultats des 3 paramètres étudiés, et ceci quelle que soit la technique utilisée (Sebia FLC® ou Freelite®).

En analyses univariées, la construction d'équations de régression polynomiales pondérées a révélé une corrélation statistiquement significative de l'âge et de la fonction rénale avec les 3 paramètres étudiés. Les meilleurs modèles de régression étaient ceux de régression linéaire simple dans chaque cas. En multivariée, l'ajout simultané de l'âge et de la fonction rénale avait pour effet de perdre la significativité de la variable âge du patient, quelle que soit la variable dépendante testée.

Ceci nous a conduits à ajuster les intervalles de référence sur la fonction rénale uniquement. Nous avons ainsi pu obtenir une représentation graphique de ces intervalles de référence en fonction de la fonction rénale, estimée, soit par la formule du MDRD, soit par celle du CKD-EPI pour Sebia FLC® (Figure 25) et Freelite® (Figure 26).

Les résultats obtenus pour différentes valeurs de DFG ont été présentés dans les tableaux ci-dessous (Table 17 pour Sebia FLC® et Table 18 pour Freelite®) :

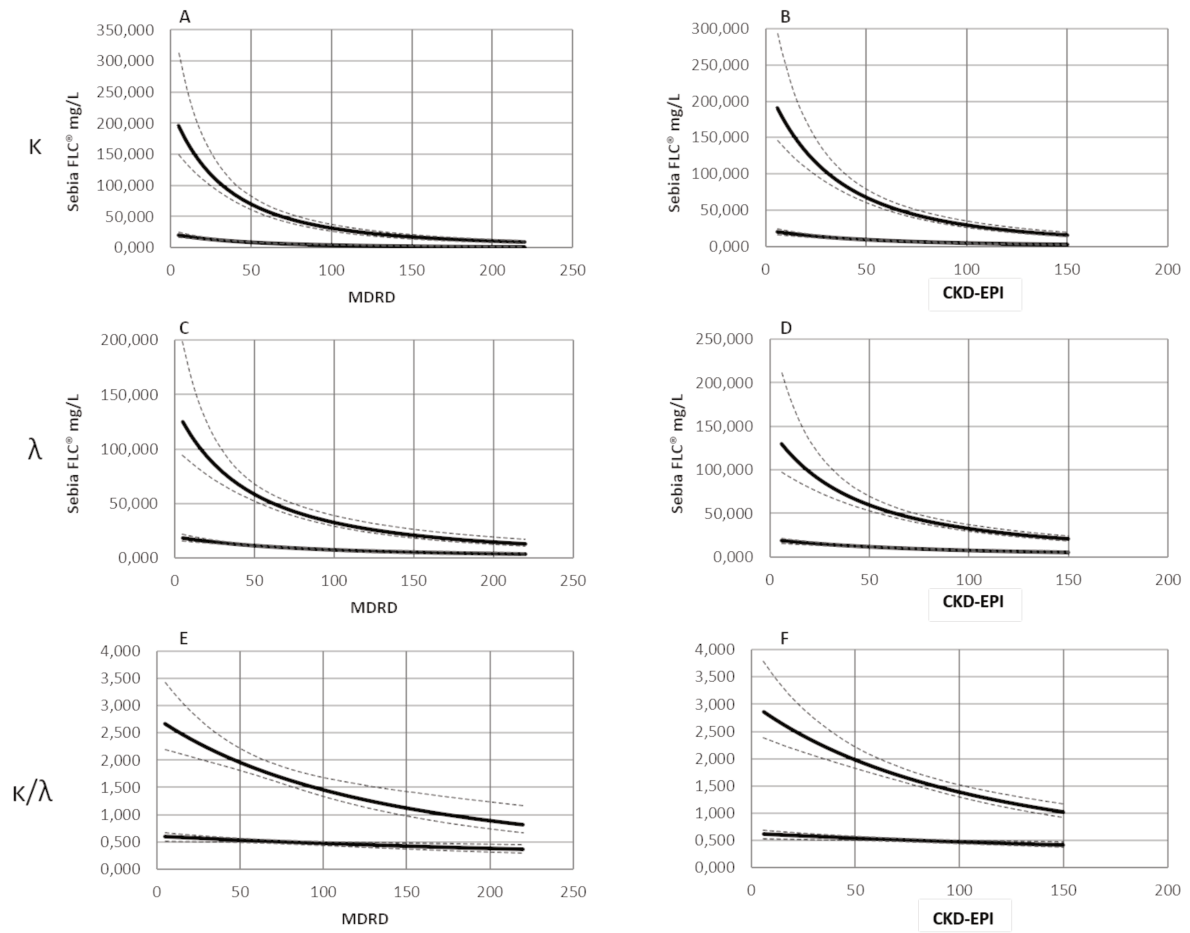


Figure 25. Intervalles de référence Sebia FLC[®] selon l'estimation du DFG
 A, C, E : Normes des FLC κ , λ et du ratio κ/λ selon l'estimation du DFG par MDRD
 B, D, F : Normes des FLC κ , λ et du ratio κ/λ selon l'estimation du DFG par CKD-EPI
 Trait plein : estimations des 2,5^e et 97,5^e percentiles.
 Pointillés : intervalle de confiance à 90% des percentiles estimés.

Table 17. Intervalles de référence Sebia FLC® selon l'estimation du DFG

| | | κ | | λ | | κ/λ | |
|----------------|-----|---|--|---|--|---|--|
| | | 2,5 ^{ème} percentile (90% IC) | 97,5 ^{ème} percentile (90% IC) | 2,5 ^{ème} percentile (90% IC) | 97,5 ^{ème} percentile (90% IC) | 2,5 ^{ème} percentile (90% IC) | 97,5 ^{ème} percentile (90% IC) |
| MDRD | 20 | 15,0 (12,9 ; 17,4) | 132,0 (109,4 ; 178,4) | 15,6 (13,6 ; 17,3) | 93,6 (76,6 ; 125,7) | 0,57 (0,51 ; 0,62) | 2,40 (2,06 ; 2,90) |
| | 40 | 10,6 (9,6 ; 11,5) | 84,5 (73,7 ; 102,0) | 12,7 (11,6 ; 13,6) | 67,5 (59,1 ; 80,5) | 0,54 (0,50 ; 0,58) | 2,09 (1,89 ; 2,40) |
| | 60 | 7,8 (7,2 ; 8,3) | 57,7 (50,3 ; 68,3) | 10,5 (9,8 ; 11,2) | 51,2 (46,1 ; 59,0) | 0,52 (0,49 ; 0,55) | 1,84 (1,72 ; 2,05) |
| | 80 | 5,9 (5,3 ; 6,4) | 41,4 (35,6 ; 49,6) | 8,9 (8,0 ; 9,7) | 40,3 (36,4 ; 46,9) | 0,49 (0,46 ; 0,52) | 1,63 (1,52 ; 1,83) |
| | 100 | 4,6 (4,0 ; 5,2) | 30,8 (25,9 ; 37,6) | 7,6 (6,7 ; 8,5) | 32,6 (29,2 ; 38,7) | 0,47 (0,44 ; 0,50) | 1,46 (1,33 ; 1,67) |
| | 120 | 3,7 (3,0 ; 4,2) | 23,7 (19,5 ; 29,4) | 6,6 (5,6 ; 7,6) | 26,9 (23,9 ; 32,6) | 0,45 (0,41 ; 0,49) | 1,31 (1,17 ; 1,56) |
| CKD-EPI | 20 | 15,3 (13,3 ; 17,5) | 131,0 (108,2 ; 173,7) | 15,8 (14,0 ; 17,4) | 97,2 (79,6 ; 132,8) | 0,59 (0,53 ; 0,64) | 2,52 (2,18 ; 3,11) |
| | 40 | 11,0 (10,0 ; 11,9) | 83,1 (72,7 ; 99,0) | 12,9 (11,9 ; 13,7) | 69,0 (60,4 ; 83,2) | 0,55 (0,51 ; 0,59) | 2,14 (1,93 ; 2,46) |
| | 60 | 8,1 (7,5 ; 8,7) | 56,4 (50,0 ; 65,0) | 10,7 (10,0 ; 11,3) | 51,7 (46,8 ; 59,3) | 0,52 (0,49 ; 0,55) | 1,83 (1,71 ; 2,03) |
| | 80 | 6,2 (5,7 ; 6,8) | 40,2 (35,4 ; 46,7) | 9,0 (8,3 ; 9,7) | 40,3 (36,8 ; 45,4) | 0,50 (0,47 ; 0,52) | 1,56 (1,50 ; 1,73) |
| | 100 | 4,9 (4,3 ; 5,5) | 29,8 (25,9 ; 35,1) | 7,7 (6,9 ; 8,5) | 32,4 (29,5 ; 36,7) | 0,47 (0,44 ; 0,50) | 1,39 (1,30 ; 1,52) |
| | 120 | 3,9 (3,3 ; 4,5) | 22,8 (19,2 ; 27,2) | 6,7 (5,9 ; 7,6) | 26,6 (24,1 ; 30,6) | 0,45 (0,41 ; 0,49) | 1,23 (1,13 ; 1,36) |

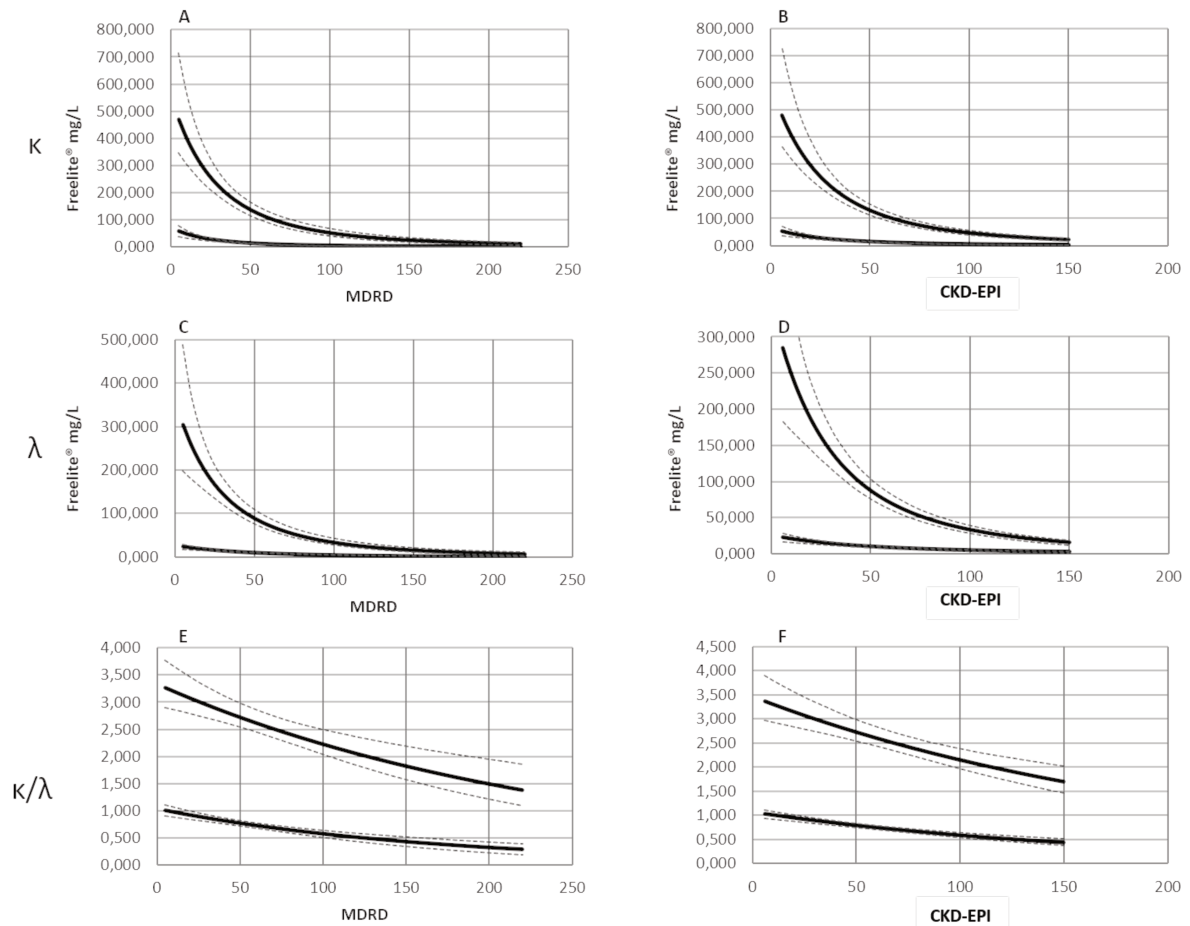


Figure 26. Intervalles de référence Freelite® selon l'estimation du DFG
 A, C, E : Normes des FLC κ , λ et du ratio κ/λ selon l'estimation du DFG par MDRD
 B, D, F : Normes des FLC κ , λ et du ratio κ/λ selon l'estimation du DFG par CKD-EPI
 Trait plein : estimations des 2,5^e et 97,5^e percentiles.
 Pointillés : intervalle de confiance à 90% des percentiles estimés.

Table 18. Intervalles de référence Freelite® selon l'estimation du DFG

| | | K | | λ | | κ/λ | |
|---------|-----|--|---|--|---|--|---|
| | | 2,5 ^{ème} percentile (90% IC) | 97,5 ^{ème} percentile (90% IC) | 2,5 ^{ème} percentile (90% IC) | 97,5 ^{ème} percentile (90% IC) | 2,5 ^{ème} percentile (90% IC) | 97,5 ^{ème} percentile (90% IC) |
| MDRD | 20 | 32,0 (24,7 ; 39,4) | 294,2 (237,6 ; 385,2) | 16,9 (13,2 ; 19,5) | 192 (149,3 ; 251,4) | 0,92 (0,84 ; 0,99) | 3,07 (2,79 ; 3,47) |
| | 40 | 17,0 (14,8 ; 19,1) | 172,6 (147,0 ; 210,0) | 11,7 (9,8 ; 12,8) | 113,0 (96,3 ; 139,0) | 0,82 (0,76 ; 0,87) | 2,83 (2,63 ; 3,12) |
| | 60 | 10,0 (9,1 ; 11,0) | 109,0 (92,2 ; 134,1) | 8,4 (7,0 ; 9,2) | 71,7 (61,2 ; 87,7) | 0,73 (0,68 ; 0,77) | 2,61 (2,45 ; 2,86) |
| | 80 | 6,4 (5,4 ; 7,1) | 72,9 (60,0 ; 93,4) | 6,2 (4,8 ; 7,1) | 48,0 (40,6 ; 59,3) | 0,65 (0,59 ; 0,70) | 2,41 (2,24 ; 2,65) |
| | 100 | 4,3 (3,4 ; 5,0) | 50,9 (40,8 ; 67,8) | 4,7 (3,3 ; 5,6) | 33,7 (28,0 ; 42,0) | 0,58 (0,51 ; 0,64) | 2,22 (2,03 ; 2,50) |
| | 120 | 3,0 (2,2 ; 3,7) | 36,8 (28,5 ; 40,4) | 3,7 (2,3 ; 4,6) | 24,4 (19,6 ; 30,7) | 0,51 (0,44 ; 0,59) | 2,05 (1,83 ; 2,36) |
| CKD-EPI | 20 | 32,5 (25,4 ; 39,1) | 299,2 (246,1 ; 392,8) | 17,6 (14,0 ; 20,1) | 186,3 (143,2 ; 237,1) | 0,94 (0,87 ; 1,01) | 3,14 (2,83 ; 3,56) |
| | 40 | 18,0 (15,6 ; 20,1) | 167,7 (144,3 ; 199,2) | 12,2 (10,4 ; 13,4) | 110,5 (94,6 ; 132,9) | 0,84 (0,78 ; 0,89) | 2,86 (2,64 ; 3,16) |
| | 60 | 11,0 (9,9 ; 11,9) | 102,5 (88,4 ; 121,4) | 8,8 (7,5 ; 9,7) | 70,5 (61,3 ; 83,6) | 0,74 (0,70 ; 0,79) | 2,60 (2,43 ; 2,84) |
| | 80 | 7,1 (6,2 ; 7,9) | 66,8 (56,9 ; 80,7) | 6,5 (5,2 ; 7,4) | 47,5 (41,2 ; 56,2) | 0,66 (0,61 ; 0,71) | 2,36 (2,20 ; 2,58) |
| | 100 | 4,8 (4,0 ; 5,6) | 45,7 (38,2 ; 56,5) | 5,0 (3,6 ; 5,9) | 33,4 (28,6 ; 39,9) | 0,59 (0,53 ; 0,64) | 2,15 (1,97 ; 2,38) |
| | 120 | 3,4 (2,7 ; 4,1) | 32,6 (26,7 ; 41,4) | 3,9 (2,6 ; 4,8) | 24,3 (20,2 ; 29,0) | 0,52 (0,46 ; 0,59) | 1,95 (1,75 ; 2,22) |

Discussion

Le premier objectif de ce travail était d'évaluer les performances analytiques du coffret Sebia FLC[®] et de le comparer au coffret Freelite[®]. Pour ce qui est des performances analytiques, les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire, la contamination et les interférences liées aux indices sériques ont été vérifiés et sont conformes aux attentes du laboratoire. À noter cependant des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire qui sont supérieurs à ceux de la méthode turbidimétrique.

D'un point de vue analytique, le coffret Sebia FLC[®] présente plusieurs avantages :

- Un risque faible d'excès d'antigène : en effet, nous n'avons pas rencontré d'excès d'antigène lors de notre étude avec le coffret Sebia FLC[®], ce qui est probablement lié à la meilleure sensibilité d'une technique ELISA par rapport à une technique photométrique, permettant de travailler à une dilution initiale cent fois plus importante qu'avec le coffret Freelite[®]; *a contrario* lors de la comparaison de méthodes, nous avons observé plusieurs phénomènes d'excès d'antigène avec la technique Freelite[®], non détectés en dépit de l'étude de cinétique de réaction par l'analyseur SpaPLUS[®] (93). Ces situations rappellent l'importance d'interpréter le dosage des FLC conjointement aux résultats de l'électrophorèse et de l'immunofixation des protéines sériques.
- Une sensibilité probablement moindre au phénomène de polymérisation des FLC, responsable de surestimation des résultats avec les techniques photométriques (81).

- Une plus grande concordance des résultats avec la mesure tangentielle du pic électrophorétique de chaînes κ ou λ qu'avec la méthode Freelite® d'après les travaux de Jacobs *et al.* (72). Nous n'avons pas été en mesure de vérifier cette affirmation faute de patient présentant un pic électrophorétique quantifiable uniquement constitué de FLC.
- Un nombre de dilutions significativement inférieur ce qui pourrait permettre une économie en coût réactif, en temps technicien et en délai de rendu de résultats en fonction de l'organisation du laboratoire. Cependant, il faut noter que les dilutions éventuellement nécessaires devront être réalisées dans la série suivante ou être anticipés pour un passage sur la même micro-plaque.

Par ailleurs, notre étude montre une bonne corrélation entre les deux méthodes. Cependant, les résultats obtenus avec le coffret Sebia FLC® ne peuvent être utilisés avec les mêmes valeurs seuils qu'avec le coffret Freelite®. En effet, les résultats obtenus en ELISA sont surestimés dans les valeurs basses et sous-estimés de près d'un logarithme dans les valeurs hautes par rapport au coffret Freelite®. Nos résultats confirment les travaux de Jacobs *et al.* (72) et Lutteri *et al.* (94) qui ont mis en évidence des coefficients de corrélation semblables mais des variations de résultats conséquentes entre les deux techniques lors de l'étude du biais.

Cette variabilité des résultats en fonction de la méthode de dosage existe aussi avec d'autres méthodes de dosage des FLC : le coffret N-Latex® (69,95–100), le coffret Diazyme's Human Free Light Chain Assays® (70) ainsi que le coffret Seralite®

(101,102) ne retrouvent pas des résultats équivalents à ceux du coffret Freelite® qui a été utilisé pour l'établissement des recommandations de l'IMWG (15). Le coffret Freelite® est donc aujourd'hui le seul véritablement recommandé dans la prise en charge des gammopathies monoclonales.

Plusieurs pistes peuvent expliquer ces différences :

- Certaines méthodes utilisent des anticorps polyclonaux dont l'intérêt principal est la grande variabilité attendue de la reconnaissance antigénique et ceci au prix d'une variabilité inter-lot accrue. D'autres utilisent des anticorps monoclonaux qui ont l'avantage d'apporter une variabilité inter-lot minimale mais une reconnaissance antigénique théorique réduite.
- L'existence de différents principes de dosage et analyseurs : turbidimétrie, néphélométrie, test immunologique à flux latéral et ELISA.
- Les récents travaux de Caponi *et al.* (103,104) suggèrent que la réactivité différente des réactifs Freelite® et N-Latex® vis-à-vis des formes monomériques, dimériques ou oligomériques des chaînes κ et λ peut expliquer des différences de résultats. De plus, les proportions relatives des différentes formes de FLC contenues dans les calibrateurs de chaque coffret jouent aussi un rôle important dans les différences de quantification des FLC selon les méthodes.
- Cette même étude (104) suggère également que les épitopes reconnus par la technique Freelite® ne sont pas nécessairement préexistants sur la forme complète de l'Ig mais seraient plutôt des néo-épitopes conformationnels issus de dimères de FLC contrairement aux épitopes reconnus par la technique N-Latex® qui seraient présents initialement mais masqués par la structure de l'Ig complète.

L'étude de Cotten *et al.* (105) illustre l'importance de définir des seuils propres à Freelite® en fonction de l'analyseur. Un intervalle de référence du ratio κ/λ propre à la plateforme SpaPLUS® est proposé dans leur travail : 0,36 - 2,07 contre 0,26 - 1,65 sur BNII® (82).

Les intervalles de référence fournisseurs de la technique Sebia FLC® ont été définies dans l'étude de Jacobs *et al.* (72) à partir d'une cohorte présumée saine de 208 donneurs de sang de l'Établissement Français du Sang (EFS) : 0,37 - 1,44 pour le ratio κ/λ .

Nous avons donc souhaité vérifier ces résultats à l'aide de notre cohorte de 121 patients indemnes d'insuffisance rénale d'après les recommandations de l'HAS de février 2012 (MDRD \geq 60) (Table 19) :

Table 19. Comparaison des intervalles de références du ratio κ/λ à partir de notre cohorte de sujets sains (MDRD \geq 60 et MDRD \geq 90) et la littérature

| | MDRD \geq 60 | MDRD \geq 90 | Jacobs <i>et al.</i> (Intervalle de référence fournisseur) | |
|--|------------------------------|------------------------------|---|--|
| Effectif | n = 121 | n = 55 | n = 208 | |
| Intervalles de référence κ/λ Sebia FLC® | 0,49 - 1,42 (0,45 – 1,46) | 0,46 - 1,28 (0,43 – 1,38) | 0,37 - 1,44 | |

| | MDRD \geq 60 | MDRD \geq 90 | Cotten <i>et al.</i> | Katzmann <i>et al.</i> (Intervalle de référence fournisseur) |
|--|------------------------------|------------------------------|----------------------|---|
| Effectif | n = 121 | n = 55 | n = 126 | n = 282 |
| Intervalles de référence κ/λ Freelite® (SpaPLUS®) | 0,60 - 2,45 (0,53 – 3,06) | 0,55 - 2,35 (0,49 – 2,77) | 0,36 - 2,07 | 0,26 – 1,65 |

Plusieurs pistes peuvent expliquer les différences entre nos valeurs et celles publiées dans la littérature :

- Cohorte hospitalière *versus* cohorte EFS
- Choix d'avoir inclus des sujets avec MDRD ≥ 60 alors que les cohortes de Jacobs *et al.* et de Cotten *et al.* comportent probablement des sujets avec MDRD ≥ 90
- Effectif faible pour notre population MDRD ≥ 90
- Influence de la variabilité inter-lots des réactifs pour notre cohorte prospective d'une durée d'inclusion de deux ans
- Possible altération des FLC liée la congélation avec les cohortes de Jacobs *et al.* et Cotten *et al.*

Des intervalles de référence Sebia FLC[®] adaptées à l'insuffisance rénale ont été proposées par Lutteri *et al.* (106). À partir d'une cohorte de 151 sujets indemnes de gammopathies monoclonales présentant une insuffisance rénale, répartis-en 5 catégories correspondant aux recommandations de *the Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*, les auteurs ont pu mettre en évidence une augmentation progressive du ratio κ/λ avec le degré d'insuffisance rénale. Leur décision de procéder à des calculs par sous-groupe de patients a néanmoins conduit à une perte de puissance importante pour certaines catégories (effectifs de CKD2/3/4 à n=12, 16 et 19 respectivement).

De tels effectifs ne sont pas compatibles avec la méthodologie recommandée par le CLSI (92). La méthode que nous avons employée permet de limiter la perte de puissance en lissant le calcul grâce aux équations dérivées de l'ensemble des données (85). Nous avons ainsi précisé les valeurs de référence des FLC κ , FLC λ et

du ratio κ/λ en fonction de l'estimation du DFG par MDRD et CKD-EPI grâce à une méthodologie robuste et une cohorte documentée.

La principale limite de la méthode reste néanmoins une imprécision accrue (IC 90%) élargie aux valeurs extrêmes MDRD/CKD-EPI de la population.

Le deuxième objectif de ce travail était d'étudier la transférabilité de la méthode Sebia FLC[®] dans la prise en charge du myélome multiple et de l'amylose AL compte-tenu du fait que les référentiels ont été établis avec la méthode Freelite[®]. Les variations mises en évidence en montre les difficultés. En effet, les différences observées dans les valeurs de κ et λ impactent le seuil du ratio iFLC/uFLC ainsi que la dFLC. Or, plusieurs études dont celle de Dejoie *et al.* (107) proposent d'abandonner l'analyse du composant monoclonal urinaire comme critère de réponse du MM au profit d'une utilisation plus généralisée des dosages de FLC. Ceci impliquera d'établir au préalable des seuils spécifiques à chaque technique utilisée.

La technologie Freelite[®] est disponible sur de nombreux analyseurs, aussi bien par technique turbidimétrique que néphélométrique, ce qui interroge le biologiste sur la transférabilité des seuils en fonction des appareils. En effet, les travaux de Larsen *et al.* (17) sur le ratio iFLC/uFLC qui ont servi de base aux recommandations de l'IMWG n'ont été menés que sur le néphélomètre BNII[®]. Aucune équipe n'a proposé de seuils pour des turbidimètres plus récents tels que le SpaPLUS[®] ou l'Optilite[®].

De récentes études proposent un ratio iFLC/uFLC spécifique aux coffrets N-Latex[®] (108) et Sebia FLC[®] (109). Dans leur étude de 2018, Caillon *et al.* (109) ont choisi d'appliquer les conclusions de la comparaison de méthode (l'équation de la régression

de Passing-Bablok) pour convertir le ratio historique à 100 du coffret Freelite® en son équivalent pour le coffret Sebia FLC®. Le chiffre avancé de 16 peut être discuté car l'application de la même méthodologie sur notre cohorte, plus conséquente, a conclu respectivement à des seuils de 22,2 (application de l'équation de Deming après log-transformation) ou 40,9 (application d'une équation de Passing-Bablok équivalente à l'étude de Caillon *et al.*). *In fine*, la meilleure méthodologie pour définir un seuil de ratio de FLC utilisable pour le diagnostic de MM devrait être basée sur le suivi prospectif d'une cohorte, comme l'avaient réalisé Larsen *et al.* (17) dans le cadre de l'IMWG.

Concernant l'amylose AL, notre cohorte comportait 28 malades dont 7 ont été suivis prospectivement. Néanmoins seuls deux d'entre eux ont présenté une évolution durant ce suivi, les 5 autres étant déjà en très bonne réponse partielle ou non répondeur. Nous n'avons donc pas pu conclure sur cette pathologie, en dehors du fait que la dFLC semble suivre la même tendance en Freelite® et en Sebia FLC® pour ces deux patients. La constitution d'une nouvelle cohorte spécifique à l'amylose AL au diagnostic pourrait permettre de définir de nouveaux seuils propres à la technique Sebia FLC®.

D'autres applications aux dosages des FLC se développent, notamment pour le diagnostic de maladies inflammatoires du système nerveux central telles que la sclérose en plaques. En effet, de nombreuses études s'intéressent à l'évaluation du dosage des chaînes libres κ et de son intérêt par rapport à l'iso-électrofocalisation dans le liquide cérébro-spinal (LCS). Depuis 2005, les recommandations internationales préconisent l'utilisation de l'iso-électrofocalisation du LCS conjointement à celle du sérum afin de rechercher la présence de bandes oligoclonales dans le LCS, témoins

de la synthèse intrathécale d'Ig. Néanmoins, cette technique reste difficilement automatisable et son interprétation parfois difficile.

Dès 1970, les travaux de Link. *et al.* (110) soulignent la présence de chaînes κ dans le LCS de patients atteints de sclérose en plaque. Aujourd'hui, plusieurs algorithmes sont proposés pour le diagnostic et le pronostic de la sclérose en plaque à l'aide du dosage des FLC κ (111–114) bien qu'aucune de ces études n'ait évalué en parallèle plusieurs techniques de dosage.

Enfin, le développement de la spectrométrie de masse appliquée à la détection et à la quantification des chaînes légères libres est une piste face aux difficultés analytiques et de standardisation entre les différentes méthodes de dosage. En effet, cette approche pourrait permettre une caractérisation et une quantification des FLC monoclonales aussi bien sous formes monomériques, dimériques ou polymériques, tout en s'affranchissant de la composante polyclonale du milieu réactionnel (115). De plus, cette méthodologie ne semble pas être sensible aux limites analytiques des techniques photométriques en milieux troubles telles que l'excès d'antigène (116). Récemment, les travaux de Sepiashvili *et al.* (117) proposaient une méthode d'immuno-enrichissement (118) à l'aide d'anticorps à domaine unique anti-FLC, en anglais *nanobody*, couplés à de la spectrométrie de masse par technique MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight*) qui semble prometteuse pour le diagnostic de gammopathies monoclonales. Néanmoins, la complexité et le coût de ces techniques suggèrent un développement à plus long terme dans nos laboratoires.

Conclusion

Le dosage des chaînes légères libres sériques est aujourd'hui un outil diagnostique et pronostique dans le cadre de gammopathies monoclonales. Depuis 2001 et la commercialisation du coffret Freelite® sur le néphélémètre BNII®, d'autres analyseurs et d'autres technologies sont apparues sur le marché. Le nouveau coffret Sebia FLC adopte une nouvelle approche en s'appuyant sur une technique ELISA sandwich plutôt que sur la turbidimétrie ou la néphélémétrie. D'un point de vue analytique, Sebia FLC® présente plusieurs avantages : un risque faible d'excès d'antigène, une sensibilité probablement moindre au phénomène de polymérisation des FLC, une plus grande concordance des résultats avec la mesure tangentielle du pic électrophorétique de FLC et un nombre de dilutions significativement inférieur à Freelite®. Cependant, les variations de résultats conséquentes entre les deux techniques interrogent sur la transférabilité de seuils tels que l'iFLC/uFLC et la dFLC qui ont été définis à l'aide de Freelite®. D'autres études à l'aide de cohortes multicentriques ciblées seront nécessaires afin de calculer ces nouveaux seuils spécifiques au coffret Sebia FLC® et aux autres techniques disponibles sur le marché.

Références

1. Edmundson AB, Ely KR, Abola EE, Schiffer M, Panagiotopoulos N, Deutsch HF. Conformational isomerism, rotational allomerism, and divergent evolution in immunoglobulin light chains. *Fed Proc.* août 1976;35(10):2119-23.
2. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The generation of diversity in immunoglobulins. *Immunobiol Immune Syst Health Dis* 5th Ed [Internet]. 2001 [cité 22 avr 2019]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27140/>
3. Solomon A. Light chains of human immunoglobulins. *Methods Enzymol.* 1985;116:101-21.
4. Niewold TA, Murphy CL, Weiss DT, Solomon A. Characterization of a light chain product of the human JC lambda 7 gene complex. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 nov 1996;157(10):4474-7.
5. Jefferis R, Lefranc M-P. Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. *mAbs.* août 2009;1(4):332-8.
6. Waldmann TA, Strober W, Mogielnicki RP. The renal handling of low molecular weight proteins. II. Disorders of serum protein catabolism in patients with tubular proteinuria, the nephrotic syndrome, or uremia. *J Clin Invest.* août 1972;51(8):2162-74.
7. Miettinen TA, Kekki M. Effect of impaired hepatic and renal function on [131]bence jones protein catabolism in human subjects. *Clin Chim Acta.* 1 déc 1967;18(3):395-407.
8. Wochner RD, Strober W, Waldmann TA. The role of the kidney in the catabolism of Bence Jones proteins and immunoglobulin fragments. *J Exp Med.* 1 août 1967;126(2):207-21.
9. Hutchison CA, Harding S, Hewins P, Mead GP, Townsend J, Bradwell AR, et al. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* nov 2008;3(6):1684-90.
10. Hutchison CA, Basnayake K, Cockwell P. Serum free light chain assessment in monoclonal gammopathy and kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* nov 2009;5(11):621-8.
11. Napalkov NP, Correa P, Muir C, Waterhouse J, Davis W, World Health Organization, et al. Cancer incidence in five continents. Lyon; Geneva: International Agency for Research on Cancer ; World Health Organization; ///.

12. Palumbo A, Anderson K. Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 17 mars 2011;364(11):1046-60.
13. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. janv 2003;78(1):21-33.
14. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. févr 2009;23(2):215-24.
15. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. nov 2014;15(12):e538-548.
16. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Therneau TM, Larson D, Benson J, et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood*. 15 janv 2008;111(2):785-9.
17. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. avr 2013;27(4):941-6.
18. Kastritis E, Terpos E, Moulopoulos L, Spyropoulou-Vlachou M, Kanellias N, Eleftherakis-Papaiakovou E, et al. Extensive bone marrow infiltration and abnormal free light chain ratio identifies patients with asymptomatic myeloma at high risk for progression to symptomatic disease. *Leukemia*. avr 2013;27(4):947-53.
19. Waxman AJ, Mick R, Garfall AL, Cohen AD, Vogl DT, Stadtmauer EA, et al. Modeling the risk of progression in smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 20 mai 2014;32(suppl 15):8607-8607.
20. Kastritis E, Terpos E, Roussou M, Koutoulidis V, Giannouli S, Gavriatopoulou M, et al. Validation of the Novel Criteria for the Definition of Symptomatic Myeloma: A Single Center Experience in 216 Patients with the Previous Diagnosis of Asymptomatic Disease. *Blood*. 3 déc 2015;126(23):4251-4251.
21. Landgren O. Shall we treat smoldering multiple myeloma in the near future? *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 08 2017;2017(1):194-204.
22. Huang ZQ, Sanders PW. Localization of a single binding site for immunoglobulin light chains on human Tamm-Horsfall glycoprotein. *J Clin Invest*. 15 févr 1997;99(4):732-6.
23. Hutchison CA, Batuman V, Behrens J, Bridoux F, Sirac C, Dispenzieri A, et al. The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma. *Nat Rev Nephrol*. 1 nov 2011;8(1):43-51.

24. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2375-90.
25. Kastritis E, Leblond V, Dimopoulos MA, Kimby E, Staber P, Kersten MJ, et al. Waldenström's macroglobulinaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 oct 2018;29(Suppl 4):iv41-50.
26. Kyle RA, Larson DR, McPhail ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, et al. Fifty-Year Incidence of Waldenström Macroglobulinemia in Olmsted County, Minnesota, From 1961 Through 2010: A Population-Based Study With Complete Case Capture and Hematopathologic Review. *Mayo Clin Proc*. 2018;93(6):739-46.
27. Murray DL, Ryu E, Snyder MR, Katzmann JA. Quantitation of serum monoclonal proteins: relationship between agarose gel electrophoresis and immunonephelometry. *Clin Chem*. août 2009;55(8):1523-9.
28. Roszyk L, Faye B, Tournilhac O, Fogli A, Sapin V. [Monoclonal IgM interference with immunoturbidimetric determination of ferritin and transferrin]. *Ann Biol Clin (Paris)*. déc 2007;65(6):659-62.
29. Shahbaz A, Aziz K, Umair M, Zarghamravanbakhsh P, Sachmechi I. A Patient with Artificially Low Serum High Density Lipoprotein Cholesterol Due to Waldenström Macroglobulinemia. *Cureus [Internet]*. [cité 12 août 2019];10(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6118291/>
30. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 30 mars 2006;354(13):1362-9.
31. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 21 févr 2002;346(8):564-9.
32. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, Cerhan JR, et al. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med*. 18 2018;378(3):241-9.
33. Sandecká V, Hájek R, Pour L, Špička I, Ščudla V, Gregora E, et al. A first Czech analysis of 1887 cases with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Eur J Haematol*. juill 2017;99(1):80-90.
34. Dispenzieri A, Katzmann JA, Kyle RA, Larson DR, Melton LJ, Colby CL, et al. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *Lancet Lond Engl*. 15 mai 2010;375(9727):1721-8.

35. Kyle RA, Larson D, Therneau TM, Dispenzieri A, Benson JT, Melton LJ, et al. Idiopathic Bence Jones Proteinuria (Smoldering Monoclonal Light-Chain Proteinuria): Clinical Course and Prognosis. *Blood*. 16 nov 2012;120(21):1861-1861.
36. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, Melton LJ, Bradwell AR, Clark RJ, et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 1 août 2005;106(3):812-7.
37. Turesson I, Kovalchik SA, Pfeiffer RM, Kristinsson SY, Goldin LR, Drayson MT, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of lymphoid and myeloid malignancies: 728 cases followed up to 30 years in Sweden. *Blood*. 16 janv 2014;123(3):338-45.
38. Quock TP, Yan T, Chang E, Guthrie S, Broder MS. Epidemiology of AL amyloidosis: a real-world study using US claims data. *Blood Adv*. 22 2018;2(10):1046-53.
39. Kumar S, Dispenzieri A, Katzmann JA, Larson DR, Colby CL, Lacy MQ, et al. Serum immunoglobulin free light-chain measurement in primary amyloidosis: prognostic value and correlations with clinical features. *Blood*. 9 déc 2010;116(24):5126-9.
40. Cohen AD, Comenzo RL. Systemic light-chain amyloidosis: advances in diagnosis, prognosis, and therapy. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:287-94.
41. Mollee P, Renaut P, Gottlieb D, Goodman H. How to diagnose amyloidosis. *Intern Med J*. janv 2014;44(1):7-17.
42. Merlini G, Stone MJ. Dangerous small B-cell clones. *Blood*. 15 oct 2006;108(8):2520-30.
43. Kourelis TV, Dasari S, Theis JD, Ramirez-Alvarado M, Kurtin PJ, Gertz MA, et al. Clarifying immunoglobulin gene usage in systemic and localized immunoglobulin light-chain amyloidosis by mass spectrometry. *Blood*. 19 janv 2017;129(3):299-306.
44. Rajkumar SV, Harousseau J-L, Durie B, Anderson KC, Dimopoulos M, Kyle R, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*. 5 mai 2011;117(18):4691-5.
45. Sobh M, Morisset S, Guilli T, Ducastelle-Lepretre S, Barraco F, Chelghoum Y, et al. Serum Kappa/Lambda Ratio, An Independent Prognostic Factor at Diagnosis and Serum Free-Light Chains Level, An Early Indicator of Relapse/Progression In Multiple Myeloma. *Blood*. 19 nov 2010;116(21):2954-2954.

46. Snozek CLH, Katzmann JA, Kyle RA, Dispenzieri A, Larson DR, Therneau TM, et al. Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. *Leukemia*. oct 2008;22(10):1933-7.
47. Kyrtsolis M-C, Vassilakopoulos TP, Kafasi N, Sachanas S, Tzenou T, Papadogiannis A, et al. Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. *Br J Haematol*. mai 2007;137(3):240-3.
48. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):e328-46.
49. Kapoor P, Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi F, Dingli D, et al. Importance of achieving stringent complete response after autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 déc 2013;31(36):4529-35.
50. Hassoun H, Reich L, Klimek VM, Dhodapkar M, Cohen A, Kewalramani T, et al. The Serum Free Light Chain Ratio after One or Two Cycles of Treatment Is Highly Predictive of the Magnitude of Final Response in Patients Undergoing Initial Treatment for Multiple Myeloma. *Blood*. 16 nov 2005;106(11):3481-3481.
51. Fuchida S, Okano A, Hatsuse M, Murakami S, Haruyama H, Itoh S, et al. Serial measurement of free light chain detects poor response to therapy early in three patients with multiple myeloma who have measurable M-proteins. *Int J Hematol*. nov 2012;96(5):664-8.
52. Comenzo RL, Reece D, Palladini G, Seldin D, Santhorawala V, Landau H, et al. Consensus guidelines for the conduct and reporting of clinical trials in systemic light-chain amyloidosis. *Leukemia*. nov 2012;26(11):2317-25.
53. Rezk T, Lachmann HJ, Fontana M, Sachchithanatham S, Mahmood S, Petrie A, et al. Prolonged renal survival in light chain amyloidosis: speed and magnitude of light chain reduction is the crucial factor. *Kidney Int*. 2017;92(6):1476-83.
54. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1953;32(2):230-40.
55. Grabar P, Williams CA. [Method permitting the combined study of the electrophoretic and the immunochemical properties of protein mixtures; application to blood serum]. *Biochim Biophys Acta*. janv 1953;10(1):193-4.
56. Sölling K. Free light chains of immunoglobulins in normal serum and urine determined by radioimmunoassay. *Scand J Clin Lab Invest*. sept 1975;35(5):407-12.

57. Sölling K. Polymeric forms of free light chains in serum from normal individuals and from patients with renal diseases. *Scand J Clin Lab Invest.* sept 1976;36(5):447-52.
58. Cole PW, Durie BG, Salmon SE. Immunoquantitation of free light chain immunoglobulins: applications in multiple myeloma. *J Immunol Methods.* 1978;19(4):341-9.
59. Robinson EL, Gowland E, Ward ID, Scarffe JH. Radioimmunoassay of free light chains of immunoglobulins in urine. *Clin Chem.* nov 1982;28(11):2254-8.
60. Brouwer J, Otting-van de Ruit M, Busking-van der Lely H. Estimation of free light chains of immunoglobulins by enzyme immunoassay. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 30 août 1985;150(3):267-74.
61. Heino J, Rajamäki A, Irtala K. Turbidimetric measurement of Bence-Jones proteins using antibodies against free light chains of immunoglobulins. An artifact caused by different polymeric forms of light chains. *Scand J Clin Lab Invest.* avr 1984;44(2):173-6.
62. Abraham RS, Charlesworth MC, Owen BAL, Benson LM, Katzmann JA, Reeder CB, et al. Trimolecular complexes of lambda light chain dimers in serum of a patient with multiple myeloma. *Clin Chem.* oct 2002;48(10):1805-11.
63. Bergen HR, Abraham RS, Johnson KL, Bradwell AR, Naylor S. Characterization of amyloidogenic immunoglobulin light chains directly from serum by on-line immunoaffinity isolation. *Biomed Chromatogr BMC.* avr 2004;18(3):191-201.
64. Ling NR, Lowe J, Hardie D, Evans S, Jefferis R. Detection of free kappa chains in human serum and urine using pairs of monoclonal antibodies reacting with C kappa epitopes not available on whole immunoglobulins. *Clin Exp Immunol.* avr 1983;52(1):234-40.
65. Axiak SM, Krishnamoorthy L, Guinan J, Raison RL. Quantitation of free kappa light chains in serum and urine using a monoclonal antibody based inhibition enzyme-linked immunoassay. *J Immunol Methods.* 4 mai 1987;99(1):141-7.
66. Nelson M, Brown RD, Gibson J, Joshua DE. Measurement of free kappa and lambda chains in serum and the significance of their ratio in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol.* juin 1992;81(2):223-30.
67. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT, et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem.* avr 2001;47(4):673-80.
68. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC, Drayson MT. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet Lond Engl.* 8 févr 2003;361(9356):489-91.
69. te Velthuis H, Knop I, Stam P, van den Broek M, Bos HK, Hol S, et al. N Latex FLC - new monoclonal high-performance assays for the determination of free light chain kappa and lambda. *Clin Chem Lab Med.* août 2011;49(8):1323-32.

70. Smith A, Wu AHB. Analytical and clinical concordance of free light chain assay. *Pract Lab Med.* janv 2019;13:e00112.
71. Campbell JP, Heaney JLJ, Shemar M, Baldwin D, Griffin AE, Oldridge E, et al. Development of a rapid and quantitative lateral flow assay for the simultaneous measurement of serum κ and λ immunoglobulin free light chains (FLC): Inception of a new near-patient FLC screening tool. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(3):424-34.
72. Jacobs JFM, de Kat Angelino CM, Brouwers HMLM, Croockewit SA, Joosten I, van der Molen RG. Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods. *Clin Chem Lab Med.* 26 janv 2018;56(2):312-22.
73. Bosmann M, Kössler J, Stolz H, Walter U, Knop S, Steigerwald U. Detection of serum free light chains: the problem with antigen excess. *Clin Chem Lab Med.* oct 2010;48(10):1419-22.
74. Vercammen MJ, Broodtaerts L, Meirlaen P, Bossuyt X. Overestimation of free light chain antigen excess rate. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 15 avr 2015;444:297-302.
75. Murata K, Clark RJ, Lockington KS, Tostrud LJ, Greipp PR, Katzmann JA. Sharply increased serum free light-chain concentrations after treatment for multiple myeloma. *Clin Chem.* janv 2010;56(1):16-8.
76. Vercammen M, Meirlaen P, Broodtaerts L, Vande Broek I, Bossuyt X. Effect of sample dilution on serum free light chain concentration by immunonephelometric assay. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 18 sept 2011;412(19-20):1798-804.
77. Jacobs JFM, van der Molen RG, Bossuyt X, Damoiseaux J. Antigen excess in modern immunoassays: to anticipate on the unexpected. *Autoimmun Rev.* févr 2015;14(2):160-7.
78. Bossuyt X, Delforge M, Reynders M, Dillaerts D, Sprangers B, Fostier K, et al. Antigen excess detection by automated assays for free light chains. *Clin Chem Lab Med.* 28 août 2018;56(9):e235-8.
79. Rassner MP, Seidl M, Salzer U, Rajkumar SV, Epting T, Wäsch R, et al. Cast Nephropathy and Deceptively Low Absolute Serum Free Light Chain Levels: Resolution of a Challenging Case and Systematic Review of the Literature. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2018;18(1):e1-7.
80. Briand P-Y, Decaux O, Caillon H, Grosbois B, Le Treut A, Guenet L. Analytical performance of the serum free light chain assay. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(1):73-9.
81. de Kat Angelino CM, Raymakers R, Teunesen MA, Jacobs JFM, Klasen IS. Overestimation of serum kappa free light chain concentration by immunonephelometry. *Clin Chem.* juill 2010;56(7):1188-90.

82. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem*. sept 2002;48(9):1437-44.
83. Giannoli J-M, Szymanowicz A. Proposed recommendations for the practical use of internal quality controls (IQC) in a medical biology laboratory. *Ann Biol Clin (Paris)*. juill 2011;69(4):489-98.
84. Budd JR, Clinical and Laboratory Standards Institute. Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples: approved guideline. Wayne, PA: CLSI; 2013.
85. Jones GRD, Haeckel R, Loh TP, Sikaris K, Streichert T, Katayev A, et al. Indirect methods for reference interval determination - review and recommendations. *Clin Chem Lab Med*. 19 déc 2018;57(1):20-9.
86. Wright EM, Royston P. Simplified estimation of age-specific reference intervals for skewed data. *Stat Med*. 30 déc 1997;16(24):2785-803.
87. C. Ricós MS V Alvarez, F Cava, JV García-Lario, A Hernández, CV Jiménez, J Minchinela, C Perich. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest*. 1 janv 1999;59(7):491-500.
88. Vassault A, Grafmeyer D, Graeve J de, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Ann Biol Clin (Paris)*. 24 nov 1999;57(6):685-95.
89. Wang L, Chan PCR. Measurement uncertainty for serum free light chain assays: Estimation and implication on result interpretation. *Clin Biochem*. 1 mars 2013;46(4):381-4.
90. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*. 16 mars 1999;130(6):461-70.
91. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 5 mai 2009;150(9):604-12.
92. Horowitz GL, Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline. Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
93. Pekar J-D, Schraen S, Grzych G, Manier S, Onraed B. Antigen excess pitfall for free light chains measurements solved by ELISA assay. *Am J Hematol*. 25 janv 2019;
94. Lutteri L, Aldenhoff M-C, Cavalier E. Evaluation of the new Sebia free light chain assay using the AP22 ELITE instrument. *Clin Chim Acta*. 1 déc 2018;487:161-7.

95. Hoedemakers RMJ, Pruijt JFM, Hol S, Teunissen E, Martens H, Stam P, et al. Clinical comparison of new monoclonal antibody-based nephelometric assays for free light chain kappa and lambda to polyclonal antibody-based assays and immunofixation electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*. 23 nov 2011;50(3):489-95.
96. Lock RJ, Saleem R, Roberts EG, Wallage MJ, Pesce TJ, Rowbottom A, et al. A multicentre study comparing two methods for serum free light chain analysis. *Ann Clin Biochem*. mai 2013;50(Pt 3):255-61.
97. Schneider N, Wynckel A, Kolb B, Sablon E, Gillery P, Maquart F-X. [Comparative analysis of immunoglobulin free light chains quantification by Freelite™ (The Binding Site) and N Latex FLC (Siemens) methods]. *Ann Biol Clin (Paris)*. févr 2013;71(1):13-9.
98. Kim H-S, Kim HS, Shin K-S, Song W, Kim HJ, Kim HS, et al. Clinical comparisons of two free light chain assays to immunofixation electrophoresis for detecting monoclonal gammopathy. *BioMed Res Int*. 2014;2014:647238.
99. Messiaen A-S, De Sloovere MMW, Claus P-E, Vercammen M, Van Hoovels L, Heylen O, et al. Performance Evaluation of Serum Free Light Chain Analysis: Nephelometry vs Turbidimetry, Monoclonal vs Polyclonal Reagents. *Am J Clin Pathol*. 1 juin 2017;147(6):611-22.
100. White-Al Habeeb NMA, Earle T, Spencer M, Blasutig IM. Evaluation of the N-latex serum free light chain assay on the Siemens BNII analyzer and agreement with The Binding Site FreeLite assay on the SPAPLus. *Clin Biochem*. janv 2018;51:90-6.
101. Mollee P, Pretorius C, Drayson MT, Tate J. Clinical Comparison of a New Serum Free Light Chain (FLC) Assay Based on the Seralite Monoclonal Anti-FLC Antibodies with the Freelite and N-Latex FLC Assays in the Diagnosis of AL Amyloidosis. *Blood*. 7 déc 2017;130(Suppl 1):4345-4345.
102. Heaney JLJ, Campbell JP, Griffin AE, Birtwistle J, Shemar M, Child JA, et al. Diagnosis and monitoring for light chain only and oligosecretory myeloma using serum free light chain tests. *Br J Haematol*. 2017;178(2):220-30.
103. Caponi L, Franzini M, Koni E, Masotti S, Petrini M, Paolicchi A. Discrepancy between FLC assays: only a problem of quantification? *Clin Chem Lab Med CCLM*. 2016;54(6):1111–1113.
104. Caponi L, Koni E, Romiti N, Paolicchi A, Franzini M. Different immunoreactivity of monomers and dimers makes automated free light chains assays not equivalent. *Clin Chem Lab Med CCLM*. 19 déc 2018;57(2):221-9.
105. Cotten SW, Shajani-Yi Z, Cervinski MA, Voorhees T, Tuchman SA, Korpi-Steiner N. Reference intervals and diagnostic ranges for serum free κ and free λ immunoglobulin light chains vary by instrument platform: Implications for classification of patient results in a multi-center study. *Clin Biochem*. 6 juin 2018;

106. Lutteri L, Jacobs JFM. Reference ranges of the Sebia free light chain ratio in patients with chronic kidney disease. *Clin Chem Lab Med*. 28 août 2018;56(9):e232-4.
107. Dejoie T, Corre J, Caillon H, Moreau P, Attal M, Loiseau HA. Responses in multiple myeloma should be assigned according to serum, not urine, free light chain measurements. *Leukemia*. 2019;33(2):313-8.
108. Henriot B, Rouger E, Rousseau C, Escoffre M, Sébillot M, Bendavid C, et al. Prognostic value of involved/uninvolved free light chain ratio determined by Freelite and N Latex FLC assays for identification of high-risk smoldering myeloma patients. *Clin Chem Lab Med CCLM* [Internet]. 2019 [cité 20 juill 2019];0(0). Disponible sur: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.ahead-of-print/cclm-2018-1369/cclm-2018-1369.xml>
109. Caillon H, Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Decaux O, Dejoie T. Evaluation of the Sebia Free Light Chain assay: comparison with the Freelite assay for the clinical management of diagnosis, response and relapse assessment in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 28 janv 2019 [cité 8 févr 2019];0(0). Disponible sur: [https://www.clinical-lymphoma-myeloma-leukemia.com/article/S2152-2650\(18\)31743-9/abstract](https://www.clinical-lymphoma-myeloma-leukemia.com/article/S2152-2650(18)31743-9/abstract)
110. Link H, Zettervall O. Multiple sclerosis: disturbed kappa: lambda chain ratio of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid. *Clin Exp Immunol*. mars 1970;6(3):435-8.
111. Valencia-Vera E, Martinez-Escribano Garcia-Ripoll A, Enguix A, Abalos-Garcia C, Segovia-Cuevas MJ. Application of κ free light chains in cerebrospinal fluid as a biomarker in multiple sclerosis diagnosis: development of a diagnosis algorithm. *Clin Chem Lab Med*. 28 2018;56(4):609-13.
112. Rathbone E, Durant L, Kinsella J, Parker AR, Hassan-Smith G, Douglas MR, et al. Cerebrospinal fluid immunoglobulin light chain ratios predict disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 9 mai 2018;
113. Süße M, Hannich M, Petersmann A, Zylla S, Pietzner M, Nauck M, et al. Kappa free light chains in cerebrospinal fluid to identify patients with oligoclonal bands. *Eur J Neurol*. 23 avr 2018;
114. Christiansen M, Gjelstrup MC, Stilund M, Christensen T, Petersen T, Jon Møller H. Cerebrospinal fluid free kappa light chains and kappa index perform equal to oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Chem Lab Med CCLM*. 19 déc 2018;57(2):210-20.
115. Barnidge DR, Dispenzieri A, Merlini G, Katzmann JA, Murray DL. Monitoring free light chains in serum using mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med*. 1 juin 2016;54(6):1073-83.
116. VanDuijn MM, Jacobs JFM, Wevers RA, Engelke UF, Joosten I, Luider TM. Quantitative measurement of immunoglobulins and free light chains using mass spectrometry. *Anal Chem*. 18 août 2015;87(16):8268-74.

117. Sepiashvili L, Kohlhagen MC, Snyder MR, Willrich MAV, Mills JR, Dispenzieri A, et al. Direct Detection of Monoclonal Free Light Chains in Serum by Use of Immunoenrichment-Coupled MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Clin Chem.* 1 août 2019;65(8):1015-22.
118. Mills JR, Kohlhagen MC, Dasari S, Vanderboom PM, Kyle RA, Katzmann JA, et al. Comprehensive Assessment of M-Proteins Using Nanobody Enrichment Coupled to MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Clin Chem.* 1 oct 2016;62(10):1334-44.

Annexes

ANNEXE 1

Antigen excess pitfall for free light chains measurements solved by ELISA assay.

Jean-David PEKAR¹, Susanna SCHRAEN¹, Guillaume GRZYCH^{1,2}, Salomon MANIER³, Brigitte ONRAED¹

Affiliations:

¹University of Lille, CHU, Biochemistry and Molecular Biology Department, Lille, France

²University of Lille, INSERM UMR-1011, CHU Lille, France

³University of Lille, CHU, Hematology Department, Lille, France

Correspondence: Jean-David PEKAR

Laboratory of Biology, Biology and Pathology Center, Lille University Hospital,
Pr J. Leclercq Boulevard, 59037, Lille Cedex, France,

Phone: +33(0)6.45.03.01.38

Mail: jeandavid.pekar@chru-lille.fr

Pekar J-D, Schraen S, Grzych G, Manier S, Onraed B. Antigen excess pitfall for free light chains measurements solved by ELISA assay. Am J Hematol. 25 janv 2019; <https://doi.org/10.1002/ajh.25422>

To the Editor:

The role of serum free light chains (SFLC) assessment is increasingly important in the management of patients with multiple myeloma (MM), as well as other monoclonal gammopathies. For instance, about 15% of MM secretes light chain only and must be followed using SFLC assays. In other cases, a free light chain escape is observed at relapse. Moreover, the new IMWG criteria also include the ratio of SFLC to define symptomatic MM and to evaluate the response (stringent complete remission). Nonetheless, FLC measurements remain challenging in some cases especially in the context of antigen excess.¹ In this case report, we emphasize that this issue can be addressed by using a novel specific SLFC assay.

Antigens at high concentrations can interfere with the antigen- antibody reaction and lead to false low SFLC results in patients with MM. Underestimation of SFLC could lead to inappropriate disease management. Some studies have tried to quantify this phenomenon and reported a frequency between 0.12% and 5.4%.^{1,2} The immunoturbidimetry Freelite assay (The Binding Site, Birmingham, UK) includes a control step for antigen excess in order to prevent SLFC underestimation. The assay can detect atypical reaction kinetic by measuring the rate of the reaction at three different time windows in order to identify samples that have a relatively high initial rate of reaction. Suspects' samples are re-assayed at the higher re-dilution.² However, this auto- mated detection of antigen excess remains uncompleted and prone to error. In addition to systematic dilutions difficult to perform routinely on all samples, few solutions exist to solve this pitfall but not prevent it.³ Recently, a new sandwich ELISA assay was developed by Sebia (Lisses, France) can avoid this problem. Indeed, the higher sensitivity of the test allows to use larger dilutions than Freelite (100 times) so that the risk of antigen excess is significantly reduced.

Here, we report three cases of antigen excess pitfall with Freelite assay, resolved by Sebia FLC. All data were retrieved from a human biological database authorized by the French Ministry of Research (No.DC-2008-642). Therefore, no written informed consent was collected from this population.

The first patient (P1) is a 55-year-old male with asthenia and renal failure. Serum protein electrophoresis (SPEP) and immunofixation (Sebia Hydrasys 2^{scan}) revealed a monoclonal peak in the beta1 globulins area and showed an excess of lambda light chains in addition to a monoclonal IgA lambda.

The second patient (P2) is a 74-year-old male with similar symptoms. SPEP revealed two monoclonal peaks in gamma globulins area. The immunofixation test revealed two bands with the anti-lambda antiserum without similar bands with anti-gamma, anti-mu,

and anti-alpha antisera. Samples were sent to our laboratory in order to rule out monoclonal IgD or IgE gammopathies.

The third patient (P3) is a 62-year-old male with a 10-year history of IgA MM. He was treated with autologous stem-cell transplantation and VTD (bortezomib, thalidomide, and dexamethasone). Second-line treatment consisted of 66-cycles carfilzomib-lenalidomide-dexamethasone. Third-line was pomalidomide-dexamethasone, fourth-line by daratumumab-bortezomib-dexamethasone, and fifth line with doxorubicin-ixazomib-dexamethasone. Finally, he was treated with chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells in September 2018. The SPEP and immunofixation revealed a monoclonal peak in the gamma globulins area and showed a monoclonal IgA kappa.

A free light chain assay was performed according to the two methods: immunoturbidimetry Freelite assay on the SPAplus analyzer at the recommended initial dilution of 1/10 and ELISA assay Sebia FLC on the das AP22 ELITE at the recommended initial dilution of 1/1000.

Lambda free light chains concentrations with Freelite assay were moderately increased with 131 mg/L for P1 and 159 mg/L for P2 at initial dilution (Table 1). Kappa free light chains concentration with Freelite assay was lower than 4.1 mg/L for P3. The serum involved/ uninvolved free light chain ratios (iFLC/uFLC) were lower than 100. The analyzer SPA Plus did not report any alarm for antigen excess. Given the results of serum immunofixation, additional manual dilutions were performed at 1/1000 and 1/10 000, providing very high concentrations of involved free light chains: 29 238 mg/L for P1, 57 922 mg/L for P2, and 2630 mg/L for P3. At the last dilution, iFLC/uFLC ratios were higher than 100. Comparatively, Sebia FLC assay gave values above 90 mg/L for all samples at initial dilution. The final results of involved free light chains after automatic dilutions at 1/100 000 were 1791 mg/L for P1, 1138 mg/L for P2, and 3339 mg/L for P3.

Our report illustrates the possible underestimation of Freelite SFLC in case of antigen excess. In these three cases, the new Sebia FLC assay overcame this difficulty without any antigen detection system like Freelite by using an initial dilution 100 times greater combined with multiples wash steps.

| Dilutions | Patient 1 | | Patient 2 | | Patient 3 | |
|-----------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
| | Lambda Freelite® (mg/L) | Lambda Sebia FLC® (mg/L) | Lambda Freelite® (mg/L) | Lambda Sebia FLC® (mg/L) | Kappa Freelite® (mg/L) | Kappa Sebia FLC® (mg/L) |
| 1/10 | 131 | - | 159 | - | <4,1 | - |
| 1/1000 | >16800 | >90 | >16800 | >90 | 2630 | >90 |
| 1/10000 | 29238 | >900 | 57922 | >900 | - | >900 |
| 1/100000 | - | 1791 | - | 1138 | - | 3339 |

Table 1. Serum free light chains measurement according to successive dilution performed on two different assays, Freelite (Immunoturbidimetry) and Sebia FLC (ELISA). Standard lambda Freelite (mg/L): 5.71-26.3; Standard lambda Sebia FLC (mg/L): 8.2-18.1; Standard kappa Freelite (mg/L): 3.3-19.4; Standard kappa Sebia FLC (mg/L): 5.2-15.4. Bold values correspond to final results.

We noticed significant differences between the final results of the two methods. This is consistent with recent studies reported that Freelite assay provide higher values than Sebia FLC, and the bias increased proportionally with SFLC levels.⁴ However, differences observed between the two assays in our cases could not completely relate to the negative bias in high values described for the Sebia method. Measurements obtained with Freelite reagent are obviously overestimated and quantitatively inconsistent with the electrophoretic profiles and could be explained by FLC polymerization. Indeed, FLC molecules are usually monomers or dimers⁵ but higher polymeric forms frequently occur. The polymers act as multiantigenic targets in immunoprecipitation assays, which accelerate aggregates formation and leads to overestimation of antigen measurement.⁶ These three cases also highlight the importance of a careful analysis of SFLC results, in conjunction with other tests such as SPEP, urine electrophoresis, immunotyping, bone marrow biopsy immunohistochemistry, and clinical history; especially since the phenomenon can even occur for commonly measured SFLC concentrations for patient 3.

In conclusion, our report shows that the new sandwich ELISA Sebia FLC is a good alternative to SFLC assessment and can avoid the problem of antigen excess.

The results also emphasize the variability of SFLC measurements depending on SFLC assays and related to polymerization. With the development of new tests for SFLC measurement, a standardization of these assays will therefore be necessary.

REFERENCES

1. Bosmann M, Kössler J, Stolz H, Walter U, Knop S, Steigerwald U. Detection of serum free light chains: the problem with antigen excess. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(10):1419-1422. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.283>.
2. Vercammen M, Meirlaen P, Broodtaerts L, Vande Broek I, Bossuyt X. Effect of sample dilution on serum free light chain concentration by immunonephelometric assay. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2011;412 (19–20):1798-1804. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.06.021>.
3. Rassner MP, Seidl M, Salzer U, et al. Cast nephropathy and deceptively low absolute serum free light chain levels: resolution of a challenging case and systematic review of the literature. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18(1):e1-e7. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2017.09.019>.
4. Jacobs JFM, de Kat Angelino CM, Brouwers HMLM, Croockewit SA, Joosten I, van der Molen RG. Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(2):312-322. <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0339>.
5. Kaplan B, Golderman S, Aizenbud B, et al. Immunoglobulin-free light chain monomer-dimer patterns help to distinguish malignant from pre- malignant monoclonal gammopathies: a pilot study. *Am J Hematol*. 2014;89(9):882-888. <https://doi.org/10.1002/ajh.23773>.
6. de Kat Angelino CM, Raymakers R, Teunesen MA, Jacobs JFM, Klasen IS. Overestimation of serum kappa free light chain concentration by immunonephelometry. *Clin Chem*. 2010;56(7):1188-1190. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.143529>.

ANNEXE 2

Résultats détaillés des études d'interférences

| Interférence hémoglobine | κ (Sebia FLC®) | Biais (%)* | λ (Sebia FLC®) | Biais (%)* | Hémoglobine théorique (g/L) |
|---------------------------------------|----------------|------------|----------------|------------|-----------------------------|
| Tube 1 (absence d'hémoglobine) | 4,89 | | 9,01 | | 0 |
| Tube 2 | 5,07 | 4% | 9,01 | 0% | 0,8 |
| Tube 3 | 4,72 | -3% | 9,17 | 2% | 2,5 |
| Tube 4 | 4,25 | -13% | 9,3 | 3% | 3,8 |
| Tube 5 | 5,79 | 18% | 9,21 | 2% | 5,5 |
| Tube 6 | 5,2 | 6% | 8,89 | -1% | 7,6 |

| Interférence lipides | κ (Sebia FLC®) | Biais (%)* | λ (Sebia FLC®) | Biais (%)* | Triglycécide théorique (g/L) |
|------------------------------------|----------------|-------------|----------------|-------------|------------------------------|
| Tube 1 (taux physiologique) | 6,6 | | 10,67 | | 1,8 |
| Tube 2 | 6,75 | 2% | 12,14 | 14% | 2,7 |
| Tube 3 | 5,2 | -21% | 10,21 | -4% | 4,1 |
| Tube 4 | 5,07 | -23% | 9,01 | -16% | 4,4 |
| Tube 5 | 5,12 | -22% | 9,63 | -10% | 6,2 |

| Interférence bilirubine | κ (Sebia FLC®) | Biais (%)* | λ (Sebia FLC®) | Biais (%)* | Bilirubine totale (mg/L) |
|------------------------------------|----------------|-------------|----------------|-------------|--------------------------|
| Tube 1 (taux physiologique) | 6,88 | | 7,88 | | 2,9 |
| Tube 2 | 6,74 | -2% | 7,2 | -9% | 18,1 |
| Tube 3 | 6,87 | 0% | 6,72 | -15% | 32,2 |
| Tube 4 | 7 | 2% | 8,51 | 8% | 57,9 |
| Tube 5 | 5,93 | -14% | 7,48 | -5% | 140,9 |
| Tube 6 | 6,48 | -6% | 8,47 | 7% | 212,2 |
| Tube 7 | 5,97 | -13% | 7,12 | -10% | 267,8 |

*Les biais par rapport aux tubes 1 constatés sont acceptés au vu des limites acceptables en cas de repasse (23% pour les FLC κ et 16% pour les FLC λ)

AUTEUR : Nom : Pekar

Prénom : Jean-David

Date de Soutenance : 8 octobre 2019

Titre de la Thèse : Dosage des chaînes légères libres sériques par ELISA : du biologiste au clinicien

Thèse - Médecine - Lille 2019

Cadre de classement : *Biologie médicale*

DES + spécialité : *Biologie médicale*

Mots-clés : ELISA – Comparaison de méthodes – FLC – Myélome multiple – Freelite® - Sebia FLC®

Résumé :

Contexte : Les chaînes légères libres sériques sont devenues des biomarqueurs utilisés quotidiennement dans le cadre de gammopathies monoclonales. De nombreuses difficultés analytiques subsistent néanmoins avec les techniques classiques de turbidimétrie et néphélométrie. Récemment, une nouvelle approche par ELISA pourrait permettre de s'affranchir de certaines de ces difficultés. L'objectif de ce travail est d'étudier les performances analytiques du nouveau coffret Sebia FLC® par rapport au coffret Freelite® utilisé au laboratoire, de vérifier les intervalles de référence du fournisseur et d'évaluer la transférabilité de cette méthode vis-à-vis des référentiels existants.

Méthode : Nous avons inclus 1155 patients de façon prospective au laboratoire de Biochimie des Protéines du CHU de Lille. Les dosages des FLC ont été réalisés avec la technique Freelite® sur l'analyseur SpaPLUS® et avec la technique Sebia FLC® sur l'analyseur DAS AP22 ELITE. La validation de méthode suit la méthodologie décrite par le COFRAC et les recommandations du CLSI. Nous avons également suivi 96 patients afin de vérifier que les résultats obtenus avec la technique Sebia FLC® renseignent le clinicien de façon identique à ceux de la méthode Freelite®.

Résultats : Notre étude montre une bonne corrélation ainsi qu'une bonne concordance entre les deux méthodes. Néanmoins, les résultats obtenus avec la technique Sebia FLC® sont surestimés dans les valeurs basses et sous-estimés dans les valeurs hautes par rapport à Freelite®. Nous avons pu observer un nombre de dilutions nécessaires significativement inférieur avec la technique Sebia FLC® et une absence d'excès d'antigène sur notre cohorte. L'évolution du ratio κ/λ et de la dFLC semblent suivre la même tendance avec les deux techniques malgré des différences d'amplitude plus marquées avec la technique Freelite®.

Conclusion : Le nouveau coffret Sebia FLC adopte une nouvelle approche pour le dosage des FLC en s'appuyant sur une technique ELISA plutôt que sur la turbidimétrie ou la néphélométrie. D'un point de vue analytique, Sebia FLC® présente plusieurs avantages. Cependant, les variations de résultats conséquentes entre les deux techniques interrogent sur la transférabilité de seuils tels que l'iFLC/uFLC et la dFLC qui ont été définies à l'aide de Freelite®. D'autres études à l'aide de cohortes multicentriques ciblées seront nécessaires afin de calculer ces nouveaux seuils spécifiques au coffret Sebia FLC® et aux autres techniques disponibles sur le marché.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Pr Pascal PIGNY

Asseseurs : Monsieur le Pr Thierry BROUSSEAU

Madame le Dr Susanna SCHRAEN

Monsieur le Dr Louis TERRIOU

Directeur : Madame le Dr Brigitte ONRAED