

Audrey BIDE¹, Gérald MARIT², Annie M. BÉRARD^{1*}

Intérêt du dosage des chaînes légères libres des immunoglobulines

RÉSUMÉ

Les chaînes légères libres monoclonales sont retrouvées dans le sérum et les urines de patients atteints de pathologies lymphoprolifératives de la lignée B, incluant le myélome multiple. Leur dosage sérique permet notamment de faciliter le diagnostic et la surveillance des myélomes multiples à chaînes légères libres. De plus, il pourrait être bénéfique dans le suivi des myélomes multiples à immunoglobuline complète traités et des gammopathies monoclonales de signification indéterminée.

MOTS-CLÉS

Chaînes légères libres des immunoglobulines, dysglobulinémie monoclonale, myélome multiple.

Interest of serum free light chain assays

SUMMARY

Monoclonal free light chains are found in the serum and urine of patients with B-cell proliferative disorders, including multiple myeloma. Measuring free light chains in serum is useful for the diagnosis and monitoring of free light chains diseases. Moreover it could be interesting in the monitoring of treated multiple myeloma with complete immunoglobulin and of monoclonal gammopathy of undetermined significance.

KEYWORDS

Free light chains of immunoglobulins, monoclonal gammopathy, myeloma.

I – Rappels physiopathologiques et cliniques

1. Myélome multiple

Le myélome multiple (MM) constitue une maladie rare (10% des hémopathies malignes, 1 à 2 nouveaux cas / 10 000 habitants), elle se voit après 45 ans, surtout après 60 ans, et touche plus les hommes que les femmes. La cellule myélomateuse semble être issue d'un compartiment B précommuté ayant subi un processus d'hypermutation somatique après stimulation antigénique. La cellule myélomateuse, porteuse d'une spécificité anticorps de faible affinité, échappe aux mécanismes régulateurs normaux du processus de maturation d'affinité. Les étapes de l'apparition du myélome pourraient donc être : stimulation antigénique, sélection de clone anormal, expansion de ce clone, progression

vers la malignité à la suite d'événements génétiques comme l'activation d'oncogènes.

Le plasmocyte myélomateux produit et excrète une immunoglobuline monoclonale (Ig mc) le plus souvent complète, sinon seulement une chaîne légère libre (CLL). Les signes cliniques et biologiques sont dus à la fois à la prolifération plasmocytaire et à la pathogénéicité de l'Ig mc.

1.1 – Signes en relation avec la prolifération plasmocytaire

• Signes osseux

La sécrétion de cytokines telles que l'interleukine (IL) 6, l'IL 1, le TNF alpha (« tumor necrosis factor alpha ») provoque une activation ostéoclastique à l'origine de modifications de l'équilibre construction / destruction osseuse. Celles-ci conduisent cliniquement à des douleurs osseuses diffuses (80% des cas) principalement localisées au rachis

¹ Service de Biochimie, ² Service d'Hématologie Clinique – Maladies du sang, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux

* Pour correspondance

¹ Groupe Hospitalier Sud – Avenue de Magellan – 33604 Pessac – Tél. : 05 57 65 65 45 – E-Mail : annie.berard@chu-bordeaux.fr

Intérêt du dosage des chaînes légères libres des immunoglobulines

NOTE

Cet article constitue l'adaptation de l'atelier « Apport du screening par électrophorèse des protéines sériques associé au dosage des chaînes légères libres » présenté dans le cadre du 34e colloque du SNBH (Perpignan, 2005).

et aux côtes, et radiologiquement à une déminéralisation osseuse, des lésions ostéolytiques dites « à l'emporte-pièce » pouvant atteindre tout type d'os et parfois responsables de fractures. L'hypercalcémie (10%) de mauvais pronostic représente un autre aspect des complications osseuses.

• **Signes d'insuffisance médullaire**

- anémie (50%) normocytaire, normochrome, aré-générative, aggravée dans le cas d'hémodilution par hyperprotidémie et d'insuffisance rénale ;
- leucopénie (risque d'infections) et thrombopénie au cours de l'évolution ;
- hypogammaglobulinémie par baisse des Ig polyclonales « normales » favorisant les infections récidivantes.

1.2 – Signes en relation avec la pathogénéicité de l'Ig mc

• **Signes d'atteinte rénale**

- tubulopathie responsable de 80% des insuffisances rénales au cours du MM, favorisée par la déshydratation et l'hypercalcémie ; il s'agit de l'obstruction tubulaire liée à la précipitation intra-tubulaire des CLL néphrotoxiques et la protéine de Tamm et Horsfall ; il peut s'agir du syndrome de Fanconi (kappa libre ++) avec glycosurie sans hyperglycémie, acidose chronique ;
- glomérulopathie dans le cas d'amylose ou de syndrome de Randall.

• **Activité auto-anticorps possible de l'Ig mc**

Anémie hémolytique, activité anti-coagulante.

• **Amylose par accumulation de CLL**

Atteinte rénale, atteinte cardiaque, manifestations dermatologiques, neuropathie amyloïde.

2 - Critères de diagnostic du myélome multiple (SWOG)

2.1- Myélome multiple à Ig mc complète

Les critères diagnostiques du myélome multiple définis par le South Western Oncology Group (SWOG, voir www.swog.org) sont présentés dans le Tableau I (voir partie A). Le diagnostic est confirmé si au moins un critère majeur (I, II, III) et un critère mineur (a, b, c, d) sont associés, ou si 3 critères mineurs dont a + b sont associés (voir *tableau I, partie B*).

2.2- Particularités des myélomes à chaînes légères libres

Ils pourraient représenter jusqu'à 20% des MM. Ils s'accompagnent d'une vitesse de sédimentation normale, d'une hypogammaglobulinémie fréquente, d'une insuffisance rénale dans près de 65% des cas au diagnostic due à la toxicité rénale des CLL (tubulopathie).

Les outils de détection de l'hypersécrétion d'une CLL sont :

- l'électrophorèse capillaire ou en gel d'agarose qui met en évidence le plus souvent une hypogammaglobulinémie, parfois accompagnée d'une restriction d'hétérogénéité voire un pic d'allure mc en position gammaglobulinique, ou alpha ou bêta-globulinique plus difficilement détectable ;
- l'immunofixation mais dont le seuil de sensibilité est de l'ordre de 300 à 500 mg/L pour les CLL notamment lambda ;
- la protéinurie des 24 h. et la recherche de la protéinurie de Bence Jones (CLL excrétée) avec plusieurs difficultés rencontrées :
 - difficulté de recueil des urines des 24 h. ;
 - sous-évaluation très importante de la protéinurie totale par manque de révélation des CLL par les réactifs colorimétriques des protéines (*figure 1*, voir page suivante) ;
 - sous-évaluation très importante du pic de CLL lors de l'intégration densitométrique à l'électrophorèse pour les mêmes raisons ;
 - difficulté à évaluer la CLL mc qui peut co-migrer avec l'Ig mc complète ou lors de présence d'Ig polyclonales ce qui peut entraîner des faux négatifs ;
 - erreur induite par un coefficient de concentration des urines théorique de 100 mais en pratique de 80 à 120 en moyenne ;
 - méthode caduque en cas de tubulopathie.

L'ensemble de ces critiques a donc soulevé le problème du diagnostic des myélomes à CLL.

Tableau I
Critères diagnostiques du SWOG (A) et confirmation du diagnostic du myélome multiple (B).

A		
Critères majeurs		
I - Plasmocytome sur biopsie tissulaire		
II - Plasmocytose médullaire supérieure à 30 %		
III - Composant monoclonal mis en évidence à l'électrophorèse capillaire ou en gel d'agarose et caractérisé par immunofixation :		
α - supérieur à 35 g/L s'il s'agit d'une IgG		
β - supérieur à 20 g/L s'il s'agit d'une IgA		
χ - supérieur ou égal à 1g/24H s'il s'agit de l'excrétion urinaire de CLL kappa ou lambda en l'absence d'amylose		
Critères mineurs		
a - Plasmocytose médullaire comprise entre 10 et 30 %		
b - Pic monoclonal présent, mais de niveau inférieur à III		
c - Lésions osseuses lytiques		
d - Baisse des autres Ig : IgM < 0,5 g/L, IgA < 1 g/L, IgG < 6 g/L		
B		
Association d'au moins un critère majeur et d'un critère mineur		
I + b	II + b	III + a
I + c	II + c	III + c
I + d	II + d	III + d
(I+ a, non suffisant)		
Association de trois critères mineurs dont au moins a + b		
a + b + c	a + b + d	

II – Chaînes légères libres des Ig

1. Métabolisme des chaînes légères libres des Ig

Lors de la synthèse d'une Ig normale par un lymphocyte B, les CLL sont produites en excès

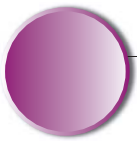
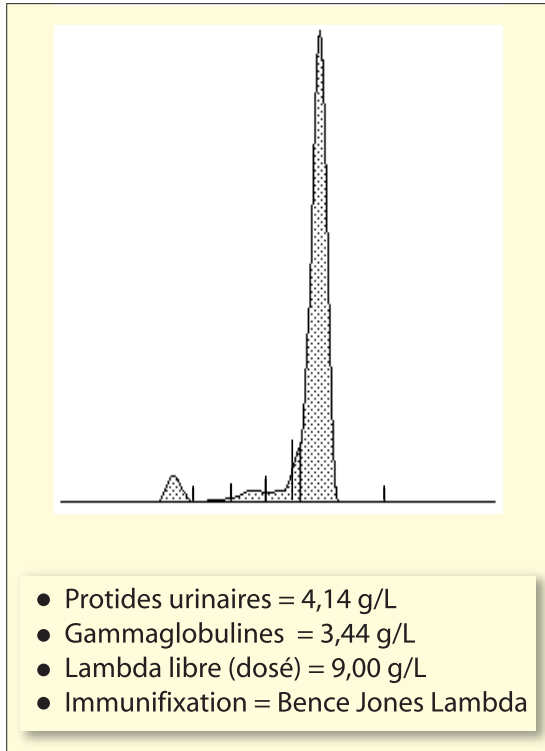


Figure 1

Quantification immuno-chimique des chaînes légères libres (CLL) dans les urines. Le dosage des protéines urinaires, quelque soit la technique, ne permet qu'une évaluation partielle des CLL. L'électrophorèse des protéines des urines de 24h présente l'inconvénient de la nécessité d'une concentration préalable, est peu sensible et peu spécifique (interférences avec autres protéines si tubulopathie).



(500 mg/jour) de l'ordre de 40% de plus par rapport à la chaîne lourde permettant ainsi une conformation correcte de l'Ig complète (1, 2). La proportion de kappa et lambda produites se situe dans un rapport de 2 pour 1. Le rein est responsable de l'élimination plasmatique des CLL par un mécanisme de filtration glomérulaire d'autant plus rapide que le poids moléculaire (PM) de la protéine est faible (PM kappa = 25 kDa, PM lambda = 50 kDa). Ceci explique les valeurs de la demi-vie plasmatique de kappa de 2 à 4 h et de lambda de 3 à 6 h. Les CLL sont ensuite réabsorbées et catabolisées au niveau du tubule proximal (3, 4). Elles se lient à la bordure en brosse des cellules via des récepteurs de faible affinité mais de haute capacité. Les complexes [CLL – récepteurs] sont alors endocytés et les CLL sont métabolisées dans les lysosomes. Les CLL kappa majoritairement sous forme monomérique sont filtrées par le glomérule 3 fois plus vite que les CLL lambda principalement sous forme dimérique. Ceci compense la sur-production de kappa par rapport à lambda de telle sorte que les concentrations sériques sont pour kappa libres de 3,3 à 19,4 mg/L et pour lambda libres de 5,7 à 26,3 mg/L. Les concentrations urinaires sont quant à elles fonction

de l'état rénal bien plus que de l'activité tumorale (figure 2).

Lors d'infection chronique ou de maladie auto-immune, la moelle osseuse peut contenir 5 à 10% de plasmocytes sécrétant d'Ig à l'origine d'hypergammaglobulinémie polyclonale. Dans ce contexte, les concentrations sériques des CLL peuvent être élevées avec un rapport kappa/lambda normal.

Lors de MM avec production excessive de CLL, le taux sérique de CLL mc augmente. Tant que les capacités de réabsorption tubulaire ne sont pas dépassées, son excrétion urinaire reste inchangée ou augmente peu. En absence d'atteinte rénale, les concentrations sériques en CLL correspondent à la production de CLL par les lymphocytes B c'est-à-dire à l'activité tumorale. Cependant, dès lors que la synthèse de CLL excède 10 à 30 g/j, les capacités de réabsorption tubulaire sont dépassées et le taux urinaire de CLL s'accroît rapidement. Les CLL peuvent précipiter dans les tubules distaux entraînant peu à peu la mort des néphrons à l'origine d'une diminution de la filtration glomérulaire totale elle-même responsable d'une élévation de la demi-vie plasmatique des CLL. Ainsi, le taux sérique en CLL reflète non seulement l'activité tumorale mais aussi le défaut d'élimination rénale des CLL (5).

2. Dosage des chaînes légères libres

L'évaluation de la concentration de CLL par néphélométrie ou turbidimétrie nécessite l'ajout d'anticorps monospécifiques « coatés » sur des billes de latex. Les résultats obtenus par immunonéphélométrie et immunoturbidimétrie sont

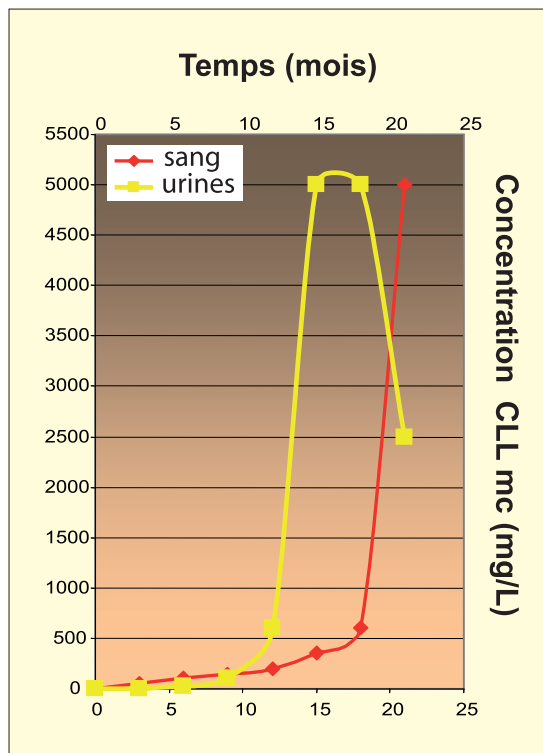


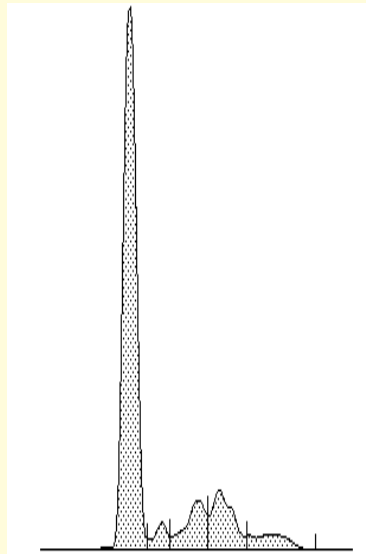
Figure 2

Exemple d'évolution des taux sériques et urinaires d'une chaîne légère libre monoclonale (CLL mc) en fonction de l'activité tumorale et de l'insuffisance rénale. Tant que les capacités de réabsorption tubulaire ne sont pas dépassées, le taux urinaire de CLL est normal : seul le taux sérique reflète l'activité tumorale. Dès lors qu'il y a une tubulopathie, le taux urinaire s'accroît très rapidement et celui sérique reste parallèle à l'activité tumorale. Lorsque la filtration glomérulaire est atteinte, alors le taux urinaire décroît rapidement et celui sérique reflète l'activité tumorale et l'altération de la fonction rénale.

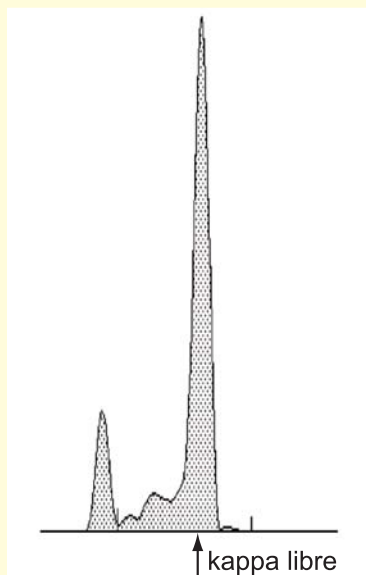
Intérêt du dosage des chaînes légères libres des immunoglobulines

Figure 3

Exemple de tracés électrophorétiques sérique et urinaire chez un patient atteint d'un myélome multiple à chaîne légère libre (CLL). Ce patient a été suivi par électrophorèse des protéines sériques et dosage des CLL sériques, l'électrophorèse des protéines urinaires apportant quant à elle des renseignements sur l'état de la fonction rénale.



- Protides sériques = 63 g/L
- Hypogammaglobulinémie = 3,7 g/L
- Dosage des CLL :
 - kappa = 844 mg/L
 - lambda = 12 mg/L
 - ratio kappa/lambda = 70
- Immunofixation : kappa libre



- Protides urinaires = 1,07 g/L
- Immunofixation : kappa libre

comparables. Tout prélèvement très hémolysé, ou très hyperlipémique, ou contenant des immuns complexes doit être proscrit. Dans le cas de MM à taux très élevés en CLL, des résultats inattendus peuvent apparaître. Il est alors conseillé de tester à nouveau l'échantillon à une dilution plus importante afin de s'affranchir de l'excès d'antigène. Les limites dans l'interprétation des résultats résident surtout dans l'élévation concomitante des

deux CLL. Il s'agit soit d'élévation polyclonale soit de gammopathie biclonale : la confrontation des résultats de l'électrophorèse, des dosages pondéraux des Ig, des CLL et de l'immunofixation avec le tableau clinique permet de conclure.

3. Intérêt clinique du dosage des chaînes légères libres

L'intérêt clinique du dosage des CLL est triple : diagnostic, pronostic et surveillance.

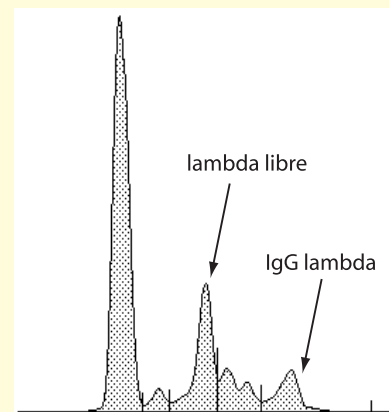
3.1- Maladies à chaînes légères libres

Les applications majeures du dosage des CLL sont les maladies à CLL : MM à CLL, amylose primitive de type AL (AL pour amyloïde light chain) maladie de dépôt des CLL.

La caractéristique biologique majeure du MM à CLL est l'hypogammaglobulinémie mise en évidence à l'électrophorèse (figure 3), associée à une atteinte rénale chez près de 65% de patients, laissant supposer une évolution de la maladie depuis un certain temps. Dans certains cas, on peut noter une élévation des alpha2 (figure 4) ou bêta1 ou bêta2-globulines voire un pic mc en position gammaglobulinique. La mise en évidence d'une CLL mc dans le sérum peut s'effectuer par dosage pondéral des CLL et par immunofixation. La comparaison de la sensibilité de ces deux techniques

Figure 4

Elévation des alpha-2 globulines en relation avec la présence d'une chaîne légère libre monoclonale de type lambda.



- Protides totaux = 59 g/L
- Alpha2globulines = 14,2 g/L
- Gamma = 4,8 g/L
- Pic monoclonal en γ = 3,3 g/L
- IgA = 0,23 g/L ● Kappa libre = 3,02 mg/L
- IgG = 5,31 g/L ● Lambda libre = 17900 mg/L
- IgM = 0,17 g/L ● Ratio kappa/lambda = 0
- IF = IgG lambda + CLL lambda

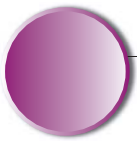
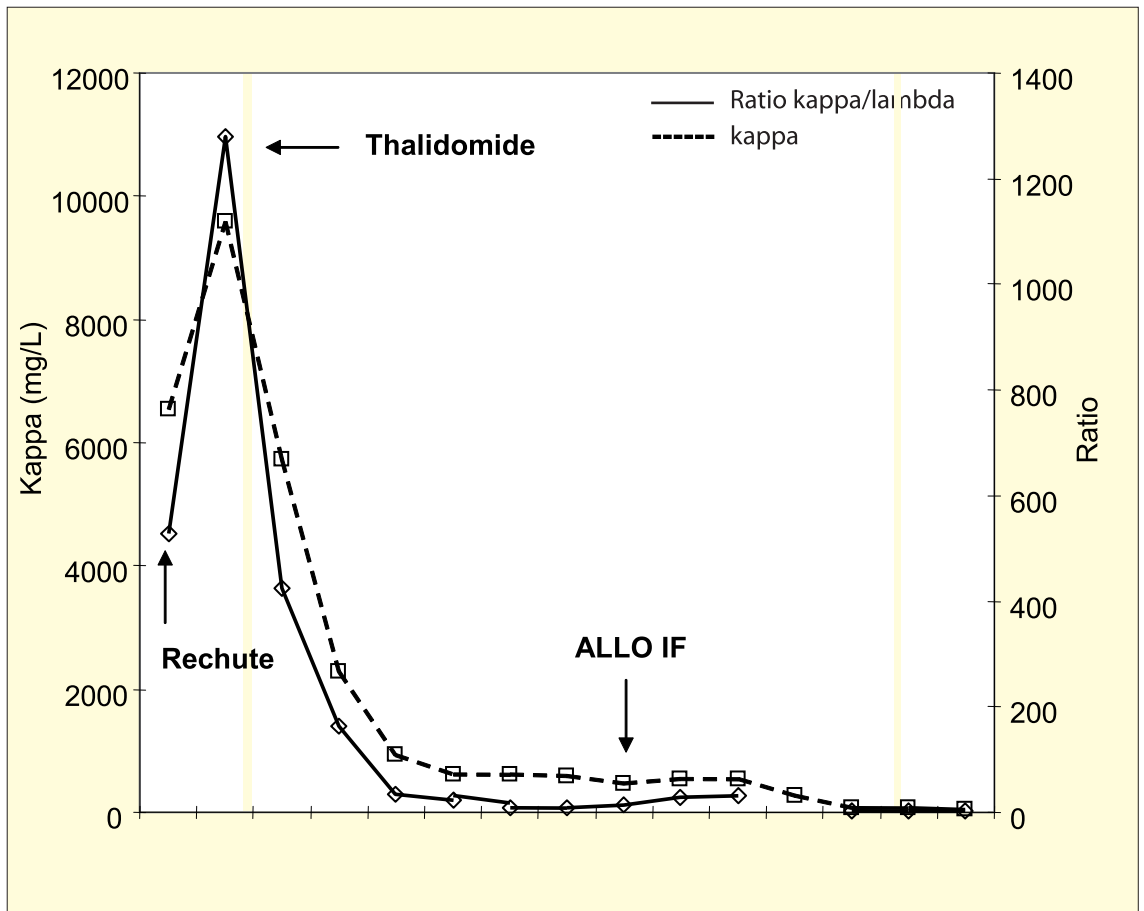


Figure 5

Evolution du taux sérique de kappa libre et du ratio kappa/lambda chez un patient atteint de myélome multiple à kappa libre. (selon communication orale du Dr K. Bouabdallah, SNBH, Pau 2004)



montre qu'elle est meilleure dans le premier cas (6, 7). En effet, une étude portant sur 224 patients (8), diagnostiqués comme ayant un MM à CLL, a démontré que 100% d'entre eux sont détectés par des résultats anormaux du dosage des CLL dans le sérum comparé à 88% pour les MM à kappa libre et 68% pour ceux à lambda libre par immunofixation. En plus de l'intérêt du dosage des CLL dans l'établissement du diagnostic de MM à CLL, ce dosage présente l'avantage de pouvoir faire un suivi plus aisé de ces patients avec une concordance clinico-biologique significative (figure 5).

De même, dans une étude portant sur 262 patients AL (9), 91% d'entre eux sont détectés par le dosage des CLL contre 69% par l'immunofixation. D'autres études ont confirmé ces résultats (10) de telle sorte qu'un consensus international existe quant au diagnostic et suivi des amyloses AL incluant le dosage des CLL (11).

3.2 – Myélomes non sécrétants

Ils représentent 1 à 3% des MM détectés par mise en évidence immunohistochimique de la protéine mc au niveau de biopsies de moelle osseuse. Parce que la quantité de CLL sécrétée est très faible (problèmes de dégradation intracellulaire ou problèmes de structure), la détection est pratiquement impossible par immunofixation sérique et/ou urinaire. Il semblerait que 85% de patients ayant cette pathologie puissent être mis en évidence par le dosage des CLL (12). Deux hypothèses ont été avancées :

- polymères de différents PM à l'origine de mise en évidence de plages diffuses en immunofixation,
- présence de polymorphismes génétiques portant sur les CLL qui entraîneraient des comportements différents en immunofixation.

3.3 – Myélome multiple à Ig complète et gammopathie mc de signification indéterminée

Approximativement 90% des patients ayant un MM et 30% ayant une gammopathie mc de signification indéterminée (MGUS pour monoclonal gammopathy of undetermined significance), à Ig complète, présentent une anomalie du ratio kappa / lambda (13). Si ces patients peuvent être suivis par l'électrophorèse des protéines sériques de façon aisée, le dosage des CLL semble être intéressant dans deux cas :

a) pour le suivi des MM traités

La demi-vie des CLL étant très courte de 2 à 6 h, la réponse sérique des CLL au traitement est très rapide. Toutefois, l'intérêt exact de ce dosage dans ce cadre mérite d'autres études de suivi bioclinique.

b) pour l'évaluation du pronostic des MGUS

Trois pour cent de la population âgée de plus de 70 ans présentent une anomalie mc sans mise en évidence de MM ou de macroglobulinémie de Waldenström. La MGUS est définie selon les critères suivants :

- plasmocytose médullaire < 10%;
- composant monoclonal sérique et/ou urinaire bas (IgG < 30g/L, IgA < 20g/L, CLL < 1 g/24h);

Intérêt du dosage des chaînes légères libres des immunoglobulines

- normalité des taux de calcium, créatinine, hémoglobine;
- absence de lésions osseuses, d'amylose et de maladie de dépôt de CLL.

Parmi les patients atteints de MGUS, 1% d'entre eux par an évolue vers une pathologie de la lignée B (14). Le risque de progression vers une entité maligne de patients avec un ratio kappa / lambda anormal est significativement plus élevé comparé au groupe de patients avec un ratio normal, indépendamment du taux et de l'isotype de l'Ig mc (15). Le ratio kappa / lambda pourrait donc être un marqueur fiable de l'évolution des MGUS. Ainsi, depuis peu sont pris en compte des facteurs de risque d'évolution de la MGUS vers un MM (15, 16) : un ratio kappa / lambda anormal, une MGUS non IgG et un taux d'Ig mc sérique ≥ 15 g/L. Les patients ayant 0, 1, 2 ou 3 de ces critères ont un risque de progression équivalent à 5, 21, 37 ou 58% respectivement. Les patients ayant une MGUS nécessitent un suivi par électrophorèse des protéines sériques au bout de 6 mois puis annuellement si stable. Ceux qui présentent un faible risque d'évolution peuvent être suivis moins souvent. Pour ceux qui sont à haut risque ou qui présentent de façon inexplicable une

anémie ou une altération de la fonction rénale ou une hypercalcémie ou des lésions osseuses, un myélogramme est nécessaire.

III - Conclusion

Une recherche de gammopathie mc devrait être effectuée chez tout patient présentant de façon inexplicable une fatigue, anémie, hypercalcémie, altération de la fonction rénale, augmentation de la vitesse de sédimentation, hypogammaglobulinémie, des douleurs osseuses, lésions ou fractures osseuses. Il en va de même dans les cas de neuropathie périphérique, syndrome du canal carpien, syndrome néphrotique, insuffisance cardiaque non contrôlée, malabsorption. Cette recherche s'effectue par l'électrophorèse des protéines sériques associée à l'immunofixation, les dosages pondéraux des IgA, IgG, IgM et des CLL ainsi que le myélogramme. Pour le suivi des MM, hormis la recherche bioclinique des complications, l'électrophorèse des protéines sériques reste la méthode de référence pour la quantification de l'Ig mc chez des patients ayant un MM à Ig complète ou une MGUS. Elle doit être complétée par le dosage des CLL qui représente un outil indispensable pour le suivi des MM à CLL ainsi que pour évaluer le pronostic des MGUS (15).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) SOLOMON A., Light chains of human immunoglobulins. *Methods Enzymol.*, 1985, 116, 101-121.
- (2) SOLOMON A., Bence-Jones proteins and light chains of immunoglobulins. *N. Engl. J. Med.*, 1976, 294,17-23.
- (3) GORDON J. *et al.*, Free light chain synthesis by neoplastic cells in chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Immunology*, 1978, 34, 397-404.
- (4) WALLER K.V. *et al.*, Current concepts in proteinuria. *Clin. Chem.*, 1989, 35, 755-765.
- (5) NOWROUSIAN M.R. *et al.*, Serum free light chain analysis and urine immunofixation electrophoresis in patients with multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11, 8706-8714.
- (6) KATZMANN J.A. *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.*, 2002, 48, 1437-1444.
- (7) BAKSHI N.A. *et al.*, Serum free light chain (FLC) measurement can aid capillary zone electrophoresis in detecting subtle FLC-producing M proteins. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2005, 124, 214-218.
- (8) BRADWELL A.R. *et al.*, Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet*, 2003, 361, 489-491.
- (9) LACHMANN H.J. *et al.*, Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *Br. J. Haematol.*, 2003, 122, 78-84.
- (10) ABRAHAM R.S. *et al.*, Quantitative analysis of serum free light chains. A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2003, 119, 274-278.
- (11) UK Myeloma Forum AL amyloidosis Guidelines Working Group. *Br. J. Haematol.*, 2004, 125, 681-700.
- (12) DRAYSON M. *et al.*, Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood*, 2001, 97, 2900-2902.
- (13) MEAD G.P. *et al.*, Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 2004, 126, 348-354.
- (14) KYLE R.A. *et al.*, A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.*, 2002, 346, 564-569.
- (15) KYLE R.A. *et al.*, Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br. J. Haematol.*, 2006, 134, 573-589.
- (16) RAJKUMAR S.V. *et al.*, Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 2005, 106, 812-817.