

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

2015

THESE n°102

T H E S E

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 29 octobre 2015

par

Mme CORDONNIER Anne

Née le 8 avril 1989

A Toulouse

**ÉTUDE COMPARATIVE DE DEUX TECHNIQUES ET DE DEUX METHODES DE
DOSAGE DES CHAINES LEGERES LIBRES DES IMMUNOGLOBULINES**

JURY

Mr BIENVENU Jacques, Professeur

Mr COHEN Richard, Professeur

Mme CHAPUIS-CELLIER Colette, Docteur

Mme KOLOPP-SARDA Marie-Nathalie, Docteur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- | | |
|--|-----------------------|
| • Président de l'Université | M.François-Noël GILLY |
| • Vice-Président du Conseil d'Administration | M. Hamda BEN HADID |
| • Vice-Président de la Commission Recherche CAC | M. Germain GILLET |
| • Vice-Président de la Commission Formation et Vie Universitaire CAC | M. Philippe LALLE |

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : M. Jérôme ETIENNE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directrice : Mme Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directeur : M. Denis BOURGEOIS
Institut des Techniques de Réadaptation	Directeur : M. Yves MATILLON
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directrice : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)	Directeur : M. Pascal FOURNIER
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr - HDR)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU)
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE - COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDİ-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Richard COHEN (PU - PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU - PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU - PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAoui MOUMJID (MCU - HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
Madame Carole SIANI (MCU - HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU - PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU - PH)

Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE - MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)

Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)

Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

- **MATHEMATIQUES - STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)

Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)

Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)

Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)

Madame Christelle MARMINON (MCU)

Madame Sylvie RADIX (MCU - HDR)

Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Roland BARRET (Pr)

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)

Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)

Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)

Madame Isabelle KERZAON (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)

Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)

Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)

Madame Catherine RIOUFOL (MCU- PH-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Jacques BIENVENU (PU - PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU - PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)

Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr - HDR)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Madame Florence RANCHON

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Charlotte BOUARD (86ème section)
Madame Laure-Estelle CASSAGNES (85ème section)
Monsieur Karim MILADI (85ème section)
Madame Laurence PAGES (87ème section)

Pr : Professeur

PU - PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU - PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Remerciements

Je souhaite exprimer mes remerciements :

A Mr BIENVENU, président du jury,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse.

A Mme CHAPUIS-CELLIER, ma directrice de thèse,

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail et d'avoir été disponible et de bons conseils pendant sa rédaction. Je vous remercie également pour l'accueil que vous m'avez réservé dans le cadre de mon stage hospitalo-universitaire.

A Mr COHEN,

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de l'aide et des conseils que vous m'avez apporté pour ce travail.

A Mme KOLOPP-SARDA,

Merci pour l'accueil que vous m'avez réservé dans le cadre de mon stage hospitalo-universitaire et du temps que vous avez pris pour m'aider lors des manipulations et du travail sur l'automate SPA plus[®]. Je vous remercie également d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Mes remerciements vont également :

A toutes les personnes que j'ai rencontrées lors de mon stage au centre de biologie Sud, en particulier Mme LOMBARD, et qui m'ont apporté des informations utiles pour l'avancement et la réalisation de cette thèse.

A mes parents,

Merci pour votre soutien et votre présence tout au long de mes études de pharmacie. C'est grâce à vous que je peux être ici aujourd'hui. Vos encouragements et votre amour m'ont permis d'avancer dans la vie, je vous en suis très reconnaissante.

A ma sœur Delphine, son mari François et mon frère Jean-Baptiste, sans oublié ma nièce Elise,

Merci pour tous ces moments partagés, les joies comme les moments plus difficiles. Je vous remercie pour votre soutien pendant mes études et lors de la rédaction de cette thèse.

A mes grand-mères,

Merci pour votre gentillesse et votre attention au cours de la rédaction de ce travail et pour ces bons moments passés en famille.

A Lauraine et Stéphanie,

Merci pour cette grande amitié au cours de toutes ces années !

A mes amis de pharmacie : Adeline, Célia, Charlotte, Ingrid, Manon, Marie-Ange, Yolaine.

Merci pour tous ces bons moments que nous avons partagés, en espérant qu'il y en aura beaucoup d'autres, où que nous soyons les uns les autres.

Liste des figures

Figure 1 : Lyon médical du 20 janvier 1901 relatant les travaux de L. Hugounenq – première page du compte rendu	20
Figure 2 : Immunoglobuline entière (Goldsby et al 2000)	22
Figure 3 : réarrangement VJ des gènes des chaînes légères des immunoglobulines	23
Figure 4 : Représentation schématique d'un néphron illustrant le catabolisme des CCL avec leur filtration et excrétion urinaire	26
Figure 5 : Electrophorèse des protéines sériques réalisée par électrophorèse capillaire sur Capillarys 2® (Sébia).....	27
Figure 6 : Immunoglobuline entière et chaînes légères libres κ et λ	30
Figure 7 : Diffusion Rayleigh, Rayleigh-Debye et Mie	45
Figure 8 : Courbe de Heidelberger-Kendall.....	46
Figure 9 : Répartition des âges au sein de la population avec ou sans GM (population 1) et rassemblée pour comparer deux techniques de dosages des CLL	52
Figure 10 : Répartition des pathologies observées dans la population B composée de patients avec gammapathie monoclonale et rassemblés pour comparer deux techniques de dosages des CLL	53
Figure 11 : Répartition des âges au sein de la population 2 composée de patients suivis pour un myélome multiple et rassemblés pour comparer deux techniques de dosages des CLL.....	54
Figure 12 : Récapitulatif des populations étudiées	55
Figure 13 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $K_{T\text{ Siemens}}$ à $K_{T\text{ TBS}}$	56
Figure 14 : Analyse de concordance entre $K_{T\text{ Siemens}}$ et $K_{T\text{ TBS}}$ par la méthode de Bland-Altman	57
Figure 15 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{T\text{ Siemens}}$ à $\lambda_{T\text{ TBS}}$	58
Figure 16 : Analyse de concordance entre $\lambda_{T\text{ Siemens}}$ et $\lambda_{T\text{ TBS}}$ par la méthode de Bland-Altman	59
Figure 17 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer K_{Siemens} à K_{TBS}	61
Figure 18 : Analyse de concordance entre K_{Siemens} et K_{TBS} par la méthode de Bland-Altman	62
Figure 19 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer λ_{Siemens} à λ_{TBS}	63
Figure 20 : Analyse de Bland-Altman pour $\log \lambda_{\text{Siemens}}$ et $\log \lambda_{\text{TBS}}$	64
Figure 21 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $R_{\kappa/\lambda\text{ Siemens}}$ à $R_{\kappa/\lambda\text{ TBS}}$	65
Figure 22 : Analyse de Bland-Altman pour $\log R_{\kappa/\lambda\text{ Siemens}}$ et $\log R_{\kappa/\lambda\text{ TBS}}$	66
Figure 23 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer K_{Siemens} à K_{TBS}	68

Figure 24 : Analyse de concordance entre K_{Siemens} et K_{TBS} par la méthode de Bland-Altman	69
Figure 25 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer λ_{Siemens} à λ_{TBS}	70
Figure 26 : Analyse de concordance entre λ_{Siemens} et λ_{TBS} par la méthode de Bland-Altman.....	71
Figure 27 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $K_{\text{i Siemens}}$ et $K_{\text{i TBS}}$	73
Figure 28 : Analyse de concordance entre $K_{\text{i Siemens}}$ et $K_{\text{i TBS}}$ par la méthode de Bland-Altman	74
Figure 29 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{\text{ni Siemens}}$ à $\lambda_{\text{ni TBS}}$	75
Figure 30 : Analyse de concordance entre $\lambda_{\text{ni Siemens}}$ et $\lambda_{\text{ni TBS}}$ par la méthode de Bland-Altman	76
Figure 31 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour la comparaison entre $R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni Siemens}}}$ et $R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni TBS}}}$	77
Figure 32 : Analyse de concordance entre $R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni Siemens}}}$ et $R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni TBS}}}$ par la méthode de Bland-Altman	78
Figure 33 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{\text{i Siemens}}$ à $\lambda_{\text{i TBS}}$	80
Figure 34 : Analyse de concordance entre $\lambda_{\text{i Siemens}}$ et $\lambda_{\text{i TBS}}$ par la méthode de Bland-Altman	81
Figure 35 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour la comparaison de $K_{\text{ni Siemens}}$ et $K_{\text{ni TBS}}$	82
Figure 36 : Analyse de concordance entre $K_{\text{ni Siemens}}$ et $K_{\text{ni TBS}}$ par la méthode de Bland-Altman	83
Figure 37 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $R_{\text{kni}/\lambda_{\text{i Siemens}}}$ à $R_{\text{kni}/\lambda_{\text{i TBS}}}$	84
Figure 38 : Analyse de concordance entre $R_{\text{kni}/\lambda_{\text{i TBS}}}$ et $R_{\text{kni}/\lambda_{\text{i Siemens}}}$ par la méthode de Bland-Altman	85
Figure 39 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour la comparaison entre $K_{\text{turb(SPA)}}$ et $K_{\text{neph(BN)}}$	89
Figure 40 : Analyse de concordance entre $K_{\text{turb(SPA)}}$ et $K_{\text{neph(BN)}}$ par la méthode de Bland-Altman	90
Figure 41 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{\text{turb(SPA)}}$ à $\lambda_{\text{neph(BN)}}$	91
Figure 42 : Analyse de concordance entre $\lambda_{\text{turb(SPA)}}$ et $\lambda_{\text{neph(BN)}}$ par la méthode de Bland-Altman	92
Figure 43 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $K_{\text{i turb(SPA)}}$ à $K_{\text{i neph(BN)}}$	94
Figure 44 : Analyse de concordance entre $K_{\text{i turb(SPA)}}$ et $K_{\text{i neph(BN)}}$ par la méthode de Bland-Altman	95
Figure 45 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{\text{ni turb(SPA)}}$ à $\lambda_{\text{ni neph(BN)}}$	96

Figure 46 : Analyse de concordance entre $\lambda_{ni\ turb(SPA)}$ et $\lambda_{ni\ neph(BN)}$ par la méthode de Bland-Altman	97
Figure 47 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $R_{ki/\lambda_{ni\ turb(SPA)}}$ à $R_{ki/\lambda_{ni\ neph(BN)}}$	98
Figure 48 : Analyse de concordance entre $R_{ki/\lambda_{ni\ turb(SPA)}}$ et $R_{ki/\lambda_{ni\ neph(BN)}}$ par la méthode de Bland-Altman	99
Figure 49 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{i\ turb(SPA)}$ et $\lambda_{i\ neph(BN)}$	101
Figure 50 : Analyse de concordance entre $\lambda_{i\ turb(SPA)}$ et $\lambda_{i\ neph(BN)}$ par la méthode de Bland-Altman	102
Figure 51 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $K_{ni\ turb(SPA)}$ et $K_{ni\ neph(BN)}$	103
Figure 52 : Analyse de concordance entre $K_{ni\ turb(SPA)}$ et $K_{ni\ neph(BN)}$ par la méthode de Bland-Altman	104
Figure 53 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $R_{kni/\lambda_{i\ turb(SPA)}}$ à $R_{kni/\lambda_{i\ neph(BN)}}$	105
Figure 54 : Analyse de concordance entre $R_{kni/\lambda_{i\ turb(SPA)}}$ et $R_{kni/\lambda_{i\ neph(BN)}}$ par la méthode de Bland-Altman	106

Liste des tableaux

Tableau 1 : Intervalle des valeurs usuelles des CLL_k et λ et du rapport $R_{k/\lambda}$ en fonction des réactifs utilisés	49
Tableau 2 : Tableau de concordance entre les concentrations $K_{T\text{ Siemens}}$ et $K_{T\text{ TBS}}$	57
Tableau 3 : Tableau de concordance entre les concentrations $\lambda_{T\text{ Siemens}}$ et $\lambda_{T\text{ TBS}}$	60
Tableau 4 : Récapitulatif des résultats de la population 1	60
Tableau 5 : Tableau de concordance entre les concentrations K_{Siemens} et K_{TBS} ...	63
Tableau 6 : Tableau de concordance entre les concentrations λ_{siemens} et λ_{TBS}	65
Tableau 7 : Concordance observée entre les valeurs des rapports $R_{k/\lambda\text{ siemens}}$ et $R_{k/\lambda\text{ TBS}}$	66
Tableau 8 : Récapitulatif des résultats de l'analyse comparative des concentrations obtenues en CLL en fonction de la nature des anticorps, au sein d'une population sans gammapathie monoclonale (population A, avec N=35)	67
Tableau 9 : Concordance entre les concentrations K_{siemens} et K_{TBS}	70
Tableau 10 : Concordance entre les concentrations λ_{siemens} et λ_{TBS}	72
Tableau 11 : Récapitulatif des résultats de la population B	72
Tableau 12 : Tableau de concordance entre les concentrations $K_{i\text{ siemens}}$ et $K_{i\text{ TBS}}$	75
Tableau 13 : Tableau de concordance entre les concentrations $\lambda_{ni\text{ siemens}}$ et $\lambda_{ni\text{ TBS}}$	77
Tableau 14 : Tableau de concordance des rapports $R_{ki/\lambda_{ni}\text{ Siemens}}$ et $R_{ki/\lambda_{ni}\text{ TBS}}$	79
Tableau 15 : Récapitulatif des résultats de la population B1 avec GM	79
Tableau 16 : Tableau de concordance entre les concentrations $\lambda_{i\text{ siemens}}$ et $\lambda_{i\text{ TBS}}$	81
Tableau 17 : Tableau de concordance entre les concentrations $K_{ni\text{ siemens}}$ et $K_{ni\text{ TBS}}$	84
Tableau 18 : Tableau de concordance des rapports $R_{kni/\lambda_i\text{ Siemens}}$ et $R_{kni/\lambda_i\text{ TBS}}$	86
Tableau 19 : Récapitulatif des résultats de la population B2	86
Tableau 20 : Concordance entre les concentrations $K_{\text{turb(SPA)}}$ et $K_{\text{neph(BN)}}$	91
Tableau 21 : Concordance entre les concentrations $\lambda_{\text{turb(SPA)}}$ et $\lambda_{\text{neph(BN)}}$	93
Tableau 22 : Récapitulatif des résultats de la population 2	93
Tableau 23 : Tableau de concordance entre les concentrations $K_{i\text{ turb(SPA)}}$ et $K_{i\text{ neph(BN)}}$	95
Tableau 24 : Tableau de concordance entre les concentrations $\lambda_{ni\text{ turb(SPA)}}$ et $\lambda_{ni\text{ neph(BN)}}$	97
Tableau 25 : Tableau de concordance des rapports $R_{ki/\lambda_{ni}\text{ turb(SPA)}}$ et $R_{ki/\lambda_{ni}\text{ neph(BN)}}$	99
Tableau 26 : Récapitulatif des résultats de la population C1 (κ_i)	100
Tableau 27 : Tableau de concordance entre les concentrations $\lambda_{i\text{ turb(SPA)}}$ et $\lambda_{i\text{ neph(BN)}}$	102
Tableau 28 : Tableau de concordance entre les concentrations $K_{ni\text{ turb(SPA)}}$ et $\lambda_{ni\text{ neph(BN)}}$	104
Tableau 29 : Tableau de concordance des rapports $R_{ki/\lambda_{ni}\text{ turb(SPA)}}$ et $R_{ki/\lambda_{ni}\text{ neph(BN)}}$	106
Tableau 30 : Récapitulatif des résultats de la population C2 (λ_i)	107

Liste des abréviations

AAL : amylose AL
Ac : Anticorps
ADN : acide désoxyribonucléique
Ag : Antigène
ARN : acide ribonucléique
CDR : complementarity determining régions
CL : chaîne légère
CLL : chaîne légère libre
CLLi : chaîne légère libre impliquée
CLLM : chaîne légère libre monoclonale
CLLni : chaîne légère libre non impliquée
CLLU : chaîne légère libre urinaire
CRAB : hyperCalcémie, insuffisance Rénale, Anémie, Bone (lésion osseuse)
DO : densité optique
EP : électrophorèse des protéines
EPS : électrophorèse des protéines sériques
EPU : électrophorèse des protéines urinaires
FLC : free light chains : chaînes légères libres
GM : gammopathies monoclonales
GMSI : gammopathies monoclonales de signification indéterminée
GMSR : gammopathies monoclonales de signification rénale
HAS : haute autorité de santé
HCD : heavy chain disease : maladie des chaînes lourdes
HCDD : heavy chain deposition disease : maladie de dépôts des chaînes lourdes
IC : intervalle de confiance
IDD : Immunoglobuline deposits disease : maladie de dépôts des Ig
IEP : immunoélectrophorèse
IFE : électrophorèse immunofixation
Ig : Immunoglobuline
LA : limite d'agrément
LCDD : light chain deposition disease : maladie de dépôts des CLL

LHCDD : light and heavy chain deposition disease : maladie de dépôts des chaînes légères et lourdes
LLC : leucémie lymphoïde chronique
LMNH : lymphomes malins non hodgkiniens
LP : leucémie plasmocytaire
MI : myélome indolent
MM : Myélome multiple
MMCL : myélomes multiples à chaînes légères
MNS : myélome non sécrétant
MW : Maladie de Waldenström
NABM : nomenclature des actes de biologie médicale
PBJ : protéine de Bence Jones
RCV : reference change value
SAA : sérum amyloïde A
SMM : smoldering multiple myeloma
TBS : The Binding Site
VS : Versus (sauf une fois VS : vitesse de sédimentation)

Table des matières

INTRODUCTION	17
PARTIE I PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
1. Les chaînes légères libres	20
1.1. Historique.....	20
1.2. Biosynthèse et structure des chaînes légères (6)	21
1.3. Métabolisme	25
1.4. Méthodes conventionnelles d'étude des chaînes légères libres	27
1.4.1. Electrophorèse standard des protéines sériques	27
1.4.2. Electrophorèse-immunofixation sérique.....	28
1.4.3. Exploration des protéines urinaires	29
1.5. Dosage des CLL par anticorps polyclonaux.....	30
1.5.1. Généralités	30
1.5.2. Intervalles de référence	31
1.5.3. Limitations analytiques	31
1.5.4. Variations de lots à lots.....	32
1.5.5. Interprétation des résultats.....	32
1.6. Dosage des CLL par anticorps monoclonaux	33
2. Intérêt du dosage des chaînes légères libres dans les gammopathies monoclonales	33
2.1. Le myélome multiple	34
2.2. Amylose AL.....	38
2.3. Maladie de dépôt des CLL	39
2.4. Gammopathies monoclonales de signification indéterminée	39
3. Intérêt du dosage des chaînes légères libres dans les maladies avec une élévation polyclonale des CLL.....	40
4. Nomenclature du dosage des CLL	41
PARTIE II ETUDE EXPERIMENTALE.....	43
1. Matériels et méthode.....	44
1.1. Echantillons	44
1.2. Analyseurs	44
1.3. Les réactifs	47
1.4. Méthode	49
2. Résultats et discussion	52

2.1. Les échantillons	52
2.2. Comparaison entre les concentrations de CLL obtenues avec les anticorps monoclonaux N latex FLC [®] (Siemens) et les anticorps polyclonaux Freelite [®] (TBS) sur le néphélomètre BN ProSpec [®] (Siemens).....	56
2.2.1. Etude de la population 1	56
2.2.2. Etude de la population A sans GM	61
2.2.3. Etude de la population B avec GM	68
2.2.4. Etude de la population B1 (κ_i).....	73
2.2.5. Etude de la population B2 (λ_i).....	80
2.2.6. Discussion.....	87
2.3. Comparaison entre les résultats obtenus par turbidimétrie (SPAplus [®]) et néphélométrie (BN ProSpec [®]) avec les anticorps polyclonaux Freelite [®] (TBS).....	89
2.3.1. Etude de la population 2.....	89
2.3.2. Etude de la population C1 (κ_i).....	94
2.3.3. Etude de la population C2 (λ_i)	100
2.3.4. Discussion concernant les résultats précédents	107
2.4. Comparaison de l'évolution dans le temps des concentrations des CLLi en fonction de la nature des réactifs (anticorps monoclonaux vs anticorps polyclonaux) et de la méthode de mesure : turbidimétrie (SPAplus [®]) vs néphélométrie (BN ProSpec [®])	109
2.4.1. Comparaison de l'évolution au cours du temps des concentrations en CLLi en fonction de la nature des réactifs : anticorps monoclonaux (Siemens) vs anticorps polyclonaux (TBS)	109
2.4.2. Comparaison de l'évolution au cours du temps des concentrations en CLLi selon la méthode de dosage : turbidimétrie (SPAplus [®]) vs néphélométrie (BN ProSpec [®]).....	112
CONCLUSION	114
ANNEXES 1 Mesures des concentrations des CLL κ et λ avec les réactifs d'anticorps monoclonaux N latex FLC [®] de Siemens et les réactifs Freelite [®] de TBS, avec le BN Prospec [®]	117
ANNEXES 2 Mesures des concentrations des CLL κ et λ avec le turbidimètre SPA plus [®] et le néphélomètre BN Prospec [®] , avec les réactifs Freelite [®] de TBS	122
ANNEXES 3 Comparaison de l'évolution en fonction du temps des concentrations en CLL mesurées par les anticorps monoclonaux (Siemens) vs les anticorps polyclonaux (TBS)	124
ANNEXES 4 Comparaison de l'évolution en fonction du temps des concentrations en CLL mesurées par la turbidimétrie (SPAplus [®]) vs néphélométrie (BN Prospec [®]).....	146
BIBLIOGRAPHIE	155

INTRODUCTION

C'est à partir de 2001 que la quantification des chaînes légères libres (CLL) a été rendue possible grâce à la mise sur le marché, par The Binding Site (TBS), de réactifs sensibles et spécifiques, adaptés à la complexité de leur structure. La méthode repose sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux, dirigés spécifiquement contre les chaînes légères libres, et a été adaptée sur plusieurs analyseurs, dont le principe de fonctionnement fait aussi bien appel à la néphélométrie qu'à la turbidimétrie. En 2011, une nouvelle méthode de dosage des chaînes légères libres a été commercialisée par Siemens, avec des réactifs constitués par des anticorps monoclonaux.

Utilisateur depuis 2001 des réactifs TBS, le laboratoire d'immunologie du Centre Hospitalier Lyon Sud a été sollicité par Siemens, en 2011, pour tester leurs nouveaux réactifs sur une première série d'échantillons, dont les résultats ont été officiellement restitués en avril 2012 au fabricant et à quelques membres de la communauté des biologistes hospitaliers de France. Cette première étude, dont seule celle portant sur les CLL polyclonales sera exposée ici, a été suivie par une seconde série initiée par le laboratoire lui-même afin d'affiner et confirmer certains résultats, apparemment discordants. Sur certains échantillons de la seconde étude, le laboratoire ayant souhaité approfondir son expertise dans le domaine du dosage des CLL, la méthode turbidimétrique a été utilisée. Seront donc rapportés, dans ce travail relatif au dosage des chaînes légères libres, les résultats des comparaisons menées en néphélométrie avec des anticorps polyclonaux (TBS) versus des anticorps monoclonaux (Siemens), puis ceux obtenus avec des anticorps polyclonaux, mais avec deux méthodes analytiques différentes, l'une faisant appel à la néphélométrie et l'autre à la turbidimétrie.

Devant la commercialisation de nouveaux réactifs ou d'une nouvelle méthode de dosage pour un analyte donné, tout laboratoire est amené à se demander s'il est possible, souhaitable ou raisonnable de changer sa pratique. C'est la question à laquelle ce travail se propose de répondre.

Après une première partie consacrée aux chaînes légères libres et à l'intérêt de leur quantification dans les gammopathies monoclonales et dans certaines pathologies inflammatoires, seront rapportés, dans une deuxième partie, les

résultats obtenus dans l'étude expérimentale que nous avons effectuée et dont les grandes étapes ont été exposées ci-dessus.

PARTIE I

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les chaînes légères libres

1.1. Historique

C'est en 1845 que les docteurs MacIntyre et Watson observèrent, pour la première fois, une substance urinaire ayant la particularité de précipiter après chauffage entre 50 et 60°C, de se resolubiliser à 70°C puis de reprécipiter lors d'un refroidissement lent. Quelques années plus tard, Henry Bence Jones rapporta ses observations sur cette substance que les médecins précédents lui avaient demandé d'étudier (1). Cette substance, découverte chez un patient dont on sait de nos jours qu'il était atteint de myélome, fut d'abord appelée par les anglo-saxons « deutoxide d'albumine hydratée » et par les français « albumosurie de Bence Jones ». Par la suite, le 20 janvier 1901, le professeur Hugounenq, de la faculté de pharmacie de Lyon, exposa les résultats de son travail sur « l'albumosurie de Bence-Jones et les urines albumosiques ». Le compte rendu de cette conférence est publié dans le Lyon Médical (2) (figure 1).

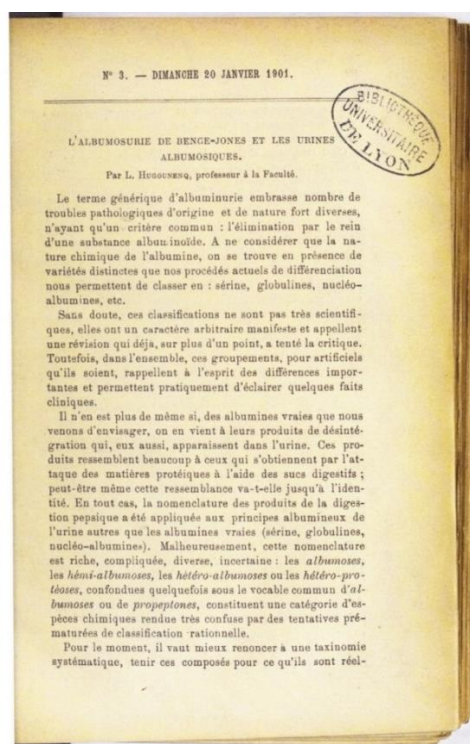


Figure 1 : Lyon médical du 20 janvier 1901 relatant les travaux de L. Hugounenq – première page du compte rendu

Repris et approfondis, ces premiers travaux français furent l'objet de la thèse de doctorat en pharmacie de Dechaume, soutenue en 1903 à la faculté de pharmacie

de Lyon (3). Ce dernier proposera une terminologie plus fonctionnelle d'albuminurie thermolytique. Actuellement connue sous le vocable de protéine de Bence Jones (PBJ), cette protéine représente le premier marqueur tumoral de l'histoire de la biologie humaine.

Grâce aux avancées technologiques des années 50-60 du siècle dernier (développement des techniques électrophorétiques, immunoélectrophorétiques et microscopiques), il a été possible d'établir la relation entre les PBJ et des protéines sériques observées chez les patients atteints de myélome (4) et de montrer que les PBJ étaient en réalité des CLL monoclonales et que toutes deux étaient issues d'une synthèse *de novo* et non de la dégradation des Ig entières (5). C'est en reconnaissance des travaux de l'équipe pionnière que les deux types de CL des Ig entières furent différenciés en κ pour Korngold et λ pour Lipari.

1.2. Biosynthèse et structure des chaînes légères (6)

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines en forme de Y, constituées de deux chaînes lourdes identiques (α , γ , μ , ϵ ou δ) et de deux chaînes légères également identiques (λ ou κ) (figure 2). Ces deux types de chaînes sont synthétisés par les plasmocytes puis se lient à l'intérieur de ces derniers pour former des immunoglobulines entières. Un plasmocyte synthétise une seule classe de chaîne lourde et un seul type de chaîne légère. Au sein d'une Ig entière, les chaînes lourdes sont reliées entre elles par des ponts disulfures S-S et les chaînes légères s'associent aux chaînes lourdes également par le biais de ponts disulfures.

Chaque chaîne est composée de domaines constants C (région COOH-terminale) et de domaines variables V (région NH₃-terminale). Le site de liaison de l'Ig à un antigène donné est formé par l'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères. Au sein de ce site se trouvent des zones hypervariables appelées CDR (complementarity determining regions) qui participent à la liaison à l'antigène.

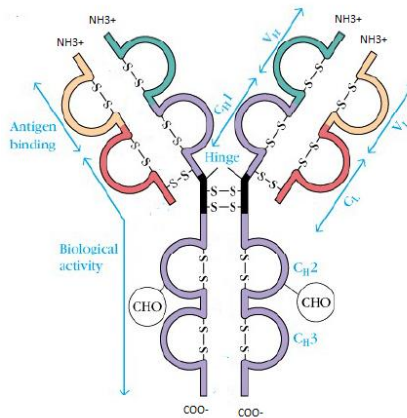


Figure 2 : Immunoglobuline entière (Goldsby et al 2000)

L'immunoglobuline représente un tétramère en forme de Y, composée de deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères identiques. Les ponts disulfures lient les chaînes entre elles et permettent la formation des domaines constants et variables. Les immunoglobulines entières présentent une activité biologique et une activité de liaison à l'antigène.

Les immunoglobulines peuvent être membranaires et, dans ce cas, se retrouvent fixées sur la membrane des lymphocytes B, ou excrétées par les plasmocytes ou d'autres cellules de la lignée B. Ceci est possible grâce à un épissage alternatif de l'ARN pré-messager de la chaîne lourde.

Par ailleurs, cette synthèse est régie par de nombreux gènes : les gènes des chaînes lourdes sont situés sur le locus IGH du chromosome 14, en 14q32.3 ; ceux des chaînes légères κ sont localisés sur le locus IGK du chromosome 2, en 2p11.2 et enfin ceux des chaînes légères λ sur le locus IGL du chromosome 22, en 22q11.2. Des réarrangements de ces gènes sont réalisés au cours des étapes de différenciation des lymphocytes B.

En ce qui concerne les chaînes légères, les locus IGK et IGL sont constitués de nombreux gènes : IGKV ou IGLV pour la région variable, IGKJ ou IGLJ pour la région de jonction et IGKC ou IGLC pour la région constante de la chaîne légère. IGKV comprend 76 gènes, dont une trentaine est fonctionnelle, IGKC est constitué d'un unique gène. Soixante-dix gènes composent la partie variable IGLV, dont une trentaine est fonctionnelle et 7 à 11 gènes constituent la partie constante IGLC, dont 4 sont fonctionnels.

Des réarrangements V-J des locus IGK et IGL sont nécessaires lors de la synthèse des chaînes légères pour assurer leur diversité. Survient, d'abord, un réarrangement de l'ADN qui permet de relier les séquences V et J et d'éliminer les séquences intermédiaires. Puis, il y a transcription de l'ARN pré-messager qui comporte des exons et des introns. Suit, ensuite, un épissage alternatif qui élimine les introns, pour aboutir à l'ARN messager mature. Enfin, la traduction de cet ARN permet l'obtention de la chaîne légère (figure 3).

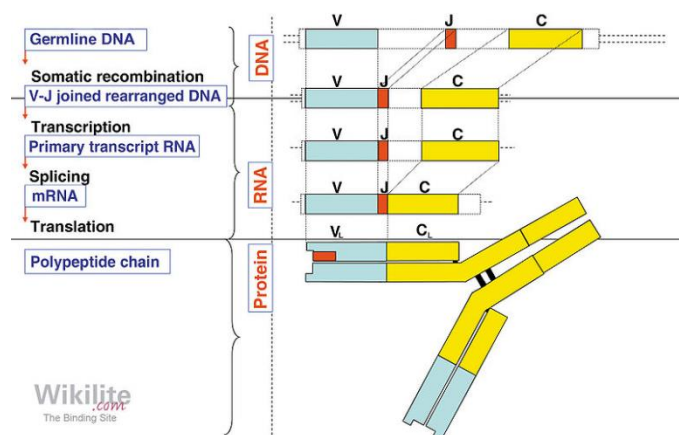


Figure 3 : réarrangement VJ des gènes des chaînes légères des immunoglobulines

L'ADN subit tout d'abord une recombinaison pour éliminer les séquences intermédiaires des régions V et J. Après la transcription, un épissage alternatif permet d'obtenir l'ARN messager. Enfin, celui-ci est traduit en chaîne polypeptidique.

(The Binding Site. Wikilite. 2015. www.wikilite.com)

Les CL sont synthétisées dans les plasmocytes de la moelle osseuse et des ganglions. Chez un sujet sain, la production est de l'ordre de 500 mg par jour et les CL_k représentent environ 2/3 des CL totales. Au sein des plasmocytes, les chaînes légères sont synthétisées en excès par rapport à la quantité de chaînes lourdes synthétisées, excès de l'ordre de 40% qui permet une conformation correcte des Ig entières. Cet excès est à l'origine de la présence physiologique de chaînes légères libres circulantes dans le sang (7,8).

Sur le plan structural, les CL physiologiques sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique de 220 acides aminés et de masse relative M_R égale à 25000. Elles sont présentes, dans le plasma, sous plusieurs formes et le terme de CLL recouvre, une entité très hétérogène sur le plan de la charge et de la masse. Les

travaux de Peterson et Berggård (9), puis ceux de Söling (10,11), ont mis en évidence la complexité structurale des CLL, à l'origine des difficultés actuelles d'interprétation de leur quantification. En effet, dans le sérum des sujets sains, les CLL κ se retrouvent à part égale sous forme de monomères ($M_R = 25\ 000$) et de dimères ($M_R = 50\ 000$). En ce qui concerne les dimères, pour la moitié d'entre eux, ils sont issus de la formation de liaisons covalentes di-sulfures S-S. L'autre moitié résulte de la formation de liaisons hydrogènes réversibles, s'établissant entre deux monomères. Une faible quantité de CLL κ est sous forme de tétramères. Les monomères et les dimères s'associent et se dissocient naturellement dans le sérum. En ce qui concerne les CLL λ , 2/3 s'associent pour constituer des dimères de M_R égale à 50 000 et 1/3 restant se trouvent sous forme de monomères. 80% des dimères résultent de la formation de liaisons covalentes : ils sont donc beaucoup plus stables que les dimères des CLL κ et n'ont aucune tendance à la dissociation.

La structure des CLL monoclonales α , quant à elle, été étudiée grâce aux PBJ, versant monoclonal des CLL physiologiques, isolées à partir des urines. Elles sont retrouvées sous forme d'un mélange de monomères et de dimères, stabilisés ou non par des liaisons covalentes. Ces formes sont les mêmes que dans le sérum des sujets sains, mais le degré de polymérisation observé varie de 5 à plus de 20, selon qu'il s'agit d'une amylose AL (AAL) ou d'un myélome multiple (MM) (12). Elles peuvent également être retrouvées sous forme de fragments de CL, de masse inférieure à la masse des monomères. Ce fragment est constitué, le plus souvent, de la partie variable des CLL (13). Des fragments de masse relative supérieure aux dimères, de l'ordre de 55 000, sont également retrouvés et constituent des molécules comportant une partie glucidique liée de façon covalente à la partie protéique (14,15). Quelques études ont également montré que les CLL monoclonale de type κ pouvaient donner des structures plus complexes, un groupement thiol libre sur la CL pouvant se lier à un groupement thiol libre de l' α_1 -antitrypsine, de l'albumine ou de la pré-albumine (16, 17, 18). Des degrés supérieurs de polymérisation des CLL κ et λ peuvent également être rencontrés lors des dyscrasies plasmocytaires malignes (19).

1.3. Métabolisme

Le rein représente l'organe au sein duquel va prendre place le catabolisme des CLL sériques. Il en découle que les concentrations et les caractéristiques des CLL polyclonales urinaires vont étroitement dépendre de son intégrité, d'une part, et de leur niveau de synthèse, d'autre part.

De par leur faible masse moléculaire, plus de 95% des CLL sont filtrées par le glomérule. Au cours de cette filtration, les dimères, liés par liaisons non covalentes, se dissocient. Au niveau du tube contourné proximal, les CLL se lient à un récepteur, localisé à la surface des cellules épithéliales rénales, le récepteur mégaline-cubuline. Ce dernier permet la réabsorption et, par la suite, la dégradation des CLL en acides aminés. On estime la réabsorption des CLL, par le tube contourné proximal, à une quantité comprise entre 10 et 30g par jour. Une faible quantité de celles-ci est finalement éliminée dans les urines, de l'ordre de 1 à 10 mg par jour. Les monomères sont éliminés du sang, en 2 à 4h, alors que les dimères, le sont en 3 à 6h. Il en résulte que le sérum contient plus de CLL λ que de CLL κ , malgré une production double de CLL κ (20, 21,22).

Dans certaines situations pathologiques, telles les dyscrasies plasmocytaires malignes, la concentration sérique des CLL est très augmentée et elles sont alors susceptibles d'exercer une action toxique au niveau du rein. La quantité filtrée par le glomérule augmentant, il en résulte une saturation progressive du système de réabsorption mégaline-cubuline de l'épithélium tubulaire proximal et une augmentation de la concentration des CLL dans les urines. Au niveau du tube contourné distal, ces CLL peuvent se lier à la protéine de Tamm-Horsfall et former un complexe de forme cylindrique qui endommage les néphrons et entraîne progressivement une insuffisance rénale appelée néphropathie à cylindres du MM. Celle-ci se traduit par la diminution de la filtration glomérulaire des CLL, ce qui provoque la diminution de leur concentration urinaire, l'élévation de leur demi-vie plasmatique et par la suite l'augmentation de leur concentration sérique (23,24).

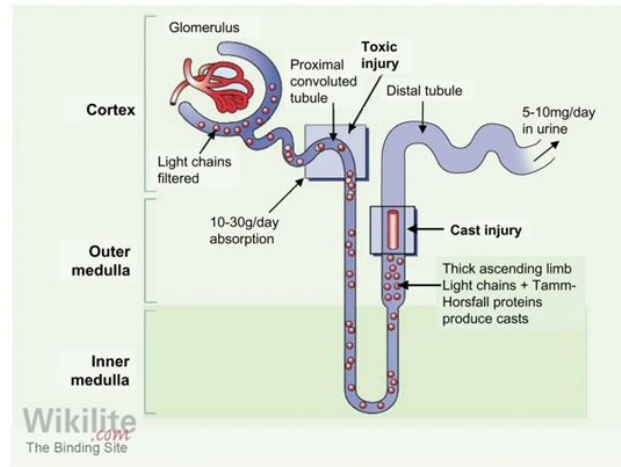


Figure 4 : Représentation schématique d'un néphron illustrant le catabolisme des CCL avec leur filtration et excrétion urinaire

Les CLL sont filtrées par le glomérule. Au niveau du tube contourné proximal, elles sont réabsorbées et dégradées grâce au récepteur mégaline-cubuline. Cette réabsorption est estimée entre 10 et 30 g par jour. Dans le tube contourné distal, leur liaison à la protéine de Tamm-Horsfall provoque la formation d'un cylindre qui détériore le rein. Enfin, une faible quantité de celles-ci est finalement éliminée dans les urines.

(The Binding Site. Wikilite. 2015. www.wikilite.com)

La sensibilité du rein à certains aspects structuraux des CLL monoclonales a conduit à l'individualisation récente des gammopathies monoclonales de signification rénale (GMSR), où la pathologie manifestée n'est pas liée à la prolifération médullaire d'un clone plasmocytaire malin mais à la structure très particulière des CLL synthétisées (25).

Outre leur effet toxique au niveau du rein, les CLL monoclonales en excès dans le sérum peuvent également exercer une toxicité systémique. Elles peuvent en effet prendre des configurations particulières qui leur permettent de s'auto-agréger et constituer un composant fibrillaire caractéristique de l'amylose AL. Ce composant va se déposer au niveau tissulaire, ce qui entraîne des complications viscérales (26,27).

1.4. Méthodes conventionnelles d'étude des chaînes légères libres

Le dépistage conventionnel des gammopathies monoclonales (GM) repose sur l'étude immunochimique conjointe du sérum et des urines qui ne permet pas toujours de mettre en évidence les CLL sériques (28).

1.4.1. Electrophorèse standard des protéines sériques

L'électrophorèse des protéines sérique (EPS) est la première étape indispensable de la recherche d'une gammopathie monoclonale. Celle-ci consiste en la séparation, sous l'action d'un champ électrique, de protéines déposées, soit sur un gel d'agarose, soit en milieu liquide au sein d'un capillaire de silice. La présence à l'EPS d'une Ig monoclonale se manifestera d'un grand nombre de façons, allant de l'absence d'anomalies électrophorétiques à la présence d'un pic de plus ou moins grande amplitude dans la fraction bêta ou gamma. Si un pic est détecté, il est ensuite mesuré par densitométrie, s'il s'agit d'un gel, ou par mesure à 200 ou 214 nm de sa densité optique (DO), s'il s'agit d'une mesure en milieu liquide.

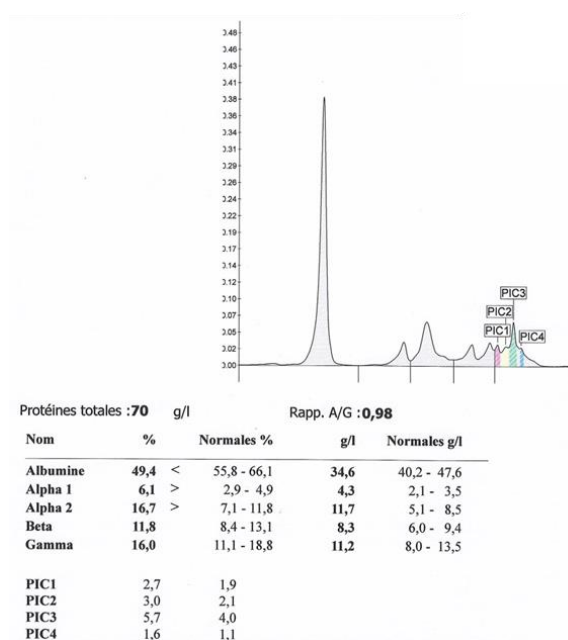


Figure 5 : Electrophorèse des protéines sériques réalisée par électrophorèse capillaire sur Capillarys 2® (Sébia)

Cette figure représente une électrophorèse des protéines sériques d'un patient présentant un MM à CLLk, mesurées à 40000 mg/L avec le réactif TBS et à 10280 mg/L avec le réactif Siemens, sur le BN Prospec®. Les quatre pics de la fraction gamma correspondent à des monomères, des dimères et des polymères de CLL.

La sensibilité de cette technique varie toujours en fonction de la mobilité mais aussi de la concentration de l'Ig entière ou des CLL. C'est ainsi que des concentrations en Ig monoclonale inférieures à 500 mg/L ne sont pas toujours visibles (29). La recherche de CLLM par EPS s'avère donc *a priori* aléatoire, la concentration de la CLL impliquée étant souvent plus faible. Des tests supplémentaires sont donc nécessaires. Ils sont représentés par l'électrophorèse-immunofixation (IFE) et l'étude des urines, avec la recherche d'une PBJ que l'on tâchera de quantifier.

1.4.2. Electrophorèse-immunofixation sérique

La technique d'IFE permet de typer les immunoglobulines monoclonales. Il s'agit d'une méthode de détection par immunoprécipitation en milieu gélifié. En présence d'un anticorps monospécifique, dirigé contre les chaînes lourdes et légères des Ig, et d'une immunoglobuline entière ou de fragments d'Ig (chaînes lourdes ou légères libres), il y a formation de complexes antigène-anticorps (Ag-Ac) qui précipitent et qui sont ensuite révélés par coloration, après élimination du matériel non précipité. Que l'EPS soit apparemment normale ou non, une immunofixation s'impose dès lors qu'il s'agit d'éliminer la présence d'une Ig monoclonale ou de la typer, si elle est visible à l'EPS, que ce soit sous forme d'un pic franc, d'une déformation de la fraction gamma ou d'une élévation anormale de l'un ou l'autre des pics β . Le seuil de détection de l'IFE varie selon les caractéristiques propres de l'Ig monoclonale et selon qu'il s'agisse d'une Ig entière ou de CLL monoclonales. Ce seuil est en moyenne de l'ordre de 250 mg/L (28).

Une étude de Nguyen TKT et al (30), portant sur 145 patients atteints d'un myélome à CLL, a montré que l'EPS détecte une anomalie qualitative et/ou quantitative des fractions β et γ dans seulement la moitié des cas, la découverte de cette anomalie conduisant alors à une exploration par IFE et confirmant ainsi la présence de CLL monoclonales. Pour cette étude, lors d'un résultat négatif par l'EPS et l'IFE, une exploration par immunoélectrophorèse (IEP) a montré, dans 95% des cas, un étalement de la migration des CLLM. Cet étalement a lieu en γ dans 34% des cas, en β dans 36%, en α dans 8% et entre $\alpha 1$ et γ dans 20% des cas. Ceci pourrait expliquer les résultats négatifs à l'EPS et à l'IFE malgré des concentrations supérieures à ses limites théoriques de détection, de l'ordre de 250

mg/L. En ce qui concerne les 5% négatifs pour toutes les techniques, les concentrations en CLL s'avéraient, dans ce travail, bien inférieures aux limites de détections.

Il existe également une méthode entièrement automatisée de typage des GM appelée immunodéplacement, réalisée à partir du Capillarys 2[®]. En dehors des cas où les CLLM se traduisent par une anomalie électrophorétique franche, cette méthode n'est pas recommandée.

Il s'avère donc important de compléter la recherche d'une GM par une exploration des urines, afin de détecter et de quantifier une PBJ.

1.4.3. Exploration des protéines urinaires

La présence d'une PBJ est recherchée par électrophorèse des protéines urinaires (EPU) et IFE dans un échantillon des urines de 24h. L'EPU et l'IFE sur les urines sont plus sensibles que les techniques électrophorétiques sériques, les CLL monoclonales urinaires pouvant être détectées à partir d'une concentration de 20 mg/L (31). Toutefois, cette exploration connaît un certain nombre de limites. Il est, en effet, difficile d'obtenir un échantillon d'urine réellement issu de la récolte de 24h, par manque de compliance des patients et de conviction des prescripteurs (32). La quantification de la protéinurie totale en présence de PBJ est également rendue difficile car les méthodes standard, par turbidimétrie ou colorimétrie, sont imprécises dans le cas de concentrations élevées en PBJ (33). Il existe, de plus, une hétérogénéité électrique des CLLU κ polyclonales qui se traduit par la présence de plusieurs bandes sur l'IFE urinaire, aspect pouvant être à l'origine d'erreurs d'interprétations (18,34). Enfin, la concentration des CLL sériques doit augmenter significativement pour que le système de réabsorption tubulaire soit dépassé et qu'elles soient excrétées dans les urines. Nowroussian et al (35) rapportent que la concentration minimum requise en CLL κ et λ dans le sérum pour une détection dans les urines est respectivement de 113 mg/L et 278 mg/L, concentrations moyennes sujettes à des écarts très importants et patients dépendants.

Une fois les bandes identifiées, la PBJ doit être quantifiée par densitométrie. Cependant, cette mesure manque d'exactitude et de précision, la concentration en

protéines totales manquant de justesse et les limites de migration des PBJ étant incertaines.

Pour toutes ces raisons, l'arrivée sur le marché en 2001 d'une technique de dosage des CLL dans le sérum a fait l'objet d'un accueil enthousiaste.

1.5. Dosage des CLL par anticorps polyclonaux

1.5.1. Généralités

Les premières techniques de dosage des CLL remontent aux années 70, mais relevaient plus du domaine des laboratoires hyperspécialisés que de celui des laboratoires de routine (36). La difficulté principale du développement du dosage a été l'obtention d'anticorps spécifiques des CLL et c'est la difficulté que TBS a franchi en réussissant à développer des anticorps anti-CLL monospécifiques dirigés contre les épitopes des CL cachés dans une Ig entière.

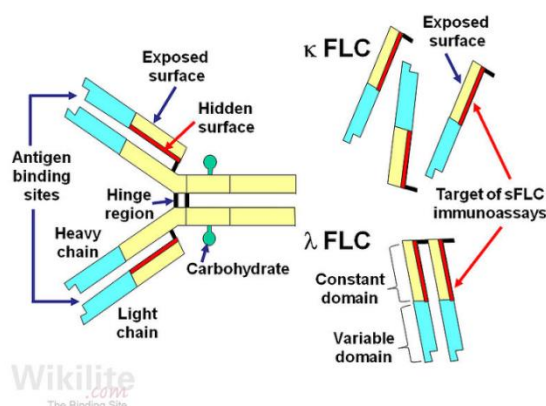


Figure 6 : Immunoglobuline entière et chaînes légères libres κ et λ

Cette figure montre les épitopes cachés des CL lorsqu'elles sont liées à l'Ig. Lorsqu'elles sont libres dans le sang, sous forme de monomère ou de polymère, les déterminants cachés sont accessibles et peuvent être reconnus par des anticorps anti-CLL.

(The Binding Site. Wikilite. 2015. www.wikilite.com)

Ce réactif composé d'anticorps polyclonaux, présentant moins de 1% de réactions croisées, est obtenu par immunisation de moutons à l'aide d'un pool de PBJ. Ces animaux sont, tout d'abord, rendus tolérants vis-à-vis des épitopes exposés des chaînes légères. Pour cela, des Ig entières, dirigées spécifiquement contre les épitopes exposés des chaînes légères humaines, sont injectées à l'animal. Ensuite, les PBJ sont injectées et l'animal synthétise des anticorps

dirigés contre les épitopes cachées des chaînes légères des Ig. Après purification, l'antisérum obtenu est hydrolysé par la pepsine pour obtenir des fragments $F(ab')_2$ qui sont ensuite fixés sur des billes de latex afin d'obtenir un réactif plus stable et plus sensible. Il a ensuite été adapté à différents analyseurs dont les néphélomètres de la série BN[®] de Siemens, Image[®] de Beckman ou encore les turbidimètres comme le SPA Plus[®] de TBS ou le Cobas Integra 400[®] de Roche. Ce sont les néphélomètres de la série BN[®] de Siemens qui ont été les plus utilisés pour la quantification en routine des CLL et ce sont sur ces automates qu'ont été réalisées la plupart des études de portée internationale.

1.5.2. Intervalles de référence

C'est à l'équipe de la Mayo clinic que l'on doit de disposer des intervalles de normalité pour les concentrations en CLL κ , en CLL λ et pour le rapport $R_{\kappa/\lambda}$ (37). Les valeurs usuelles obtenues sont retrouvées dans le tableau 1. Cependant, l'usage de ces valeurs usuelles identiques pour tous les automates a fait l'objet de critiques de la part de certains auteurs qui recommandent à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs usuelles (38).

En outre, ces valeurs usuelles ne prennent pas en compte les variations biologiques inter et intra-individuelles qui ont fait l'objet de plusieurs études aux résultats très différents selon les auteurs (39, 40, 41). De façon générale, ces variations biologiques débouchent sur la notion fondamentale de « reference change value », ou RCV, qui représente le pourcentage de variation de la concentration d'un analyte donné à partir duquel on peut considérer qu'il y a une évolution significative au risque 5%. En ce qui concerne les CLL et leur rapport, les RCV respectifs oscillent selon les auteurs entre 22% et 180%. A la lumière de ces études, on peut effectivement conclure qu'il revient à chaque laboratoire de calculer ses propres RCV, sachant que les variations biologiques intra et inter individuelles des CLL et de $R_{\kappa/\lambda}$ sont indépendantes de l'automate utilisé et que tout laboratoire connaît ses variations analytiques.

1.5.3. Limitations analytiques

Dès les premières années d'utilisation des réactifs, ont surgi des erreurs liées à la non-détection de l'excès d'antigène et à la non linéarité de dilutions successives

(42). Cela a amené certains laboratoires à effectuer systématiquement une EPS, suivie ou non d'une IFE, avant toute mesure de CLL (43), ou à utiliser deux niveaux de dilution ne se recouvrant pas (44).

Ces phénomènes de non linéarité et de non détection d'excès d'antigène ont conduit le fabricant à proposer un *modus operandi* simple et efficace, basé sur les stratégies des utilisateurs. Il repose sur la « règle du facteur 4 » qui implique l'utilisation, pour les automates de la série BN[®], de 2 dilutions, le 1/100^{ème} et le 1/2000^{ème}. En fonction du résultat obtenu avec ces deux dilutions, trois cas de figures peuvent se présenter :

- il existe entre les 2 concentrations un facteur de multiplication < 4 : ceci traduit un défaut de linéarité, la seule concentration à prendre en compte dans ce cas-là est celle du 1/100^{ème}, sans recourir à une dilution intermédiaire
- il existe entre les 2 concentrations un facteur de multiplication ≥ 4 : ceci traduit une non-détection de l'excès d'antigène et implique de ne prendre en considération que la concentration la plus élevée
- si la dilution au 1/2000^{ème} rapporte un résultat $<$ limite inférieure de la dilution, cela signifie que les CLL de l'échantillon ne sont affectées par aucun des deux problèmes précédents.

1.5.4. Variations de lots à lots

Des études ont également étudié les variations liées aux changements de lots de réactifs. Tate et al (45) ont déterminé, chez des patients présentant une GM maligne, une variation de 8 à 45% pour les concentrations en CLL κ ou λ et de 17 à 32% pour le rapport $R_{\kappa/\lambda}$. De même Altinier et al (46) ont observé chez des sujets sains des variations de 16,09% pour les CLL κ et 16,72% pour les CLL λ .

1.5.5. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats repose d'abord sur le rapport $R_{\kappa/\lambda}$ qui détermine la monoclonalité et le type de chaîne impliquée dans la production monoclonale. En effet, lorsque la valeur de $R_{\kappa/\lambda}$ est supérieure la limite supérieure de l'intervalle des valeurs usuelles, la chaîne impliquée (CLLi) est de type κ , lorsqu'elle est inférieure, alors elle est de type λ . La chaîne non impliquée (CLLni) reflète les

variations des Ig polyclonales et la CLLi reflète le niveau de synthèse des CLLM et par suite l'activité de la maladie. Des études ont développé l'utilisation de la différence des concentrations de la chaîne impliquée et celle non-impliquée, permettant dans certains cas de mieux suivre l'évolution de la maladie (47), d'autres ont développé le rapport des concentrations CLLi/CLLni, notamment appliqué pour le suivi des myélomes indolents (48).

1.6. Dosage des CLL par anticorps monoclonaux

En 2011, Siemens proposa à son tour une trousse de réactifs N Latex FLC® basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux (49). Ces anticorps sont synthétisés par immunisation de souris par des PBJ purifiées, issues de patients présentant un myélome multiple. La rate de la souris est prélevée et une fusion des lymphocytes B avec des cellules Sp2/0 de myélome murin est réalisée. Les hybrides produisant des Ac anti-CLLk ou λ sont clonés et les clones appropriés sont cultivés. Après retrait des cellules, la solution est concentrée et les Ac obtenus sont couplés à des particules de polystyrène. Les anticorps monoclonaux sont séparés en différents lots qui sont ensuite mélangés pour obtenir le réactif final.

Ces réactifs ne sont utilisables que sur les analyseurs de la série BN® de Siemens et les valeurs usuelles obtenues sur ces automates figurent dans le tableau 1. L'avantage de la méthode réside dans l'existence d'une pré-réaction permettant de s'affranchir des non-détections de l'excès d'antigène et sa quasi indépendance des variations dues aux changements de lot de réactifs (50, 51).

2. Intérêt du dosage des chaînes légères libres dans les gammopathies monoclonales

Les gammopathies monoclonales regroupent des pathologies caractérisées par la présence, dans le sérum ou les urines, d'une immunoglobuline monoclonale entière ou fragmentée ou associant les deux. Elles ont pour origine la prolifération, maligne ou non, mais toujours incontrôlée d'un seul clone de cellules B.

La découverte d'une Ig monoclonale se fait le plus souvent de façon fortuite à l'occasion d'examens biologiques, comme l'EPS, la mesure de la VS ou des protéines totales, par exemple. Elle peut se faire également devant des

symptômes d'une maladie sous-jacente, comme une anémie, ou face à des complications de type rénal par exemple.

Au sein des GM on distingue :

- Les dyscrasies plasmocytaires malignes : myélome multiple (MM), plasmocytome (P), leucémie plasmocytaire (LP), syndrome de POEMS et maladie de Waldenström (MW).
- Les dyscrasies plasmocytaires asymptomatiques : myélome indolent (MI), gammopathie monoclonale de signification indéterminée (GMSI).
- Les dyscrasies plasmocytaires symptomatiques pour des raisons structurales : amylose primitive AL (AAL), maladies de dépôts des immunoglobulines (IDD), au sein desquelles on individualise la maladie de dépôts de CLL (Light Chain Deposition Disease ou LCDD), dont fait partie la maladie de Randall, la maladie de dépôts de chaînes lourde (Heavy Chain Deposition Disease ou HCDD) et la maladie de dépôts de CLL et de chaînes lourdes (Light and Heavy Chains Deposition Disease ou LHCDD), les cryoglobulines de type I et II et les neuropathies sensitivo-motrices à Ig monoclonales.
- les syndromes lymphoprolifératifs : MW, leucémie lymphoïde chronique (LLC), lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH) et les maladies de chaînes lourdes (Heavy Chain Diseases ou HCD).
- les GM d'origine autre : reflet d'un déficit immunitaire, GM résultant d'une stimulation antigénique intense et les GM secondaires à des néoplasies diverses.

Un grand nombre de travaux portant sur les dyscrasies plasmocytaires ont montré les potentialités des CLL, qui apparaissent comme un marqueur biologique, notamment du MM, de ses précurseurs (GMSI, MI) et de ses formes cliniques (myélome non sécrétant MNS, P, LP) mais aussi des maladies de dépôts (AAL et LCDD). Ces différents points vont être envisagés successivement.

2.1. Le myélome multiple

De façon générale, le MM se présente comme une hémopathie maligne de cause inconnue qui représente 2% des cancers et 10% de l'ensemble des hémopathies

malignes, sachant que 18% environ des GM sont myélomateuses (52). Dans la population caucasienne, son incidence est de 35/1 000 000/an avec une prépondérance masculine. En France, 5000 nouveaux cas sont dénombrés par an dont 54% chez l'homme. L'âge moyen au diagnostic est de 70 ans chez l'homme et 74 ans chez la femme (53). Son diagnostic repose sur l'association d'une plasmocytose médullaire supérieure à 10% et d'au moins un des critères CRAB, à condition qu'il puisse être, sans aucun doute, la conséquence de la prolifération plasmocytaire : C pour hyperCalcémie, R pour insuffisance Rénale, A pour Anémie et B (Bone) pour lésions osseuses. La suspicion clinique de la maladie enclenche une série d'examens à la recherche d'une Ig monoclonale avec, au premier plan, l'EP des protéines sériques et urinaires, une IFE sérique et urinaire, et un dosage de CLL. Un myélome actif peut être précédé par deux formes précancéreuses appelées GMSI et MI (SMM = Smoldering Multiple Myeloma des anglo-saxonx). Il se présente également sous plusieurs formes cliniquement parlantes (MM à Ig entière, MM à CLL, LP, plasmocytome solitaire et MNS) qui seront évoquées successivement.

Myélome à immunoglobuline entière : il représente la majorité des MM, 59% des cas de myélome étant associés à des synthèses monoclonales d'IgG, 20 % à des IgA, 1% à des IgD et 0,01% à des IgE. La concentration de la CLLi est anormale dans 95% des cas.

La concentration de l'Ig entière, tout comme celle des CLL le plus souvent, augmente au cours de la maladie. Le suivi des concentrations des CLL lorsqu'elles sont détectées est particulièrement utile dans le suivi du myélome sous traitement. En effet, les CLL ont une demi-vie courte et peuvent être facilement mesurées au début et en cours de traitement, pendant la rémission ou lors d'une rechute. Lors du traitement, l'évolution du nombre de cellules tumorales dans la moelle apparaît mieux corrélée aux variations de concentrations de CLL qu'à celles de l'Ig entière, demi-vie longue de l'Ig entière comparativement à celle des CLL. Une étude de Bocquet J et al (55) a montré que cinq évolutions étaient possibles avec :

- dans 33% des cas, une évolution strictement parallèle de la concentration des CLLi et de l'Ig entière impliquée,

- dans 44% des cas, survenue d'une augmentation significativement plus précoce de la concentration des CLL que de celle de l'Ig entière,
- dans 10 % des cas, absence d'évolution du pic associée à une flambée de la concentration en CLL et aggravation des signes cliniques (« light chain escape »),
- dans 3% des cas, augmentation isolée de l'Ig entière,
- dans 10 % des cas, augmentation plus précoce de l'Ig entière que des CLL.

Les CLL apparaissent donc comme un bon marqueur du suivi et de l'évolution sous traitement d'un myélome multiple à Ig entière.

Myélome multiple à chaînes légères (MMCL) représentent 15% des MM (56). Ils sont caractérisés par la sécrétion abondante d'un type de chaînes légères. Au cours de cette maladie, les PBJ sont retrouvées dans les urines et aucune prolifération d'immunoglobulines monoclonales entières n'est détectable dans le sérum. Comme mentionné précédemment, les CLL sont généralement peu ou pas visibles à l'EPS. Même en y associant l'IFE, dans 5% des cas, elles sont indécélables (30). Le dosage urinaire étant difficile, le dosage des CLL sériques est donc important. Foray et al (17) ont montré que lors du diagnostic 100% des 75 malades de MM à CL ont été détectés grâce au rapport κ/λ .

Ainsi, le dosage des CLL s'avère-t-il indispensable au diagnostic et au suivi des MM à CL en complément de l'EPS et de l'IFE.

Myélome non sécrétant : il compte parmi 1 à 5% des MM. Pour ce type de pathologie, aucune protéine monoclonale n'est détectée dans le sérum ou les urines par les techniques conventionnelles, bien que la prolifération des plasmocytes dans la moelle osseuse soit bien présente. *A priori*, le dosage des CLL pour ce type de myélome n'est donc pas nécessaire. Cependant lors de sa mise en place en routine, le dosage des CLL a permis de différencier certains MM à CL de myélome réellement non sécrétant, la concentration en CLL circulantes était alors trop faible pour être décelable par IFE. Une étude de Drayson et al (57) a mis en évidence que, sur 28 patients diagnostiqués MNS, 19 présentaient en fait une concentration en CLL κ ou λ augmentée et un rapport κ/λ anormal.

Myélome asymptomatique ou indolent : il représente 4% des MM. Le patient ne présente pas les signes cliniques de la maladie (absence de signes CRAB), bien

que les anomalies biologiques soient présentes. Trois facteurs de risque ont été mis en évidence concernant l'évolution de ce MI en MM cliniquement parlant : un rapport $R_{\kappa/\lambda}$ anormal, un pic monoclonal ≥ 30 g/L et une plasmocytose médullaire $> 10\%$. Suivant le nombre de facteurs de risque présents, le risque de progression à 5 ans vers un MM est de 25% avec un seul facteur de risque, 51% avec deux facteurs de risque et 76% avec trois facteurs de risque (58).

Il est donc important de doser les CLL pour le suivi de ce type de myélome afin de prévoir son évolution en MM et d'agir sur le plan thérapeutique en conséquence. Récemment, la définition du MI a été modifiée et ceux qui se caractérisent par une plasmocytose supérieure à 60% et/ou un rapport $CLLi/CLLni \geq 100$ sont actuellement considérés comme des MM à traiter, même en l'absence de signes CRAB (59).

Plasmocytome solitaire : Il en existe deux types principaux, les plasmocytomes osseux et les plasmocytomes extra-médullaires (non traités ici).

Le plasmocytome solitaire osseux représente 3 à 5 % des néoplasies plasmocytaires et 75% de l'ensemble des plasmocytomes. Cette pathologie se caractérise par une tumeur plasmocytaire isolée, issue d'une prolifération de plasmocytes malins localisée dans une région osseuse. Il va évoluer dans 50% des cas vers un MM en 3-4 ans. C'est dans ce type de dyscrasie plasmocytaire que l'apport de Freelite[®] a été majeur, puisqu'à partir de $R_{\kappa/\lambda}$ et de la présence d'un pic de moins de 5 g/L, on a pu construire un modèle prédictif d'évolution vers un MM sur 5 ans. L'association, normalité du rapport et pic < 5 g/L représente un risque évolutif faible, 13% de patients dans ce cas de figure ont présenté une évolution vers un MM. La présence d'un seul facteur de risque, quel qu'il soit, représente un risque intermédiaire, 26% des patients évoluant vers un MM. 62% des patients ayant un pic > 5 g/L et un rapport anormal, ont évolué vers un MM en 5 ans (58).

Le suivi des CLL s'avère donc intéressant à réaliser afin d'évaluer le risque de progression d'un plasmocytome vers un MM.

2.2. Amylose AL

Les amyloses, généralement parlant, sont des maladies caractérisées par un dépôt extracellulaire de protéines présentes sous formes de fibrilles. La protéine mise en cause varie selon le type d'amylose. Dans l'amylose de type AA par exemple, il s'agit de la SAA (sérum amyloïde A) qui est synthétisée par le foie en réponse à une inflammation. Cette pathologie se déclare donc dans les suites d'une maladie inflammatoire chronique non traitée. Très fréquente avant l'arrivée des anti-inflammatoires, elle laisse actuellement sa première place à l'AAL qui est caractérisée par la toxicité systémique des CLL, qui vont se déposer dans les tissus de différents organes. Les plasmocytes atteints ne prolifèrent pas de manière incontrôlée, mais sécrètent des CLL de conformation particulière qui s'agrègent pour former des fibres insolubles, à l'origine de la substance amyloïde. Ces fibres se déposent sur un ou plusieurs organes (le cœur, les reins, le système nerveux périphérique, le foie...) altérant progressivement leur fonctionnement. L'AAL peut être isolée ou associée à un MM ou une MW.

Le diagnostic de la maladie repose sur une analyse histologique des tissus atteints, avec une coloration au rouge Congo positive. Une EP et une IFE sériques et urinaires sont indispensables au diagnostic et au suivi. Bien que la concentration sérique des CLL y soit généralement faible et dépende du niveau d'activité du clone plasmocytaire, de la fonction rénale du patient et de l'affinité tissulaire de la chaîne légère amyloïdogène, le dosage des CLL étant plus sensible que l'IFE sérique et urinaire, il est recommandé dès lors qu'il y a suspicion d'AAL (60).

En 2003, Lachmann et al (61) ont montré que, chez 98% des patients ayant une AAL, le dosage des CLL sériques détectait une augmentation de la concentration de la CLLi et un rapport $R_{K/\lambda}$ anormal. De plus, ils ont montré que le taux de survie après chimiothérapie était de 88% chez les patients dont la concentration anormale en CLLi avait diminué de 50%. En l'absence de cette diminution de 50%, 39% seulement des patients survivent à 5 ans.

Un consensus pour la prise en charge de patients atteints d'AAL a permis de retenir quatre stades de réponse au traitement suivant différents critères dont la

concentration sérique en CLLi. Le dosage des CLL apparaît donc comme fondamental pour le pronostic et le suivi du traitement de l'AAL.

2.3. Maladie de dépôt des CLL

Cette pathologie consiste en un dépôt d'Ig sur les cellules de la membrane basale de différents organes. On y individualise trois groupes en fonction de la nature du dépôt : soit uniquement des CLL (80% des cas), soit uniquement des chaînes lourdes, soit des chaînes lourdes et légères en même temps. Il s'agit le plus souvent de CLLk. Le dépôt touche principalement les reins et le foie et des défaillances multi-viscérales sont observées. Les dépôts viscéraux peuvent être asymptomatiques et sont détectés à l'autopsie chez 5% des patients atteints de myélome. Dans le cas d'une forme symptomatique, la manifestation clinique la plus fréquente est la maladie de Randall, accompagnant très souvent un myélome ou un autre syndrome myéloprolifératif malin.

Dans ce type de pathologie, le dosage des CLL est fondamental pour le dépistage et le suivi puisque la détection par les autres méthodes est difficile. Dans une étude de Nasr SH et al (63) portant sur 43 patients atteints de maladie de dépôt de CLL, le rapport $R_{\kappa/\lambda}$ était en dehors de l'intervalle de référence pour tous les patients et dans 79% des cas, il était très anormalement haut (>8) ou bas ($<0,125$). En ce qui concerne l'IFE sérique, elle était anormale dans 69% des cas et dans 78% pour l'IFE urinaire.

2.4. Gammapathies monoclonales de signification indéterminée

Les GMSI représentent 50 à 60% des gammapathies monoclonales. Elles sont caractérisées par la présence dans le sérum d'une Ig monoclonale avec un pic monoclonal <30 g/L, d'une plasmocytose médullaire inférieure à 10%, et une absence de signes CRAB. Le patient ne présente donc pas d'anomalies osseuses sur les radiographies et pas de trouble de la calcémie, de la créatininémie et de l'hémoglobininémie (64). Lors du diagnostic d'une GMSI, le dosage des CLL n'est pas systématique, bien qu'il y aurait un intérêt certain à le faire. En effet, cette pathologie doit être considérée comme un état pré-cancéreux, une évolution vers un MM étant possible avec un risque de transformation maligne estimé à 1% par an (65).

Rajkumar et al (66) ont montré que le rapport $R_{\kappa/\lambda}$ était un facteur prédictif de l'évolution d'une GMSI en MM. Il y a, en effet, une bonne corrélation entre $R_{\kappa/\lambda}$ et le risque de progression vers un MM. Ce risque de progression est de 17% à 10 ans avec un rapport anormal, contre 5% avec un rapport normal. A 20 ans, le risque de progression est de 35% avec un rapport anormal, contre 13% avec un rapport normal.

Au sein de ce groupe, trois facteurs de risque d'évolution vers la malignité ont été déterminés:

- la classe de l'Ig monoclonale : une classe autre que G représentant un facteur péjoratif,
- la concentration de l'immunoglobuline monoclonale produite, avec un risque augmenté pour une concentration supérieure à 15g/L,
- et enfin un rapport $R_{\kappa/\lambda}$ anormal.

Ces trois facteurs de risque permettent de déterminer la probabilité d'évolution d'une GMSI vers un MM dans les 20 ans, avec un risque de 5% en l'absence de tout facteur de risque, 21% avec un seul facteur de risque, 37% avec deux facteurs et 58% s'il y en a trois.

Il semblerait nécessaire de doser les CLL dès la découverte d'une d'Ig monoclonale afin de fixer un temps 0 et de suivre ainsi leur évolution. Si le patient présente un rapport κ/λ normal, le pronostic est bon et les suivis peuvent être réalisés annuellement. Dans le cas contraire, le risque d'évolution augmente et la fréquence des contrôles doit être augmentée à un dosage par semestre.

3. Intérêt du dosage des chaînes légères libres dans les maladies avec une élévation polyclonale des CLL

Les maladies avec une élévation polyclonale des CLL sont les pathologies rhumatismales auto-immunes, telles que le lupus érythémateux, le syndrome de Gougerot-Sjögren et la polyarthrite rhumatoïde, mais également le diabète insulino-dépendant et les maladies infectieuses chroniques comme la leishmaniose, la tuberculose, le SIDA, les affections hépatiques chroniques etc. Lors d'une atteinte rénale ou d'une maladie inflammatoire, la concentration des CLL augmente également de façon polyclonale.

Au cours des pathologies rhumatismales auto-immunes, il y a une stimulation générale des lymphocytes B pouvant se traduire à l'EPS par une élévation polyclonale des γ -globulines dite en « dôme » avec un rapport $R_{\kappa/\lambda}$ inchangé, puisqu'il y a accumulation des deux isotypes de CL (67). Bien que la concentration des CLL polyclonales dépasse rarement 100mg/L, il pourrait être informatif de mesurer leurs concentrations afin d'estimer l'activité de la maladie et de prévoir son évolution. Cela serait applicable tout particulièrement chez les patients présentant un lupus érythémateux disséminé dont la concentration en CLL polyclonales urinaires est élevée (68).

4. Nomenclature du dosage des CLL

Malgré son intérêt, ce dosage n'est pas à la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM), ce qui limite son utilisation et le réserve au domaine hospitalier. Les patients suivis en dehors des centres hospitaliers ne bénéficient pas de ce dosage, ce qui peut entraîner un retard dans la prise en compte d'une évolution défavorable des maladies précédemment présentées.

La HAS a évalué, en 2006, l'acte consistant en un dosage des chaînes légères libres (28). Cette évaluation notifie les cas où il peut être effectué :

- d'abord dans le cas de l'AAL où il apparaît comme nécessaire au diagnostic et au suivi, comme guide de la conduite thérapeutique et critère de réponse au traitement. Il a également fait ses preuves dans le MNS, le MMCL, le plasmocytome et la LCDD, aussi bien comme marqueur de suivi que comme guide de la conduite thérapeutique.
- dans le diagnostic des dyscrasies plasmocytaires abordées ci-dessus : ce test ne se substitue pas au couple EP-IFE sérique et urinaire, ni ne remplace le dosage de la PBJ. La fréquence du test est trimestrielle, sauf pour le suivi de la réponse au traitement de l'amylose AL qui est mensuelle.

Concernant l'exécution de l'analyse, il est nécessaire que le dosage sérique des CLL soit pratiqué dans des laboratoires intégrés à des équipes clinico-biologiques expérimentées dans la prise en charge de ces pathologies. Le résultat doit contenir les trois valeurs (les concentrations κ , λ et le rapport κ/λ), la technique et

l'automate utilisés. Dans le cadre du suivi, les examens pour un même patient doivent être réalisés dans le même laboratoire, avec la même technique et le même automate. Pour l'interprétation des résultats, le degré d'insuffisance rénale est à prendre en compte. Ce test n'est pas à utiliser en situation d'activation polyclonale (infection, inflammation, auto-immunité, etc).

PARTIE II

ETUDE EXPERIMENTALE

1. Matériels et méthode

1.1. Echantillons

L'étude a été réalisée sur des sérums issus de patients pour lesquels un dosage de CLL avait été prescrit. Ceux-ci avaient tous bénéficié, préalablement à ce dosage, d'une EPS et d'une IFE. Le critère d'introduction dans l'étude a été, d'une part, une EPS et une IFE strictement normales pour l'étude de la spécificité et d'autre part, une EPS, avec ou sans pic électrophorétique d'Ig entière ou de CLLM, mais avec, dans tous les cas, une IFE démontrant la présence d'une GM, quelle qu'elle soit pour l'étude de la sensibilité. Certains patients revenus plusieurs fois pendant le déroulement de l'étude ont fait l'objet d'un suivi comparatif. Les échantillons analysés pouvaient dater de moins de 3 jours ou provenir d'une sérothèque d'échantillons conservés à -20°C.

1.2. Analyseurs

Cette étude comparative a été réalisée sur deux analyseurs dédiés au dosage spécifiques des protéines et reposant sur deux méthodes différentes, l'immunonéphélométrie pour le BN Prospec® (Siemens) et l'immunoturbidimétrie pour le SPA Plus® (TBS). Ce sont deux méthodes analytiques qui reposent sur le principe selon lequel la lumière, traversant un milieu contenant des particules dont l'indice est différent de celui du milieu, diminue en intensité du fait d'un phénomène de dispersion. En turbidimétrie, on mesure la lumière transmise et en néphélométrie, on mesure la lumière diffusée dans un angle donné α par rapport à la direction de la lumière incidente (69). Ces méthodes analytiques permettent de réaliser des dosages immunologiques de protéines spécifiques dans différents liquides biologiques : sérum, plasma, urines, LCR etc.

Dans les deux méthodes, le sérum, dans lequel la concentration d'un Ag donné est à mesurer, est mis en contact avec un réactif contenant les Ac spécifiques de l'Ag. La formation du complexe Ag-Ac s'accompagne d'un trouble dont l'intensité, proportionnelle à la concentration en Ag, va être mesurée par une cellule photoélectrique, en prenant en compte le différentiel entre l'intensité de la lumière incidente avant (I_0) et après la formation des complexes (I_1), cette dernière étant plus faible que I_0 en raison du phénomène de dispersion/diffusion qui dépend du

rapport entre la taille des complexes et la longueur d'onde de la lumière incidente. La taille de la particule étant supérieure à la longueur d'onde incidente, il y a diffusion de Mie avec l'enveloppe de diffusion largement dirigée vers l'avant (fig 7) (70).

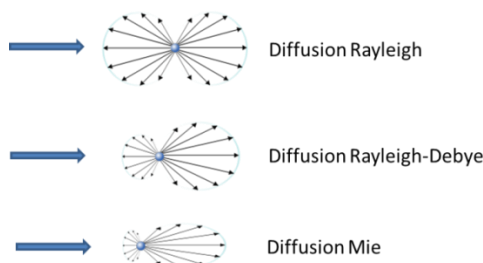


Figure 7 : Diffusion Rayleigh, Rayleigh-Debye et Mie

Cette figure représente l'enveloppe autour d'une particule en cas de diffusion Rayleigh, Rayleigh-Debye et Mie. En présence d'une particule inférieure au 1/20ème de la longueur d'onde de la lumière incidente, on observe une diffusion Rayleigh qui forme une enveloppe symétrique autour de la molécule. Au-delà du 1/20ème de la longueur d'onde, une dispersion Rayleigh-Debye est obtenue avec la diffusion qui apparaît déplacée vers l'avant de la particule. Lorsque la taille de la particule est supérieure à la longueur d'onde incidente, il y a alors diffusion de Mie avec l'enveloppe largement dirigée vers l'avant.

Limites de ces méthodes de mesure

De la qualité propre de l'échantillon et de son niveau de concentration dépendent les résultats. D'une part, ces tests ne sont pas applicables pour des échantillons hautement lipidiques, hémolysés ou contenant des concentrations élevées de complexes immuns circulants. En effet, tous ces éléments peuvent provoquer des déviations de lumière non spécifiques et fausser les mesures surtout dans le cas de la turbidimétrie. D'autre part pour les automates dépourvus d'un système de détection de l'excès d'antigène, il y a un risque élevé d'obtenir une concentration faussement normale si les CLL sont présentes en concentration élevée. En effet, l'excès d'antigène provoque une solubilisation des complexes Ag-Ac par les antigènes restés libres. La concentration mesurée est alors plus faible que la concentration réelle d'Ag. Ce phénomène est mis en évidence par l'obtention de résultats qui ne sont pas en adéquation avec les autres analyses, ou éventuellement trop faibles par rapport aux résultats attendus (EPS). La courbe de Heidelberger-Kendall explique ce phénomène (figure 8).

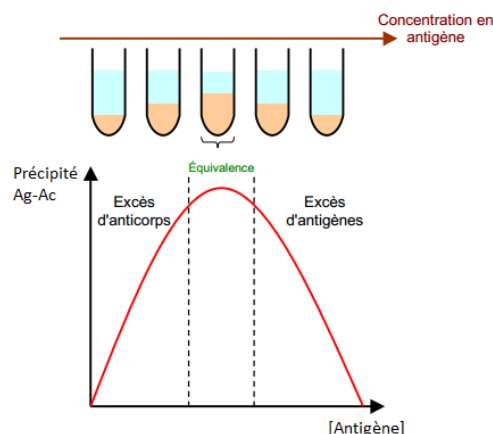


Figure 8 : Courbe de Heidelberger-Kendall

Cette courbe représente l'évolution de la concentration en complexes Ag-Ac en fonction de la concentration d'Ag et avec une concentration constante d'Ac.

Trois zones sont représentées :

- **Excès d'anticorps** : pour des concentrations faibles en antigène, chacun d'eux est pris en charge par un anticorps. Plus la concentration en antigènes augmente, plus la solubilité des complexes Ag-Ac diminue. Le nombre de ramifications augmente, les complexes précipitent et le trouble du milieu augmente. Dans ce domaine de la courbe, la concentration en antigènes est proportionnelle au signal de mesure.
- **Zone d'équivalence** : Les concentrations en antigène et en anticorps sont à peu près équivalentes. Le degré de ramifications atteint son maximum et les complexes immuns sont très peu solubles.
- **Excès d'antigènes** : la concentration en anticorps ne suffit pas pour prendre en charge tous les antigènes présents. La solubilité des complexes immuns formés augmente et le trouble diminue. Il en résulte que deux concentrations d'antigènes peuvent donner un même signal entraînant le risque de rendre une valeur très sous-estimée. Ainsi, dans le cas d'une mesure très faible ou inadaptée au contexte clinique, une nouvelle mesure est réalisée, après dilution de l'échantillon, permettant une mesure correcte en cas d'erreur de mesure par excès d'antigène.

(The Binding Site. Wikilite. 2015. www.wikilite.com)

Il est à noter que des deux automates étudiés, seul le SPAplus[®] est pourvu d'une détection de l'excès d'antigènes.

Caractéristiques du BN ProSpec[®]

L'automate fonctionne suivant le principe de mesure de la lumière diffusée et utilise comme source de lumière une diode laser de 840 nm de longueur d'onde. La lumière diffusée est mesurée par un détecteur sous un angle compris entre 13

et 24°, l'angle de mesure optimal étant déterminé au moment de la mesure par la longueur d'onde de la lumière incidente et par la taille des complexes Ag-Ac, de l'ordre de 1000 nm de diamètre puisque des particules de latex sont utilisées. A l'aide de la courbe de calibration et de la différence entre le signal mesuré avant et après la réaction, la concentration de la protéine est ainsi déterminée.

Le BN ProSpec® permet de réaliser des analyses au rythme théorique de 65 tests à l'heure. Il peut effectuer, pour les échantillons, plusieurs niveaux de dilution avec un diluant adapté : 1/5, 1/20, 1/100, 1/400, 1/2000, 1/8000 et 1/32000. Dans le cas du dosage des CLL avec les anticorps polyclonaux, les échantillons sont dosés en utilisant automatiquement la dilution standard de 1/100^e.

Caractéristiques du SPA Plus®

Il s'agit d'un automate basé sur le principe de la turbidimétrie et tous les protocoles installés sur l'automate sont réalisés avec des réactifs développés par TBS. L'analyseur utilise une lampe halogène avec une grille de diffraction permettant le choix entre 12 longueurs d'ondes pour la mesure de la réaction. Il permet de réaliser des analyses au rythme théorique de 120 tests à l'heure.

Une dilution automatique de 1/10^e est programmée et selon le signal obtenu, l'automate repasse, si nécessaire, l'échantillon « pur » ou, en cas de « prozone », signal indiquant un possible excès d'antigène, dilué au 1/100^e. Ces re-dilutions automatiques préviennent la non-détection d'excès d'antigène. Des dilutions manuelles peuvent également être réalisées à la demande.

1.3. Les réactifs

L'antigène étudié ici correspond aux CLL contenues dans le sérum du patient. Les anticorps anti-CLL utilisés pour ce dosage doivent avoir un titre suffisant, être spécifiques et avoir une forte affinité pour leur cible. Ils sont ajoutés en excès dans le milieu réactionnel pour que la concentration en complexes immuns formés soit proportionnelle à la concentration en antigène.

Différents réactifs ont été utilisés en fonction des protocoles de dosage : ceux développés par Siemens pour le BN ProSpec® et ceux développés par TBS pour le BN ProSpec® et pour le SPAplus®.

Les réactifs N Latex FLC[®] par Siemens

Les réactifs N Latex FLC[®] κ et λ ne sont utilisables que sur les automates de la série BN[®] de Siemens, pour la quantification des CLL κ ou λ . Ils sont chacun constitués d'une suspension de particules de polystyrène recouvertes d'anticorps monoclonaux de souris anti-CLL κ ou λ humains. Ils peuvent être utilisés pendant quatre semaines s'ils sont bouchés et gardés entre 2 et 8°C après utilisation ou être conservés ouverts dans l'automate pendant 5 jours.

Dans la trousse commercialisée par Siemens se trouve également un réactif N FLC Standard SL[®] nécessaire à la réalisation des courbes d'étalonnage pour le dosage des CLL de type κ et λ . Il s'agit d'un liquide stabilisé composé de CLL à concentration connue. La courbe d'étalonnage est valable pendant 6 semaines, et elle peut être utilisée au-delà tant que les contrôles se situent dans l'intervalle cible. Si le lot du réactif change, la courbe doit être refaite. La sensibilité analytique des dosages est définie par la limite inférieure de cette courbe, elle est de l'ordre de 0,5 mg/L.

Des contrôles d'exactitude et de précision des dosages de CLL κ et λ sont également disponibles. Il s'agit d'une solution stabilisée contenant des CLL de concentration connue pour contrôler chaque jour les réactifs et la courbe d'étalonnage.

Les réactifs Freelite[®] par The Binding Site

TBS a développé un coffret Freelite[®] lambda libre humain et un coffret Freelite[®] kappa libre humain pour une utilisation sur le BN ProSpec[®] de Siemens et sur le SPAplus[®] de TBS. Les réactifs sont composés d'anticorps polyclonaux monospécifiques qui sont fixés sur des billes de latex et qui sont dirigés selon le cas contre les CCL κ ou λ .

Chaque coffret comprend des calibrateurs et des contrôles de niveau haut et bas contenant des CLL κ et λ dont la concentration est connue. Les coffrets sont stockés à une température comprise entre 2 et 8°C avant ouverture et le réactif latex, les calibrateurs et les contrôles peuvent être conservés entre 2 et 8°C jusqu'à 3 mois après ouverture.

La sensibilité analytique affichée des dosages sur le BN Prospec[®] est de 0,3 mg/L pour les deux types de CLL et pour le SPAplus[®], elle est de 0,4 mg/L pour les CLLκ et de 0,45 mg/L pour les CLLλ. (71).

Intervalles des valeurs usuelles

Le tableau suivant rappelle les intervalles de valeurs usuelles pour les deux types de réactifs : anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

Valeurs usuelles	Anticorps monoclonaux Trousse N latex FLC [®] de Siemens	Anticorps polyclonaux Trousse Freelite [®] de The Binding Site
CLLκ	6,7 – 22,4 mg/L	3,3 – 19,4 mg/L
CLLλ	8,3 – 27,0 mg/L	5,7 – 26,3 mg/L
$R_{\kappa/\lambda}$	0,31 – 1,56	0,26 – 1,65 (0,37 – 3,1 si insuffisance rénale ⁷²)

Tableau 1 : Intervalle des valeurs usuelles des CLLκ et λ et du rapport $R_{\kappa/\lambda}$ en fonction des réactifs utilisés

1.4. Méthode

Pour l'étude comparative des deux techniques, anticorps monoclonaux (Siemens) vs anticorps polyclonaux (TBS), plusieurs populations ont été étudiées. Dans un premier temps, l'analyse a porté sur l'ensemble des échantillons sélectionnés (population 1), indépendamment de l'implication ou non d'une CLL, comparant ainsi K_T TBS vs K_T Siemens, λ_T TBS vs λ_T Siemens. Les CLL totales correspondent aux CLL impliquées dans la monoclonalité, notées i , et aux CLL non impliquées, notées ni : $K_T = K_i + K_{ni}$, $\lambda_T = \lambda_i + \lambda_{ni}$. L'ensemble de la population 1 comprend tous les temps 0 (t_0) des suivis, les t_1 , t_2, \dots , t_x ayant été exclus. Les échantillons ont ensuite été regroupés en fonction de l'absence (population A) ou de la présence d'une GM (population B), effectuant ainsi dans le premier cas une étude de spécificité et dans le second de sensibilité. On a également individualisé au sein de la population B, deux sous-populations en fonction du type de CLL impliquée (CLLi), la population B1 dans laquelle la CLLi est de type κ (symbolisée par κ_i et λ_{ni}) et la population B2 avec la CLLi de type λ (symbolisée par κ_{ni} et λ_i), la comparaison portant donc sur les concentrations K_i TBS vs K_i Siemens, λ_i TBS vs λ_i Siemens et sur les rapports $R_{\kappa i/\lambda_{ni}}$ TBS vs $R_{\kappa i/\lambda_{ni}}$ Siemens et $R_{\kappa_{ni}/\lambda_i}$ TBS vs $R_{\kappa_{ni}/\lambda_i}$ Siemens.

Enfin, des suivis de patients comportant au minimum 3 échantillons ont été analysés.

De même pour la comparaison des deux méthodes, néphélométrie (BN ProSpec[®]) vs turbidimétrie (SPA plus[®]), où les échantillons constituent la population 2, $K_{T\ BN}$ vs $K_{T\ SPA}$, $\lambda_{T\ BN}$ vs $\lambda_{T\ SPA}$ ont été comparés. De plus, deux sous-populations C1 et C2 ont été individualisées en fonction du type de CLLi et en leur sein, on a comparé $K_{i\ BN}$ vs $K_{i\ SPA}$, $\lambda_{i\ BN}$ vs $\lambda_{i\ SPA}$ et les rapports $R_{ki/\lambda ni\ BN}$ vs $R_{ki/\lambda ni\ SPA}$ et $R_{kni/\lambda i\ BN}$ vs $R_{kni/\lambda i\ SPA}$. Enfin, des suivis de patients comportant au minimum 3 échantillons ont également été analysés.

Dans tous les cas, à l'exception de celui concernant l'étude de suivis, cette comparaison de techniques et méthodes a fait dans un premier temps appel à une régression de Passing et Bablok, associée à une régression simple pour calculer les coefficients de corrélation r et de détermination R . La méthode de Passing et Bablok permet, d'une part, de vérifier que la relation entre deux techniques/méthodes de mesure est stable dans le domaine étudié et d'autre part de les comparer, en s'affranchissant des hypothèses de la régression linéaire simple classique, où les valeurs extrêmes peuvent fortement influencer le modèle, engendrant des conclusions fausses (73). Cette représentation permet d'obtenir une droite de type $y = \alpha + \beta x$, à partir de laquelle, on analyse les hypothèses $\beta = 1$ et $\alpha = 0$ et leurs intervalles de confiance respectifs. La valeur de la constante α mesure la différence systématique entre les techniques/méthodes. Si l'intervalle de confiance inclut 0, on accepte l'hypothèse de différence systématique nulle et on conclut à l'absence de différence systématique entre les deux méthodes/techniques. La valeur de la pente β mesure la différence proportionnelle entre les deux méthodes/techniques. Si l'intervalle de confiance comprend 1, on accepte l'hypothèse de différence proportionnelle nulle et on conclut à l'absence de différence proportionnelle entre les deux méthodes/techniques.

Dans une deuxième étape, nous avons recherché, par la méthode graphique de Bland-Altman (74, 75), l'existence d'une concordance entre les résultats obtenus par les deux méthodes/techniques (76), afin de décider si les résultats de cette comparaison seraient compatibles avec une utilisation raisonnable des réactifs Siemens ou de la turbidimétrie au laboratoire d'immunologie du CHLS pour le

dosage des CLL. Cette méthode consiste à réaliser un graphe comportant en ordonnée la différence entre les valeurs obtenues par les deux méthodes/techniques et en abscisse, la moyenne de ces mêmes valeurs. En cas de concordance parfaite, la moyenne des différences devrait être nulle. On définit donc le biais comme étant la moyenne des différences (d), sachant qu'il représente la moyenne de l'écart systématique d'une série de valeurs par rapport à l'autre et indique si une des deux techniques/méthodes tend à produire des valeurs systématiquement plus basses ou plus élevées que l'autre. On peut évaluer le degré de confiance de ce biais en calculant des intervalles de confiance autour de celui-ci. Par ailleurs la variabilité de ces différences est donnée par le calcul de l'écart-type (sd). On peut donc, au risque 5%, fixer deux seuils de limite de concordance par $d \pm 1.96sd$, appelées aussi limites d'agrément.

Enfin, en raison des écarts importants entre les niveaux de réponse des réactifs Siemens et TBS, il a été nécessaire de transformer les concentrations des CLL en \log_{10} ce qui n'a pas été nécessaire pour la comparaison de la méthode turbidimétrique à la méthode néphélométrique, l'ordre de grandeur des concentrations étant voisin.

Dans le cas de l'étude des suivis, on a comparé les informations apportées par l'analyse qualitative des différentes courbes obtenues après mesure de la concentration en CLL en fonction du temps, mais indépendamment de l'intervalle de temps séparant les différents prélèvements, le premier prélèvement correspondant au temps initial t_0 . Pour chaque patient, plusieurs façons de représenter l'évolution des concentrations en CLL au cours du temps ont été testées : expression des concentrations brutes en fonction du temps ; expression en pourcentage par rapport au t_0 des concentrations en fonction du temps et enfin représentation de l'évolution du log de la concentration en fonction du temps. L'existence d'un pic de CLL électrophorétique a également été prise en compte.

2. Résultats et discussion

Les études de répétabilité et de reproductibilité ayant été effectuées par les fabricants des réactifs, elles n'ont pas été refaites.

2.1. Les échantillons

Pour réaliser cette étude comparative à trois volets, 432 échantillons issus de 250 patients ont été sélectionnés en fonction de la présence ou non d'une GM.

Etude comparative des concentrations en CLL obtenues par immunonéphélométrie sur BN ProSpec[®] (Siemens) avec les anticorps monoclonaux N latex FLC[®] (Siemens) à celle obtenues avec les anticorps polyclonaux Freelite[®] (TBS).

La population 1 a été constituée de 283 échantillons (250 patients), dont 35 étaient issus de 35 patients sans GM (population A) et 248 de 215 patients avec GM (population B). Au sein de la population B, 33 patients étaient représentés par deux échantillons, mais, l'intervalle de temps entre les deux étant important (plus de 9 mois), ils ont été considérés comme indépendants.

La population A comportait 20 femmes et 15 hommes, âgés de 24 à 91 ans, l'âge moyen étant de 55 ans. Quant à la population B, elle comportait 87 femmes (40%) et 129 hommes (60%), âgés de 29 à 97 ans, l'âge moyen étant de 66 ans (figure9).

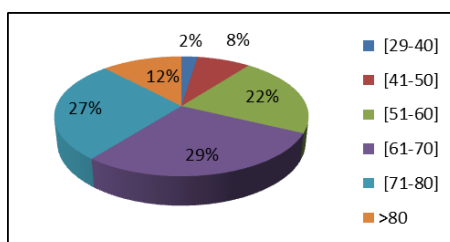


Figure 9 : Répartition des âges au sein de la population avec ou sans GM (population 1) et rassemblée pour comparer deux techniques de dosages des CLL

La répartition des pathologies observées dans la population B est représentée dans la figure 10, où l'on peut voir que 70% de cette population est atteinte de MM.

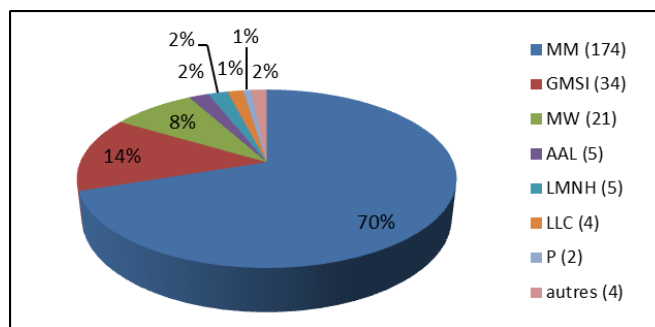


Figure 10 : Répartition des pathologies observées dans la population B composée de patients avec gammapathie monoclonale et rassemblés pour comparer deux techniques de dosages des CLL

La population B a ensuite été scindée selon la nature de la CLL impliquée (CLL_i) κ ou λ . Ainsi, on a obtenu la population B1 (κ_i) constituée de 138 prélèvements (124 patients) et la population B2 (λ_i) constituée de 113 prélèvements (93 patients), dont trois échantillons ont été retrouvés dans les deux groupes, les patients présentant une double gammapathie (2 échantillons avec gammapathie diclonale homotypique, IgM κ /IgM λ , et 1 échantillon avec une gammapathie diclonale hétérotypique, IgM κ /IgA λ).

Pour mieux appréhender le comportement des deux réactifs (monoclonaux et polyclonaux) vis à vis des CLL monoclonales, l'évolution dans le temps des concentrations en CLL_i a été analysée chez 26 patients présentant un MM (18 hommes, 8 femmes). Tous les suivis ont comporté entre 3 et 20 échantillons suivant les patients, ce qui a représenté un total de 174 échantillons correspondant à 11 patients à $CLL_i \kappa$ et 15 patients à $CLL_i \lambda$. Les 26 échantillons, correspondant aux temps 0 (t_0) des suivis, font également partie de la population B.

Étude comparative de la turbidimétrie (SPAplus[®]) et de la néphélométrie (BN ProSpec[®]) avec anticorps polyclonaux Freelite[®] (TBS)

Pour cette comparaison, 102 échantillons de patients atteints d'un MM ont été analysés. Cependant, l'un d'entre eux a dû être éliminé en raison d'une discordance trop importante ($K_{turb} \gg K_{neph}$). La population 2 a donc comporté 101 échantillons (16 hommes et 11 femmes), dont 12 étaient issus de la population 1 et 88 de la population, et l'évolution en fonction du temps de la concentration des CLL_i a été comparée en fonction des réactifs utilisés.

Pour un âge moyen de 62 ans, la répartition des âges de cette population est représentée dans la figure 11.

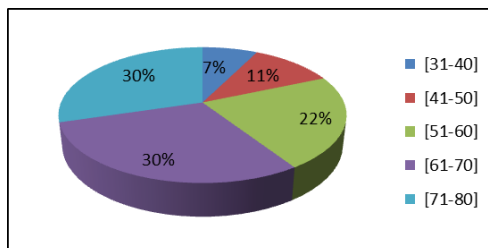


Figure 11 : Répartition des âges au sein de la population 2 composée de patients suivis pour un myélome multiple et rassemblés pour comparer deux techniques de dosages des CLL

A partir de la subdivision de la population 2 en fonction de la CLLi, on a obtenu une population C1 (κ_i) de 46 échantillons et une population C2 (λ_i) de 55 échantillons.

La comparaison des deux réactifs a été complétée par à une étude de l'évolution au cours du temps de la concentration de la CLLi de 17 patients atteints d'un MM (13 hommes et 4 femmes), 7 de CLLi κ et 10 de CLLi λ . Tous les suivis ont été réalisés en faisant appel à un minimum de 3 échantillons et à un maximum de 20, le tout représentant un total de 88 sérums.

Récapitulatif des populations

La figure 12 explicite la composition des différentes populations étudiées en vue de comparer deux réactifs (anticorps monoclonaux vs anticorps polyclonaux) et deux méthodes (turbidimétrie vs néphélométrie) et on rappelle ci-dessous, les différentes comparaisons effectuées :

- 1) ont été comparés deux réactifs (anticorps polyclonaux vs anticorps monoclonaux), qui ont été utilisés sur un même automate de néphélométrie et ce au sein d'une population avec et sans GM.
- 2) ont été comparées deux méthodes de dosage des chaînes légères libres : néphélométrie vs turbidimétrie, sur une population avec MM, avec comme réactifs de base des anticorps polyclonaux issus du même fabricant.

3) ont été comparées les courbes de suivis de patients avec MM obtenues par néphélogéométrie selon deux techniques (anticorps monoclonaux vs anticorps polyclonaux) et deux méthodes (turbidimétrie vs néphélogéométrie).

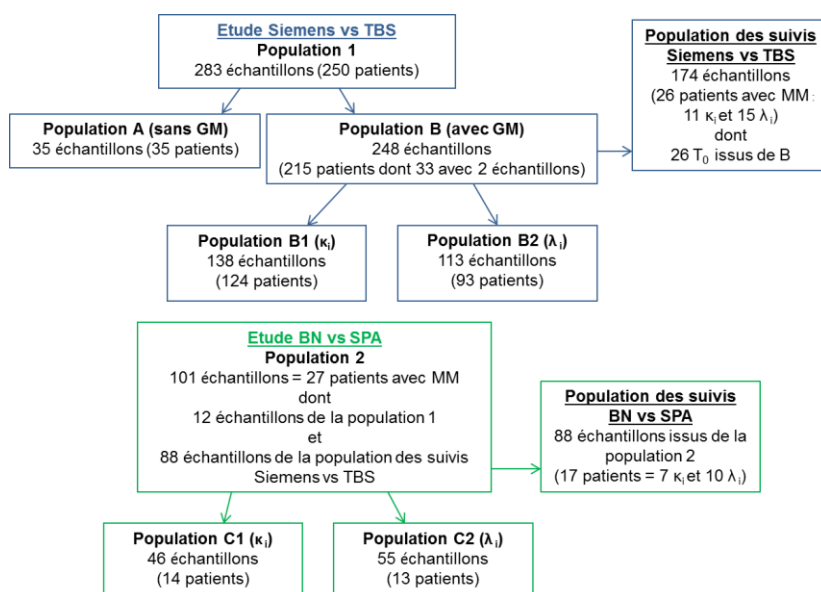


Figure 12 : Récapitulatif des populations étudiées

La comparaison entre les anticorps polyclonaux (TBS) vs les anticorps monoclonaux (Siemens) a été menée sur la population 1 de 283 échantillons. De cette population, sont issues une sous-population A, de 35 échantillons de patients sans GM, et une sous-population B, de 248 échantillons de patients avec GM. La population B a ensuite été subdivisée en B1 (κ_i) de 138 prélèvements et en B2 (λ_i) de 113 prélèvements. La population des suivis des réactifs TBS vs Siemens (174 échantillons) a comporté 26 t_0 issus de la population B. La comparaison turbidimétrie (SPAplus®) vs néphélogéométrie (BN ProSpec®) a été menée sur la population 2 de 101 échantillons, dont 12 sont issus de la population 1 et 88 de la population des suivis des réactifs TBS vs Siemens. Cette population 2 a été divisée en C1 (κ_i) de 46 prélèvements et en C2 (λ_i) de 55 prélèvements. L'étude des suivis turbidimétrie (SPAplus®) vs néphélogéométrie (BN ProSpec®) a été effectuée sur 88 échantillons issus de la population 2.

2.2. Comparaison entre les concentrations de CLL obtenues avec les anticorps monoclonaux N latex FLC® (Siemens) et les anticorps polyclonaux Freelite® (TBS) sur le néphélomètre BN ProSpec® (Siemens)

2.2.1. Etude de la population 1

- **Etude des concentrations K_T**

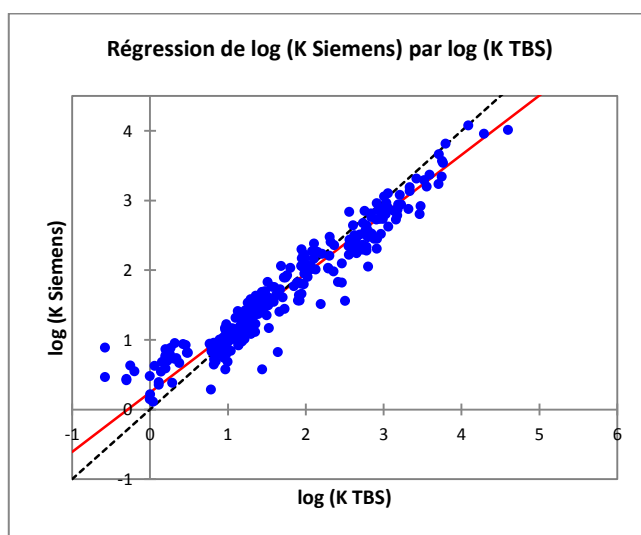


Figure 13 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $K_{T \text{ Siemens}}$ à $K_{T \text{ TBS}}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log K_{T \text{ Siemens}}$ et $\log K_{T \text{ TBS}}$ avec $N = 283$.

L'équation de la droite de régression s'écrit : $\log K_{T \text{ Siemens}} = 0,852 \times \log K_{T \text{ TBS}} + 0,243$

$IC_{95\%}$ de la pente = $[0,824 ; 0,882]$; $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine = $[0,188 ; 0,286]$

Coefficient de corrélation $r = 0,960$ ($R = 0,921$)

Bien que la corrélation soit forte ($r=0,960$), l'interprétation des $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine et de la pente révèle l'existence d'une différence systématique (0 situé en dehors de l' $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine) et proportionnelle (1 situé en dehors de l' $IC_{95\%}$ de la pente) entre les deux techniques. De plus, d'après l'équation de la droite de régression (figure 13), il apparaît que pour une valeur de $\kappa < 43,7$ mg/L ($\log K_{T \text{ TBS}} < 1,64$), les concentrations obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens) sont supérieures à celles obtenues avec les anticorps polyclonaux (TBS). Pour des valeurs de $K_{T \text{ TBS}}$ supérieures à 43,7 mg/L, c'est avec les anticorps polyclonaux (TBS) que l'on obtient les concentrations les plus élevées.

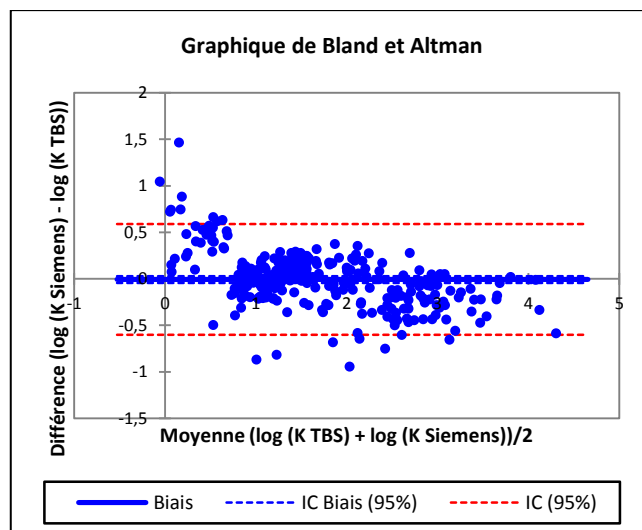


Figure 14 : Analyse de concordance entre $K_{T\text{ Siemens}}$ et $K_{T\text{ TBS}}$ par la méthode de Bland-Altman

La droite en ligne continue bleue représente le biais (moyenne des différences $\log K_{T\text{ Siemens}} - \log K_{T\text{ TBS}}$). Les droites en pointillés bleus correspondent à l'intervalle de confiance du biais et les droites en pointillés rouges aux limites d'agrément.

Biais de $\log K_{T\text{ Siemens}} - \log K_{T\text{ TBS}} = -0,008$; avec $IC_{95\%} =]-0,044 ; -0,027[$

Ecart type des différences = 0,304 ; Limites d'agrément = $] -0,604 ; 0,588[$

Le calcul de l' $IC_{95\%}$ du biais montre que celui-ci est significativement négatif (-0,008) car n'incluant pas 0 (-0,044 à -0,027). Il en résulte que les concentrations $K_{T\text{ Siemens}}$ obtenues sont inférieures aux concentrations $K_{T\text{ TBS}}$ et leurs différences sont d'autant plus importantes que K_T est élevé. L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 12) et le calcul des limites d'agréments montrent que la différence des log des concentrations en CLLk de 9 échantillons, de faible concentration κ , se situent au-dessus de la limite supérieure d'agrément, et que 8 de fortes concentrations κ se situent en-dessous de la limite inférieure d'agrément. Il y a donc 17 échantillons discordants (6%).

$K_{T\text{ Siemens}} \backslash K_{T\text{ TBS}}$	< 3,3 mg/L	3,3 – 19,4 mg/L	> 19,4 mg/L
< 6,7 mg/L	26	11	2
6,7 – 22,4 mg/L	6	63	11
>22,4 mg/L	0	7	157

Tableau 2 : Tableau de concordance entre les concentrations $K_{T\text{ Siemens}}$ et $K_{T\text{ TBS}}$

Dans ce tableau, sont répartis les échantillons selon les intervalles de références des concentrations correspondant à chacune des deux techniques. La concordance calculée est de 86,9% (= 246/283)

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 2), il apparaît que 37 échantillons sur 283 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance s'élevant donc à 13,1 %.

- Etude des concentrations λ_T

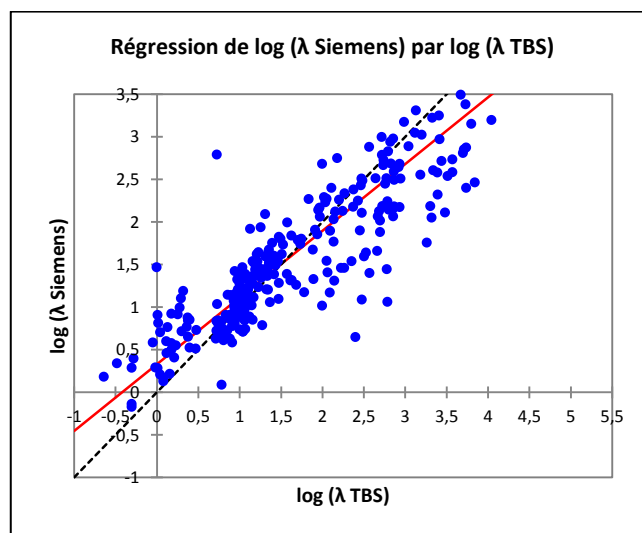


Figure 15 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{T \text{ Siemens}}$ à $\lambda_{T \text{ TBS}}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log \lambda_{T \text{ Siemens}}$ et $\log \lambda_{T \text{ TBS}}$ avec $N = 283$.

L'équation de la droite de régression s'écrit :

$$\log \lambda_{T \text{ Siemens}} = 0,783 \times \log \lambda_{T \text{ TBS}} + 0,331$$

$IC_{95\%}$ de la pente $[0,738 ; 0,836]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine $[0,236 ; 0,378]$

Coefficient de corrélation $r = 0,874$ ($R = 0,765$)

Bien que les résultats obtenus avec ces deux réactifs apparaissent bien corrélés ($r=0,874$), le coefficient de corrélation est nettement plus faible que pour K_T ($0,96$). Comme précédemment, l'analyse de l' $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine et de la pente montre qu'il existe une différence systématique (0 situé en dehors de l'intervalle de confiance de l'ordonnée à l'origine) et proportionnelle (1 situé en dehors de l'intervalle de confiance de la pente) entre les concentrations obtenues avec les deux réactifs. De plus, d'après l'équation de la droite de régression (figure 15), il vient que pour des concentrations en CLL $\lambda < 33,9$ mg/L (soit $\log \lambda_{T \text{ TBS}} < 1,53$), les concentrations obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens) sont

supérieures à celles obtenues avec les anticorps polyclonaux (TBS) et inversement pour des concentrations supérieures à 33,9 mg/L.

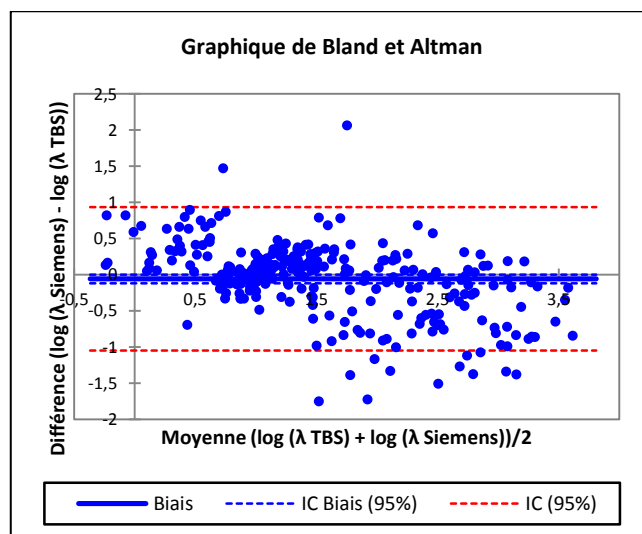


Figure 16 : Analyse de concordance entre $\lambda_{T\text{ Siemens}}$ et $\lambda_{T\text{ TBS}}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\log \lambda_{T\text{ Siemens}} - \log \lambda_{T\text{ TBS}} = -0,058$; dont $IC_{95\%} =]-0,118 ; -0,001[$

Ecart type des différences = 0,506 ; Limites d'agrément = $] -1,051 ; 0,934[$

L'analyse de concordance, par la méthode de Bland-Altman, montre qu'il existe un biais négatif (-0,058) et significatif (0 n'étant pas inclus dans l' $IC_{95\%}$ du biais (-0,118 à -0,001) entre les concentrations mesurées par chacun des deux réactifs. Il existe donc une différence significative entre les deux réactifs, les concentrations en CLL $\lambda_{T\text{ Siemens}}$ s'avérant inférieures aux concentrations CLL $\lambda_{T\text{ TBS}}$ et il apparaît que leurs différences sont d'autant plus importantes que λ_T est élevé.

L'analyse du diagramme de Bland-Altman (fig 16) et le calcul des limites d'agrément montrent que les différences entre le log de la concentration en CLL λ de 2 échantillons de faible concentration, se situent au-dessus de la limite supérieure d'agrément et que cette différence pour 12 autres de concentration λ élevée se situent en-dessous de la limite inférieure d'agrément. Il en découle une discordance de 4,9% des échantillons, celle-ci étant principalement observée pour des concentrations élevées de λ_{TBS} (12/14). L'utilisation des anticorps polyclonaux (TBS) aboutit donc à des concentrations λ bien supérieures à celles obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens).

$\lambda_{T\text{ Siemens}} \backslash \lambda_{T\text{ TBS}}$	< 5,7 mg/L	5,7 – 26,3 mg/L	> 26,3 mg/L
< 8,3 mg/L	39	30	1
8,3 – 27 mg/L	5	62	15
> 27 mg/L	2	24	105

Tableau 3 : Tableau de concordance entre les concentrations $\lambda_{T\text{ Siemens}}$ et $\lambda_{T\text{ TBS}}$

Dans ce tableau, sont répartis les échantillons selon les intervalles des valeurs usuelles des concentrations propres à chacune des deux techniques. La concordance calculée est de 72,8% (= 206/283)

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 3), il apparaît que 77 échantillons sur 283 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance s'élevant donc à 27,2 %.

- Récapitulatif des résultats de la population 1

	CLLκ	CLLλ
Population	N = 283	N = 283
Passing Bablok		
Equation	$\log(K_{T\text{ Siemens}}) = 0,852 \times \log(K_{T\text{ TBS}}) + 0,243$	$\log(\lambda_{T\text{ Siemens}}) = 0,783 \times \log(\lambda_{T\text{ TBS}}) + 0,331$
IC _{95%} pente	[0,824 ; 0,882]	[0,738 ; 0,836]
IC _{95%} ordonnée à l'origine	[0,188 ; 0,286]	[0,236 ; 0,378]
Corrélation		
Coefficient de corrélation	r = 0,960	r = 0,874
Coefficient de détermination	R = 0,921	R = 0,765
Bland-Altman		
Biais	-0,008 Significativement négatif	-0,058 Significativement négatif
IC _{95%} du biais	=]-0,044 ; -0,027[=]-0,118 ; -0,001[
Concordance		
	86,9%	72,8%

Tableau 4 : Récapitulatif des résultats de la population 1

Le tableau 4 récapitule l'ensemble des résultats obtenus pour l'étude comparative globale et amène aux conclusions suivantes : lorsque les concentrations en CLL sont supérieures à 44 mg/L pour κ et 34 mg/L pour λ , l'utilisation des anticorps polyclonaux Freelite® (TBS) aboutit à l'obtention de concentrations plus élevées en κ et λ qu'avec les anticorps monoclonaux N latex FLC® (Siemens). Il existe une

bien meilleure concordance pour les CLL κ (86,9%) que pour les CLL λ (72,8%). On peut se demander si c'est révélateur d'une moins bonne reconnaissance de la part des anticorps monoclonaux des épitopes des CLL λ , dont les 2/3 sont sous forme de dimères reliés par des liaisons covalentes. La séparation de la population en population A (sans GM) et B (avec GM) devrait apporter, au moins partiellement, une réponse à cette interrogation.

2.2.2. Etude de la population A sans GM

- Etude des concentrations κ

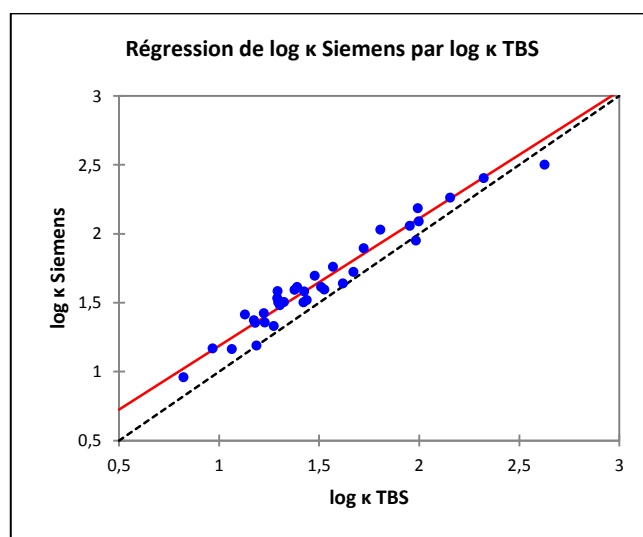


Figure 17 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $K_{Siemens}$ à K_{TBS}

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log K_{Siemens}$ et $\log K_{TBS}$ avec $N = 35$.

L'équation de la droite s'écrit : $\log K_{Siemens} = 0,925 \times \log K_{TBS} + 0,261$

$IC_{95\%}$ de la pente = $[0,848 ; 1,028]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine = $[0,113 ; 0,374]$

Coefficient de corrélation $r = 0,976$ ($R = 0,952$)

Il existe une forte corrélation ($r=0,976$) entre les concentrations obtenues avec les deux types d'anticorps. De l'analyse des $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine et de la pente de la droite de régression (fig 17), on en déduit qu'il existe une faible différence systématique (0 situé en dehors de l'intervalle de confiance de l'ordonnée à l'origine) mais pas de différence proportionnelle (1 inclus dans l'intervalle de confiance de la pente) entre ces réactifs.

D'après l'équation de la droite de régression, il ressort que jusqu'à la concentration théorique de $K_{TBS} < 3019$ mg/L (soit $\log K_{TBS} < 3,48$), c'est avec les anticorps monoclonaux (Siemens) que l'on obtient des concentrations en CLL supérieures à celles obtenues avec les anticorps polyclonaux (TBS). Bien qu'une synthèse polyclonale à un tel niveau de concentration (>1000) soit impossible, on peut en conclure que la sensibilité des anticorps monoclonaux pour les CLL polyclonales κ est plus grande que celle des anticorps polyclonaux.

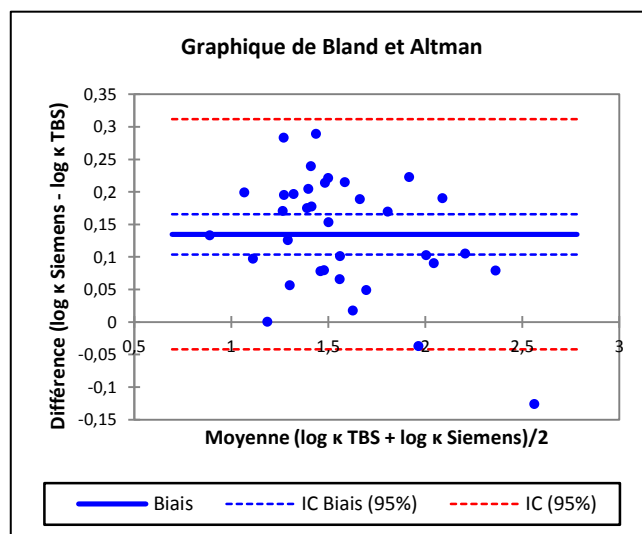


Figure 18 : Analyse de concordance entre $K_{Siemens}$ et K_{TBS} par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\log K_{Siemens} - \log K_{TBS} = 0,135$; dont IC $_{95\%} =]0,104 ; 0,166[$

Ecart type des différences = 0,09 ; Limites d'agrément = $]-0,042 ; 0,321[$

L'analyse de concordance par la méthode de Bland Altman montre qu'il existe un biais significativement positif de 0,135, son intervalle de confiance n'incluant pas 0 (0,104-0,166). Il en résulte, comme le laissait prévoir la droite de régression, que les concentrations $K_{Siemens}$ sont globalement supérieures à celles de K_{TBS} . L'analyse du diagramme de Bland-Altman (fig 18) montre que la différence entre les log des concentrations en CLLk d'un seul échantillon est située en dehors des limites d'agrément, soit une concordance entre les deux réactifs appliqués au dosage des CLLk polyclonales de 97,1%.

$K_{Siemens} \backslash K_{TBS}$	< 3,3 mg/L	3,3 – 19,4 mg/L	> 19,4 mg/L
< 6,7 mg/L	0	0	0
6,7 - 22,4 mg/L	0	5	0
> 22,4 mg/L	0	5	25

Tableau 5 : Tableau de concordance entre les concentrations $K_{Siemens}$ et K_{TBS}

Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles des valeurs usuelles des concentrations obtenus avec les deux réactifs. La concordance calculée est de 85,7% (= 30/35)

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 5), il apparaît que 5 échantillons sur 35 n'appartiennent pas au même groupe, cette discordance de 14,3% résulte de la meilleure sensibilité des anticorps monoclonaux vis-à-vis des CLLk polyclonales.

- Etude des concentrations λ

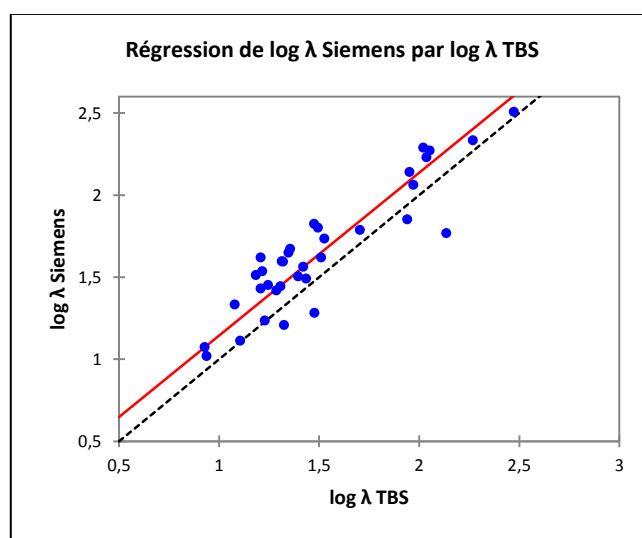


Figure 19 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{Siemens}$ à λ_{TBS}

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log \lambda_{Siemens}$ et $\log \lambda_{TBS}$ avec $N = 35$.

L'équation de la droite de régression s'écrit : $\log \lambda_{Siemens} = 0,993 \times \log \lambda_{TBS} + 0,150$

$IC_{95\%}$ de la pente [0,862 ; 1,193], $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine [-0,124 ; 0,377]

Coefficient de corrélation $r = 0,908$ ($R = 0,825$)

Il existe une bonne corrélation ($r=0,908$) entre les concentrations obtenues avec les deux types d'anticorps, moins élevée cependant qu'avec les CLLk (0,976). Par

ailleurs, 1 étant compris dans l'IC_{95%} de la pente et 0 dans IC_{95%} de l'ordonnée à l'origine, on ne met en évidence aucune différence proportionnelle ou systématique entre les concentrations obtenues avec les anticorps polyclonaux et monoclonaux.

L'analyse de l'équation de la droite de régression montre que l'utilisation des anticorps monoclonaux (Siemens) aboutit à des concentrations supérieures à celles obtenues avec les anticorps polyclonaux (TBS) et ceci pour $\log \lambda_{TBS} < 21,4$, ce qui correspond à des concentrations extrêmement élevées de CLL λ , impossibles à atteindre dans la réalité.

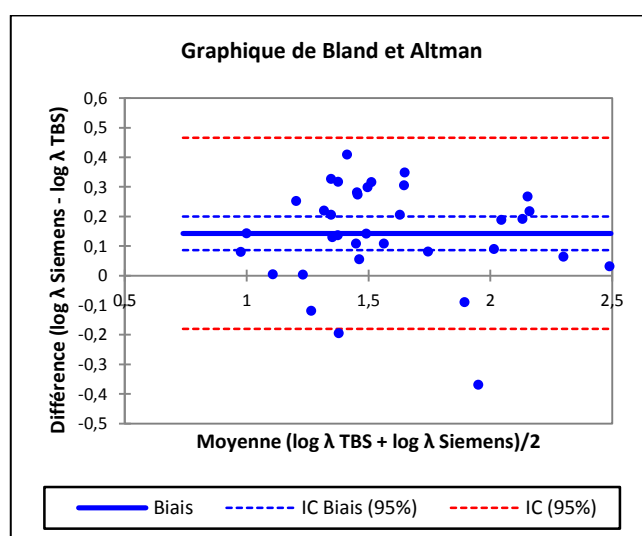


Figure 20 : Analyse de Bland-Altman pour $\log \lambda_{Siemens}$ et $\log \lambda_{TBS}$

Biais de $\log \lambda_{Siemens} - \log \lambda_{TBS} = 0,143$; dont $IC_{95\%} =]0,086 ; 0,199[$

Ecart type des différences = 0,165 ; Limites d'agrément = $] -0,180 ; 0,466[$

L'analyse de concordance par la méthode de Bland Altman montre qu'il existe un biais significativement positif de 0,143, l'intervalle de confiance n'incluant pas 0 (0,086-0,199). Il en résulte, comme le laissait prévoir l'équation de la droite de régression, que les concentrations en CLL $\lambda_{Siemens}$ sont globalement supérieures à celles de λ_{TBS} . L'analyse du diagramme de Bland-Altman (fig 20) montre que la différence entre les log des concentrations des CLL λ de 2 échantillons est située en dehors des limites d'agrément, soit une discordance de 5,7% entre les deux réactifs appliqués au dosage des CLL λ polyclonales.

$L_{Siemens} \backslash L_{TBS}$	< 5,7 mg/L	5,7 – 26,3 mg/L	> 26,3 mg/L
< 8,3 mg/L	0	0	0
8,3 - 27 mg/L	0	8	1
> 27 mg/L	0	10	16

Tableau 6 : Tableau de concordance entre les concentrations $\lambda_{Siemens}$ et λ_{TBS}

Dans ce tableau sont répartis les échantillons selon les intervalles des valeurs usuelles des concentrations obtenus pour les deux techniques. La concordance calculée est de 68,6% (= 24/35).

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 6), il apparaît que 11 échantillons sur 35 ne sont pas répartis dans le même groupe, la discordance de 3,4% résultant, pour l'essentiel, de la meilleure sensibilité des anticorps monoclonaux vis-à-vis des CLL λ polyclonales que celle observée avec les anticorps polyclonaux.

- Etude du rapport $R_{K/\lambda}$

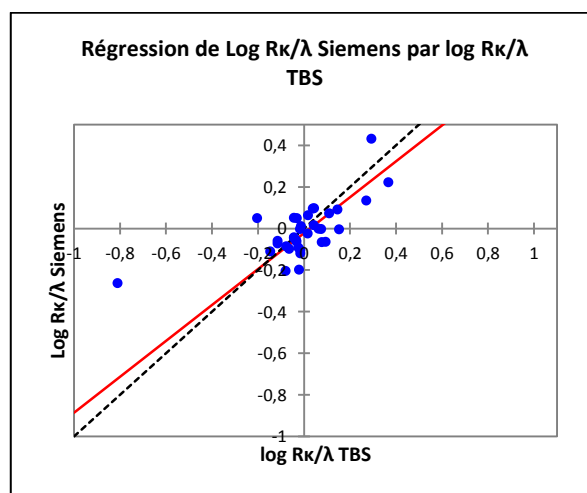


Figure 21 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $R_{K/\lambda Siemens}$ à $R_{K/\lambda TBS}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log R_{K/\lambda Siemens}$ et $\log R_{K/\lambda TBS}$ avec $N = 35$.

L'équation de la droite de régression s'écrit : $\log R_{K/\lambda Siemens} = 0,864 \times \log R_{K/\lambda TBS} - 0,023$

$IC_{95\%}$ de la pente [0,580 ; 1,368], $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine [-0,011 ; -0,021]

Coefficient de corrélation $r = 0,685$ ($R = 0,470$)

Bien que les valeurs des rapports obtenues avec ces deux réactifs soient corrélées ($r=0,685$), le niveau de la liaison est particulièrement faible, puisque le

coefficient de détermination n'atteint pas 0,5, ce qui implique que seulement la moitié des rapports suivent l'équation de la droite de régression. L'étude des IC_{95%} de la pente et de l'ordonnée à l'origine montre l'absence de différence proportionnelle mais la présence d'une erreur systématique entre les deux réactifs.

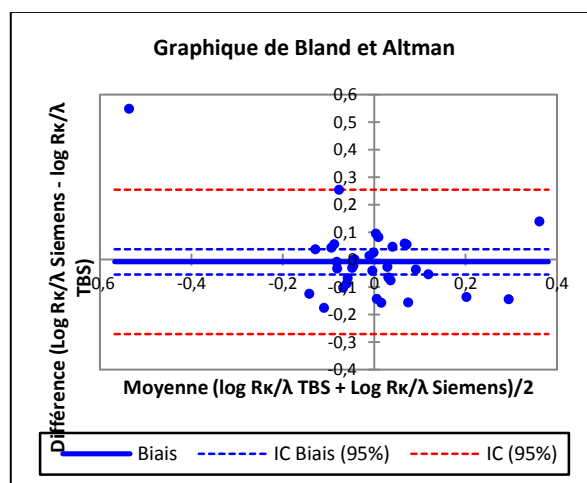


Figure 22 : Analyse de Bland-Altman pour $\log R_{K/\lambda \text{ Siemens}}$ et $\log R_{K/\lambda \text{ TBS}}$

Biais de $\log R_{K/\lambda \text{ Siemens}} - \log R_{K/\lambda \text{ TBS}} = -0,008$; dont $IC_{95\%} =]-0,054 ; 0,038[$

Ecart type des différences = 0,134 ; Limites d'agrément = $] -0,271 ; 0,255 [$

L'analyse de concordance par la méthode de Bland Altman montre qu'il existe un biais négatif de -0,008, mais qui n'est pas significatif, son intervalle de confiance incluant 0 (-0,054 - 0,038). L'analyse du diagramme de Bland-Altman (fig 22) montre qu'un seul échantillon voit la différence entre les log de $R_{K/\lambda}$ située en dehors des limites d'agrément, soit une discordance de 2,9% entre les deux réactifs.

$R_{K/\lambda \text{ TBS}} \backslash R_{K/\lambda \text{ Siemens}}$	< 0,26	0,26 – 1,65	> 1,65
< 0,31	0	0	0
0,31 – 1,56	1	31	1
> 1,56	0	0	2

Tableau 7 : Concordance observée entre les valeurs des rapports $R_{K/\lambda \text{ Siemens}}$ et $R_{K/\lambda \text{ TBS}}$

TBS

Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles des valeurs usuelles des rapports obtenus pour les deux réactifs. La concordance calculée est de 94,3% (= 33/35).

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 7), il apparaît que 2 échantillons ne sont pas répartis dans les mêmes groupes suivant les deux types d'anticorps. La discordance s'élève donc à 5,7 %. Pour les 31 patients dont le rapport est normal avec les deux réactifs, 9 ont des concentrations en CLL κ et λ situées à l'intérieur de l'intervalle des valeurs usuelles, obtenues avec chacun des deux anticorps (tableau des concentrations en annexe). Les autres patients, atteints d'insuffisance rénale, ont une augmentation « physiopathologique » concomitante des concentrations en CLL κ et λ , d'où une normalisation du rapport. Ainsi, même dans des conditions pathologiques autres que celles associées aux GM, la concordance observée, entre les deux types de réactifs pour le rapport κ/λ , est bonne.

- Récapitulatif des résultats de la population A

	CLL κ	CLL λ	R κ/λ
Population	N = 35	N = 35	N = 35
Passing Bablok			
Equation	$\log(K_{\text{Siemens}}) = 0,925 \times \log(K_{\text{TBS}}) + 0,261$	$\log(\lambda_{\text{Siemens}}) = 0,993 \times \log(\lambda_{\text{TBS}}) + 0,150$	$\log(R_{\kappa/\lambda \text{ Siemens}}) = 0,864 \times \log(R_{\kappa/\lambda \text{ TBS}}) - 0,023$
IC _{95%} pente	[0,848 ; 1,028]	[0,862 ; 1,193]	[0,580 ; 1,368]
IC _{95%} ordonnée à l'origine	[0,113 ; 0,374]	[-0,124 ; 0,377]	[-0,011 ; -0,021]
Corrélation			
Coefficient de corrélation	r = 0,976	r = 0,908	r = 0,685
Coefficient de détermination	R = 0,952	R = 0,825	R = 0,470
Bland-Altman			
Biais	0,135 Significativement positif	0,143 Significativement positif	-0,008
IC _{95%} du biais] 0,104 ; 0,166[] 0,086 ; 0,199[] -0,054 ; 0,038[
Concordance			
	85,7%	68,6%	94,3%

Tableau 8 : Récapitulatif des résultats de l'analyse comparative des concentrations obtenues en CLL en fonction de la nature des anticorps, au sein d'une population sans gammapathie monoclonale (population A, avec N=35)

L'ensemble des résultats relatifs à l'étude comparative des concentrations en CLL polyclonales pour les patients sans GM (population A), selon que l'on utilise des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, sont rassemblés dans le tableau 8, dont il ressort que les concentrations κ et λ obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens) sont supérieures à celles obtenues avec les anticorps polyclonaux (TBS). En ce qui concerne le rapport $R_{\kappa/\lambda}$, il n'existe pas de différence significative entre les deux réactifs.

Globalement donc, les concentrations obtenues pour les CLL κ et λ polyclonales étant plus élevées avec les anticorps monoclonaux, on peut en conclure que ce réactif est parfaitement adapté aux pathologies associées à des élévations polyclonales des CLL, pathologies évoquées dans la revue bibliographique.

2.2.3. Etude de la population B avec GM

- Etude des concentrations κ

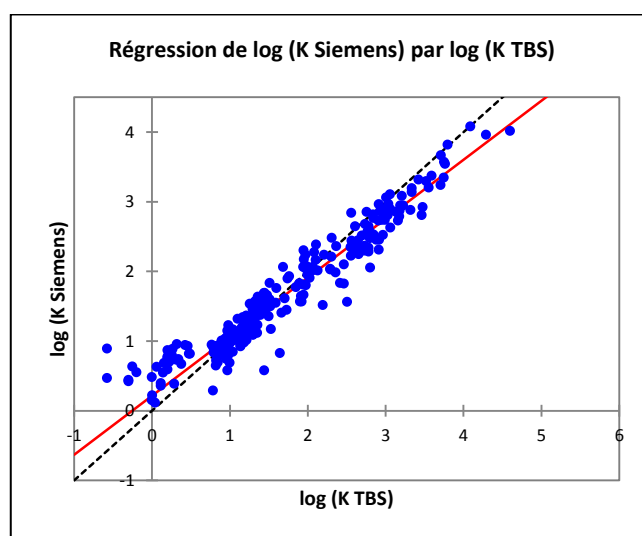


Figure 23 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $K_{Siemens}$ à K_{TBS}

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log K_{Siemens}$ et $\log K_{TBS}$ avec $N = 248$.

L'équation de la droite s'écrit : $\log K_{Siemens} = 0,847 \times \log K_{TBS} + 0,216$

$IC_{95\%}$ de la pente = $[0,818 ; 0,876]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine = $[0,166 ; 0,270]$

Coefficient de corrélation $r = 0,961$ ($R = 0,923$)

Bien que la corrélation entre les concentrations de CLL κ soit élevée ($r = 0,961$), les $IC_{95\%}$ de la pente et de l'ordonnée à l'origine, montrent qu'entre les résultats

obtenus avec les deux réactifs, il existe une différence proportionnelle et systématique. On note également, d'après l'équation de la droite de régression, que, pour toute valeur $K_{TBS} < 25,7$ mg/L (soit $\log K_{TBS} < 1,41$), les concentrations obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens) sont supérieures à celles obtenues avec les anticorps polyclonaux (TBS), et inversement, pour des concentrations supérieures à 25,7 mg/L.

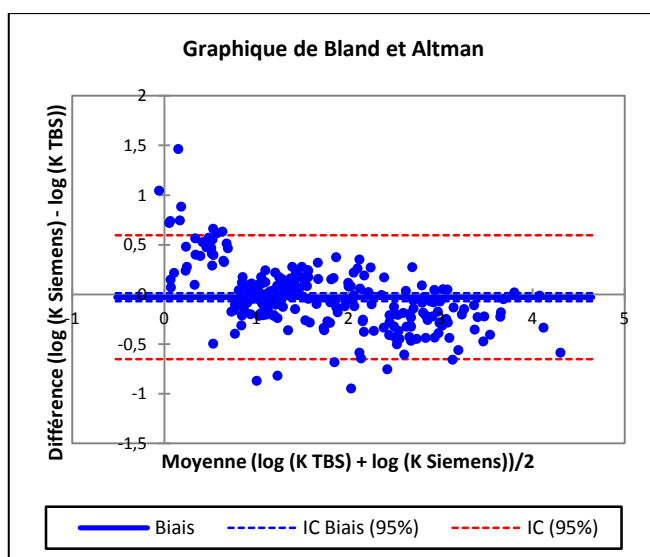


Figure 24 : Analyse de concordance entre $K_{Siemens}$ et K_{TBS} par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\log K_{Siemens} - \log K_{TBS} = -0,028$; dont $IC_{95\%} =]-0,068 ; 0,012[$

Ecart type des différences = 0,318 ; Limites d'agrément = $] -0,651 ; 0,595[$

L'analyse de concordance par la méthode de Bland-Altman montre qu'il existe un biais négatif (-0,028) mais non significatif (0 étant à l'intérieur de l'intervalle de confiance : -0,651 - 0,595). De plus, la définition des limites d'agrément (fig 24) montre que la différence entre les log des concentrations en CLLk pour 9 échantillons, de faible concentration en CLLk, se situe au-dessus de la limite d'agrément supérieure et que pour 6 autres, de concentration élevée en CLLk, elle se situe en-dessous de la limite d'agrément inférieure, soit une discordance de 6% entre les résultats obtenus avec ces réactifs.

$K_{TBS} \backslash K_{Siemens}$	$< 3,3 \text{ mg/L}$	$3,3 - 19,4 \text{ mg/L}$	$> 19,4 \text{ mg/L}$
$< 6,7 \text{ mg/L}$	26	11	2
$6,7 - 22,4 \text{ mg/L}$	6	58	11
$> 22,4 \text{ mg/L}$	0	2	132

Tableau 9 : Concordance entre les concentrations $K_{Siemens}$ et K_{TBS}

Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles de valeurs usuelles des concentrations obtenues avec les deux réactifs. La concordance calculée est de 87,1% (= 216/248)

Si l'on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 9), il apparaît que 32 échantillons sur 248 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance s'élevant donc à 2,9 %.

- Etude des concentrations λ

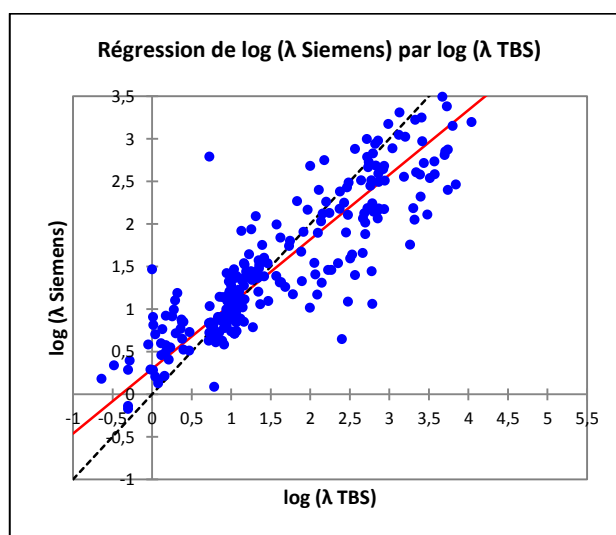


Figure 25 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{Siemens}$ à λ_{TBS}

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log \lambda_{Siemens}$ et $\log \lambda_{TBS}$ avec $N = 248$.

L'équation de la droite s'écrit : $\log \lambda_{Siemens} = 0,760 \times \log \lambda_{TBS} + 0,299$

IC_{95%} de la pente [0,712 ; 0,811], IC_{95%} de l'ordonnée à l'origine [0,233 ; 0,372]

Coefficient de corrélation $r = 0,878$ ($R = 0,771$).

Bien que la corrélation entre les concentrations de CLL λ soit élevée ($r=0,878$), elle est moins forte qu'avec les CLLk ($r=0,961$). De même que ce qui a été observé pour les CLLk, l'analyse des IC_{95%} de la pente et de l'ordonnée à l'origine montre

que pour les CLL λ , il existe aussi une différence proportionnelle et systématique entre les deux réactifs. On note également, d'après l'équation de la droite de régression, que pour toute valeur $\lambda_{TBS} < 17,8$ mg/L (soit $\log \lambda_{TBS} < 1,25$), les concentrations obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens) sont supérieures à celles obtenues avec les polyclonaux (TBS), et inversement, pour des concentrations supérieures à 17,8 mg/L.

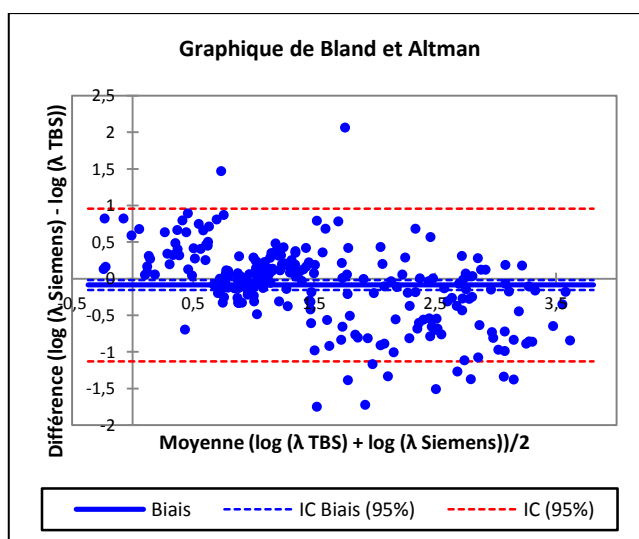


Figure 26 : Analyse de concordance entre $\lambda_{Siemens}$ et λ_{TBS} par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\log \lambda_{Siemens} - \log \lambda_{TBS} = -0,087$; dont $IC_{95\%} =]-0,153 ; -0,020[$

Ecart type des différences = 0,532 ; Limites d'agrément = $] -1,129 ; 0,955 [$

L'analyse de concordance par la méthode de Bland-Altman montre qu'il existe un biais négatif (-0,087) mais non significatif (0 étant à l'intérieur de l'intervalle de confiance : -0,153 à -0,020). Ainsi, les concentrations obtenues pour $\lambda_{Siemens}$ sont inférieures aux concentrations λ_{TBS} , et ce d'autant plus que la concentration en CLL λ_{TBS} est élevée. De plus, la définition des limites d'agrément (fig 26) montre que la différence entre les log des concentrations en CLL λ de 2 échantillons, de faible concentration en CLL λ , se situe au-dessus de la limite d'agrément supérieure et que pour 10 autres, de concentration élevée en CLL λ , elle se situe en-dessous de la limite d'agrément inférieure, soit une discordance de 4,8% entre les résultats obtenus avec ces réactifs. Cette discordance est observée essentiellement pour des concentrations élevées en λ , l'utilisation des anticorps polyclonaux (TBS) aboutissant alors à des concentrations bien supérieures à celles obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens).

$\lambda_{\text{Siemens}} \backslash \lambda_{\text{TBS}}$	< 5,7 mg/L	5,7 – 26,3 mg/L	> 26,3 mg/L
< 8,3 mg/L	39	30	1
8,3 – 27 mg/L	5	54	14
> 27 mg/L	2	14	89

Tableau 10 : Concordance entre les concentrations λ_{Siemens} et λ_{TBS}

Dans ce tableau, sont répartis les échantillons selon les intervalles de valeurs usuelles des concentrations obtenues pour les deux techniques. La concordance calculée est de 73,4% (= 182/248).

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 10), il apparaît que 66 échantillons sur 248 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance avec cette méthode d'analyse s'élevant donc à 26,6 %.

- Récapitulatif des résultats de la population B

	CLLκ	CLLλ
Population	N = 248	N = 248
Passing Bablok		
Equation	$\log(K_{\text{Siemens}}) = 0,847 \times \log(K_{\text{TBS}}) + 0,216$	$\log(\lambda_{\text{Siemens}}) = 0,760 \times \log(\lambda_{\text{TBS}}) + 0,299$
IC _{95%} pente	[0,818 ; 0,876]	[0,712 ; 0,811]
IC _{95%} ordonnée à l'origine	[0,166 ; 0,270]	[0,233 ; 0,372]
Corrélation		
Coefficient de corrélation	r = 0,961	r = 0,878
Coefficient de détermination	R = 0,923	R = 0,771
Bland-Altman		
Biais	-0,028	-0,087 Significativement négatif
IC _{95%} du biais]-0,068 ; 0,012[]-0,153 ; -0,020[
Concordance		
	87,1%	73,4%

Tableau 11 : Récapitulatif des résultats de la population B

De cette analyse globale, effectuée sans tenir compte du statut des CLL (monoclonales ou polyclonales) et résumée dans le tableau 11, se dégage une tendance certaine à observer des concentrations plus élevées de CLL avec les anticorps polyclonaux (TBS) qu'avec les anticorps monoclonaux (Siemens), alors que la conclusion inverse s'imposait pour la population strictement polyclonale

(population A). Qu'en est-il lorsque l'on limite l'étude aux CLLi des échantillons issus des patients atteints de dyscrasie plasmocytaire ? C'est ce qui va être étudié dans ce qui suit.

2.2.4. Etude de la population B1 (κ_i)

- Etude des concentrations κ_i

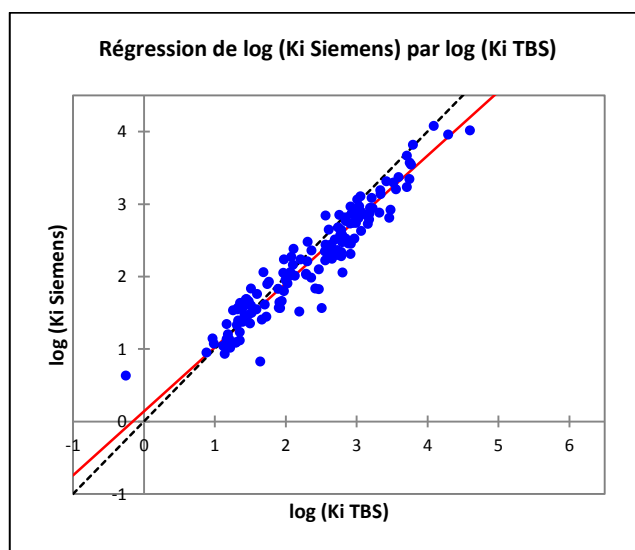


Figure 27 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $K_{i\text{ Siemens}}$ et $K_{i\text{ TBS}}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log K_{i\text{ Siemens}}$ et $\log K_{i\text{ TBS}}$ avec $N = 138$.

L'équation de la droite s'écrit : $\log K_{i\text{ Siemens}} = 0,883 \times \log K_{i\text{ TBS}} + 0,139$

$IC_{95\%}$ de la pente = $[0,837 ; 0,929]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine = $[0,027 ; 0,235]$

Coefficient de corrélation $r = 0,951$ ($R = 0,905$)

Bien que la corrélation entre les concentrations de CLLki soit élevée ($r=0,951$), les $IC_{95\%}$ de la pente et de l'ordonnée à l'origine, montrent qu'entre les résultats obtenus avec les deux réactifs, il existe une différence proportionnelle et systématique. On note également, d'après l'équation de la droite de régression, que pour toute valeur $\kappa_{TBS} < 15,5$ mg/L (soit $\log \kappa_{TBS} < 1,19$), les concentrations obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens) sont supérieures à celles obtenues avec les anticorps polyclonaux (TBS), et inversement, pour des concentrations supérieures à 15,5 mg/L, ce qui était également observé précédemment.

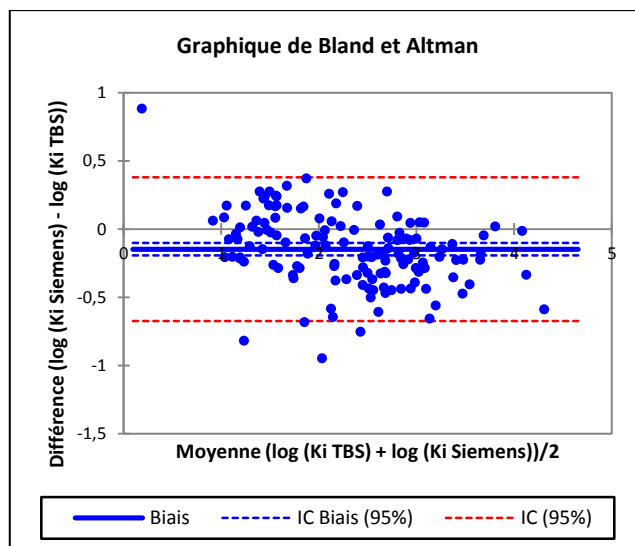


Figure 28 : Analyse de concordance entre $K_{i \text{ Siemens}}$ et $K_{i \text{ TBS}}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\log K_{i \text{ Siemens}} - \log K_{i \text{ TBS}} = -0,147$; dont IC $_{95\%} =]-0,192 ; -0,102[$

Ecart type des différences = $0,269$; Limites d'agrément = $] -0,674 ; 0,380[$

L'analyse de concordance, par la méthode de Bland-Altman, montre qu'il existe un biais négatif ($-0,147$) significatif (0 n'étant pas compris dans l'IC95% du biais) entre les concentrations mesurées par chacun des deux réactifs. Les concentrations en CLLki obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens) sont donc inférieures aux concentrations obtenues avec les anticorps polyclonaux (TBS). Ce qui n'était qu'une tendance, lorsque la monoclonalité des CLL n'était pas prise en compte, devient alors une réalité statistique significative avec la prise en considération de cette monoclonalité.

L'analyse du diagramme de Bland-Altman (fig 28) montre que la différence entre les log des concentrations en CLLki d'un seul échantillon, de faible concentration κ_i , se situe au-dessus de la limite d'agrément supérieure et que pour 4 autres, de concentration élevée en CLLki, elle se situe en-dessous de la limite d'agrément inférieure. Le pourcentage de discordance s'élève donc à 3,6%.

De ces observations, il résulte que les anticorps polyclonaux reconnaissent d'autant mieux les CLLk que leurs concentrations sont élevées. Or les concentrations élevées en CLLk s'observent dans les dyscrasies plasmocytaires malignes, d'où il découle que les anticorps polyclonaux (TBS) semblent avoir une

sensibilité plus grande dans la détection et la quantification des CLLk monoclonales que celle des anticorps monoclonaux (Siemens).

$K_{\text{Siemens}} \backslash K_{\text{TBS}}$	< 3,3 mg/L	3,3 – 19,4 mg/L	> 19,4 mg/L
< 6,7 mg/L	1	0	1
6,7 – 22,4 mg/L	0	10	6
> 22,4 mg/L	0	1	119

Tableau 12 : Tableau de concordance entre les concentrations $K_{i \text{ siemens}}$ et $K_{i \text{ TBS}}$
 Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles de valeurs usuelles des deux réactifs. La concordance calculée est de 94,2% (= 130/138).

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 12), il vient que 8 échantillons sur 138 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance s'élevant donc à 5,8 %.

- Etude des concentrations λ_{ni}

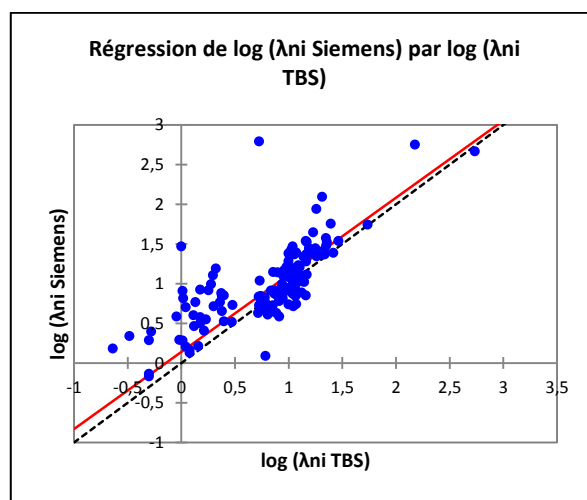


Figure 29 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{ni \text{ Siemens}}$ à $\lambda_{ni \text{ TBS}}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log \lambda_{ni \text{ Siemens}}$ et $\log \lambda_{ni \text{ TBS}}$ avec $N = 138$.

L'équation de la droite s'écrit : $\log \lambda_{ni \text{ Siemens}} = 0,971 \times \log \lambda_{ni \text{ TBS}} + 0,139$

$IC_{95\%}$ pour la pente [0,860 ; 1,110], pour l'ordonnée à l'origine [0,026 ; 0,262]

Coefficient de corrélation $r = 0,750$ ($R = 0,562$)

La corrélation mesurée entre les concentrations de CLL λ_{ni} apparaît modérée ($r=0,750$), 56% seulement des échantillons suivant l'équation de la droite de

régression. Les $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine et de la pente montrent qu'il existe une différence systématique, mais pas proportionnelle, entre les résultats obtenus avec les deux réactifs. On note également que théoriquement, d'après l'équation de la droite de régression, pour toute valeur de $\lambda_{ni} < 61\,659$ mg/L (soit $\log \lambda_{ni\,TBS} < 4,79$) les concentrations obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens) sont supérieures à celles obtenues avec les polyclonaux (TBS), et inversement, pour des concentrations supérieures. En d'autres termes, les anticorps monoclonaux (Siemens) ont une plus grande capacité à détecter les CLL λ polyclonales que ne l'ont les anticorps polyclonaux (TBS), ce qui se dégageait déjà des comparaisons précédentes et qui se confirment ici.

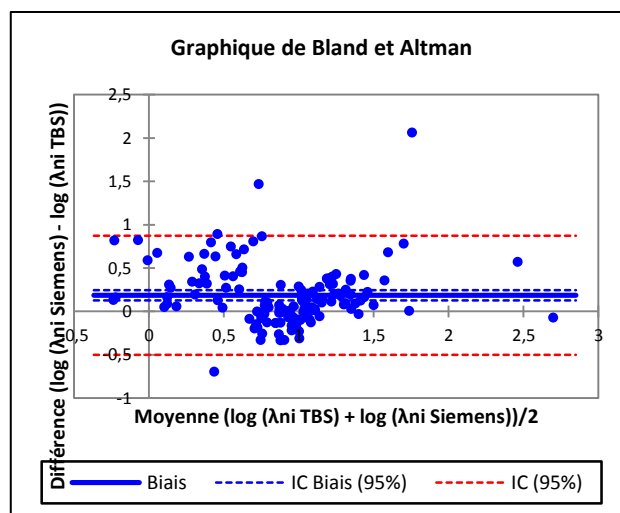


Figure 30 : Analyse de concordance entre $\lambda_{ni\,Siemens}$ et $\lambda_{ni\,TBS}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\log \lambda_{ni\,Siemens} - \log \lambda_{ni\,TBS} = 0,187$; dont $IC_{95\%} =]0,128 ; 0,246[$

Ecart type des différences = 0,35 ; Limites d'agrément = $] -0,499 ; 0,872 [$

L'analyse de concordance, par la méthode de Bland-Altman, montre qu'il existe un biais positif (0,187) et significatif (0 n'étant pas inclus dans l' $IC_{95\%}$ du biais) entre les concentrations mesurées par chacun des deux réactifs. Il existe donc une différence significative entre les deux réactifs, les concentrations en CLL λ_{ni} obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens) s'avérant supérieures aux concentrations obtenues avec les anticorps polyclonaux (TBS).

L'analyse du diagramme de Bland-Altman (fig 30) montre que la différence entre les log des concentrations en CLL λ_{ni} de deux échantillons, de faible concentration λ_{ni} , se situe au-dessus de la limite d'agrément supérieure et que pour un seul, de

concentration élevée en $\text{CLL}\lambda_{\text{ni}}$, elle se situe en-dessous de la limite d'agrément inférieure. Le pourcentage de discordances s'élève donc à 2,2%.

λ_{ni} Siemens \ λ_{ni} TBS	< 5,7 mg/L	5,7 – 26,3 mg/L	> 26,3 mg/L
< 8,3 mg/L	39	28	0
8,3 – 27 mg/L	5	47	1
> 27 mg/L	2	12	4

Tableau 13 : Tableau de concordance entre les concentrations λ_{ni} Siemens et λ_{ni} TBS
Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles de valeurs usuelles des deux réactifs. La concordance calculée est de 65,2% (= 90/138).

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 13), il vient que 48 échantillons sur 138 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance s'élevant donc à 34,8 %.

- Etude du rapport $R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni}}}$

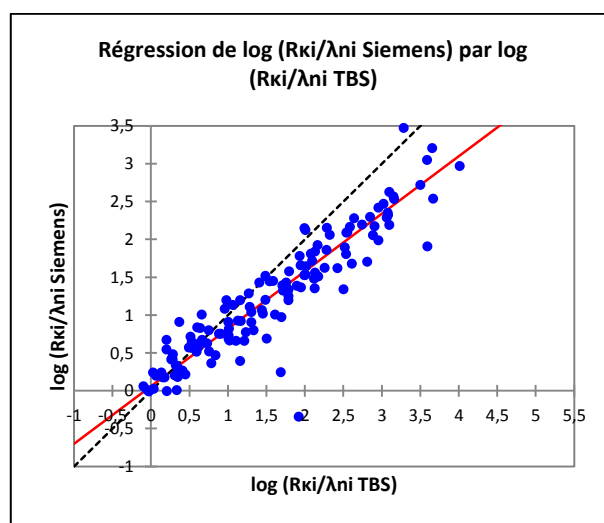


Figure 31 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour la comparaison entre $R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni}}}$ Siemens et $R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni}}}$ TBS

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni}}}$ Siemens et $\log R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni}}}$ TBS avec $N = 138$.

L'équation de la droite s'écrit : $\log R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni}}}$ Siemens = $0,760 \times \log R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni}}}$ TBS + $0,060$

$IC_{95\%}$ de la pente $[0,718 ; 0,802]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine $[0,012 ; 0,106]$

Coefficient de corrélation $r = 0,924$ ($R = 0,853$)

L'analyse comparative menée entre les rapports $R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni}}}$ Siemens et $R_{\text{ki}/\lambda_{\text{ni}}}$ TBS montre qu'il existe une forte corrélation entre eux ($r=0,924$), mais la prise en compte des

IC_{95%} de la pente et de l'ordonnée à l'origine indique qu'il existe une différence proportionnelle et systématique entre les résultats obtenus avec ces deux réactifs. On note également, d'après l'équation de la droite de régression, que, pour toute valeur $R_{ki/\lambda ni \text{ TBS}} < 1,78$ (soit $\log R_{ki/\lambda ni \text{ TBS}} < 0,25$), la valeur du rapport obtenu avec les anticorps monoclonaux (Siemens) est supérieure à celle obtenue avec les anticorps polyclonaux (TBS), et inversement pour $R_{ki/\lambda ni \text{ TBS}} > 1,78$.

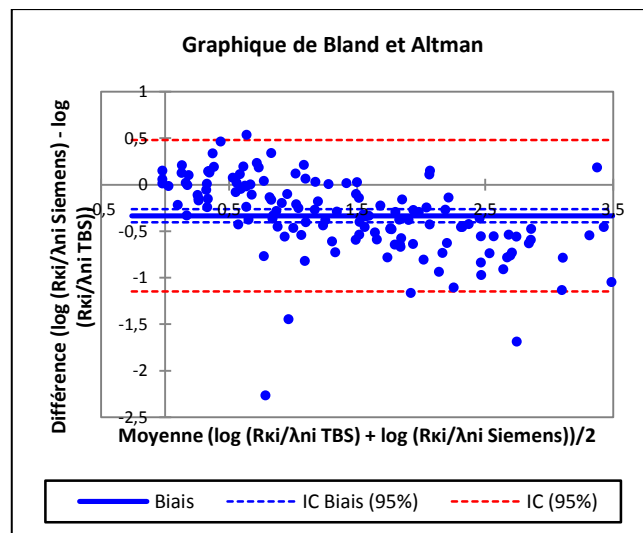


Figure 32 : Analyse de concordance entre $R_{ki/\lambda ni \text{ Siemens}}$ et $R_{ki/\lambda ni \text{ TBS}}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\log R_{ki/\lambda ni \text{ Siemens}} - \log R_{ki/\lambda ni \text{ TBS}} = -0,334$; dont $IC_{95\%} =]-0,404 ; -0,264[$

Ecart type des différences = 0,415 ; Limites d'agrément = $] -1,148 ; 0,480 [$

De l'analyse de concordance par la méthode de Bland-Altman, il ressort que la valeur 0 n'étant pas située à l'intérieur de l'intervalle de confiance du biais, il existe une différence significative (biais = -0,334) entre les deux rapports, les valeurs observées avec les anticorps polyclonaux (TBS) étant plus élevées qu'avec les anticorps monoclonaux (Siemens). L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 32) montre que la différence entre les log du rapport $R_{ki/\lambda ni}$ d'un seul échantillon, de rapport faible, est située au-dessus de la limite d'agrément supérieure et que pour 4 autres échantillons, de rapport élevé, elle se situe en-dessous de la limite d'agrément inférieure. Il apparaît ainsi que le pourcentage de discordances, pour ce paramètre, s'élève à 3,6%.

$R_{\kappa/\lambda \text{ TBS}} \backslash R_{\kappa/\lambda \text{ Siemens}}$	< 0,26	0,26 – 1,65	> 1,65
< 0,31	0	0	0
0,31 – 1,56	0	8	4
> 1,56	0	4	122

Tableau 14 : Tableau de concordance des rapports $R_{\kappa/\lambda \text{ ni Siemens}}$ et $R_{\kappa/\lambda \text{ ni TBS}}$

Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles des valeurs usuelles des rapports obtenus avec les deux réactifs. La concordance calculée est de 94,2% (= 130/138).

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 14), il vient que 8 échantillons sur 138 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance pour cette méthode s'élevant donc à 5,8 %.

- Récapitulatif des résultats de la population B1

	CLL κ_i	CLL λ_{ni}	$R_{\kappa/\lambda_{ni}}$
Population	N = 138	N = 138	N = 138
Passing Bablok			
Equation	$\log K_i \text{ Siemens} = 0,883 \times \log K_i \text{ TBS} + 0,139$	$\log \lambda_{ni} \text{ Siemens} = 0,971 \times \log \lambda_{ni} \text{ TBS} + 0,139$	$\log R_{\kappa/\lambda_{ni} \text{ Siemens}} = 0,760 \times \log R_{\kappa/\lambda_{ni} \text{ TBS}} + 0,060$
IC _{95%} pente IC _{95%} ordonnée à l'origine	[0,837 ; 0,929] [0,027 ; 0,235]	[0,860 ; 1,110] [0,026 ; 0,262]	[0,718 ; 0,802] [0,012 ; 0,106]
Corrélation			
Coefficient de corrélation	r = 0,951	r = 0,750	r = 0,924
Coefficient de détermination	R = 0,905	R = 0,562	R = 0,853
Bland-Altman			
Biais	-0,147 Significatif	0,187 Significatif	-0,334 Significatif
IC _{95%} du biais] -0,192 ; -0,102[] -0,128 ; 0,246[] -0,404 ; -0,264[
Concordance			
	94,2%	65,2%	94,2%

Tableau 15 : Récapitulatif des résultats de la population B1 avec GM

L'ensemble des résultats relatifs à la population avec GM et CLL κ_i sont rassemblés dans le tableau 15 qui rappelle que la sensibilité des anticorps polyclonaux pour les CLL monoclonales κ est plus grande que celle des anticorps

monoclonaux et qu'en revanche ces derniers ont une sensibilité plus adaptée aux CLL polyclonales λ .

2.2.5. Etude de la population B2 (λ_i)

- Etude des concentrations en CLL λ_i

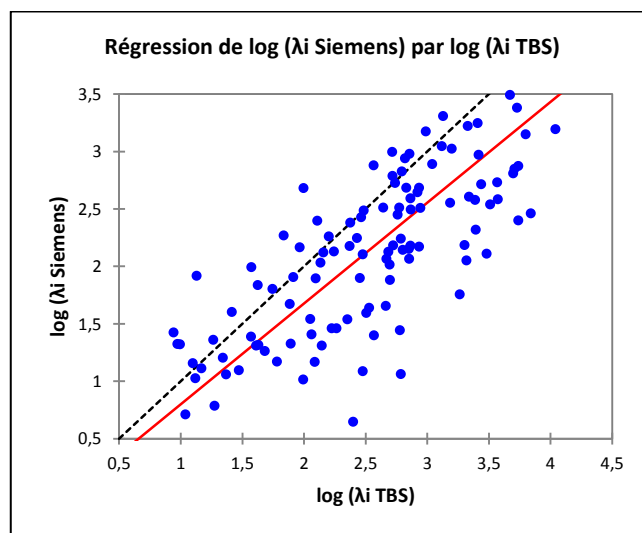


Figure 33 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{i \text{ Siemens}}$ à $\lambda_{i \text{ TBS}}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log \lambda_{i \text{ Siemens}}$ et $\log \lambda_{i \text{ TBS}}$ avec $N = 113$.

L'équation de la droite s'écrit : $\log \lambda_{i \text{ Siemens}} = 0,878 \times \log \lambda_{i \text{ TBS}} - 0,078$

$IC_{95\%}$ de la pente = $[0,765 ; 1,019]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine = $[-0,408 ; 0,173]$

Coefficient de corrélation $r = 0,748$ ($R = 0,560$)

Bien que la corrélation observée entre les concentrations des CLL λ_i soit bien plus faible qu'avec les CLL κ_i ($r=0,748$ vs $0,951$) et que moins de 60% des échantillons suivent l'équation de la droite de régression, les $IC_{95\%}$ de la pente et de l'ordonnée à l'origine montrent qu'il n'existe aucune différence significative entre les résultats obtenus avec les deux réactifs. On note également, d'après l'équation de la droite de régression, que, pour toute valeur théorique $\lambda_{i \text{ TBS}} < 0,23$ mg/L (soit $\log \lambda_{i \text{ TBS}} < -0,64$), les concentrations obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens) sont supérieures à celles obtenues avec les anticorps polyclonaux (TBS), et inversement pour les valeurs supérieures. En d'autres termes, les concentrations de CLL monoclonales de type λ , mesurées avec les anticorps polyclonaux (TBS),

sont toujours supérieures à celles mesurées avec les anticorps monoclonaux (Siemens).

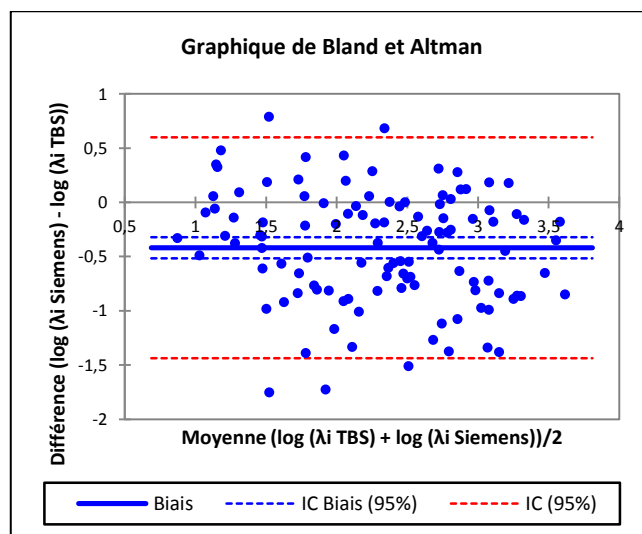


Figure 34 : Analyse de concordance entre $\lambda_{i \text{ Siemens}}$ et $\lambda_{i \text{ TBS}}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\log \lambda_{i \text{ Siemens}} - \log \lambda_{i \text{ TBS}} = -0,419$; dont $IC_{95\%} =]-0,516 ; -0,323[$

Ecart type des différences = 0,519 ; Limites d'agrément = $] -1,437 ; 0,599[$

De l'analyse de concordance par la méthode de Bland-Altman, il ressort qu'il existe un biais (-0,419) significatif (0 situé en dehors de l'intervalle de confiance) entre les deux concentrations, les valeurs observées avec les anticorps polyclonaux (TBS) étant plus élevées qu'avec les anticorps monoclonaux (Siemens). L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 34) montrant que pour 2 échantillons la différence entre les log des concentrations en CLL λ_i est située au-dessus de la limite d'agrément supérieure et que pour 3 échantillons elle est située en-dessous de la limite d'agrément inférieure : il vient donc que le pourcentage de discordances pour les CLL λ_i s'élève à 4,4%.

$\lambda_{\text{Siemens}} \backslash \lambda_{\text{TBS}}$	< 5,7 mg/L	5,7 – 26,3 mg/L	> 26,3 mg/L
< 8,3 mg/L	0	2	1
8,3 – 27 mg/L	0	9	14
> 27 mg/L	0	2	85

Tableau 16 : Tableau de concordance entre les concentrations $\lambda_{i \text{ siemens}}$ et $\lambda_{i \text{ TBS}}$

Dans ce tableau, sont répartis les échantillons suivant les intervalles des valeurs usuelles obtenus avec les deux réactifs. La concordance calculée est de 83,2% (= 94/113).

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 16), il apparaît que 19 échantillons sur 113 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance s'élevant donc à 16,8 %.

- Etude des concentrations K_{ni}

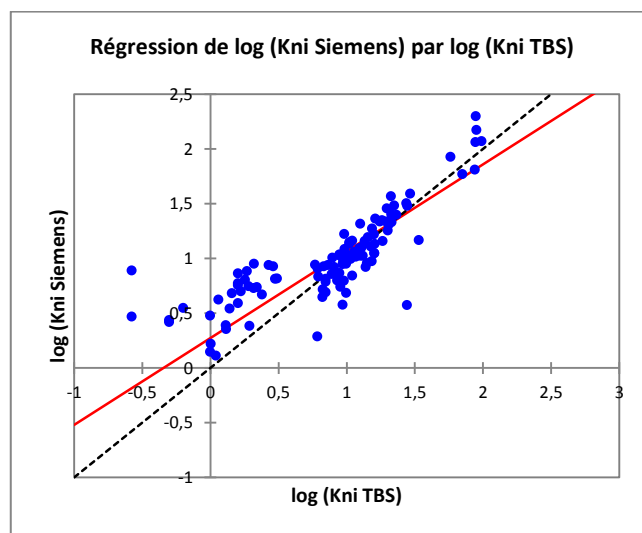


Figure 35 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour la comparaison de $K_{ni\ Siemens}$ et $K_{ni\ TBS}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log K_{ni\ Siemens}$ et $\log K_{ni\ TBS}$ avec $N = 113$.

L'équation de la droite s'écrit : $\log K_{ni\ Siemens} = 0,793 \times \log K_{ni\ TBS} + 0,274$

$IC_{95\%}$ de la pente = $[0,684 ; 0,901]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine = $[0,170 ; 0,391]$

Coefficient de corrélation $r = 0,826$ ($R = 0,682$)

La corrélation mesurée entre les concentrations de $CLL_{K_{ni}}$ apparaît plus élevée qu'avec les $CLL_{\lambda_{ni}}$ ($r=0,826$ vs $0,750$). L'observation des $IC_{95\%}$ de la pente et de l'ordonnée à l'origine, montrent qu'entre les résultats obtenus avec les deux réactifs, il existe une différence systématique et proportionnelle. On note également que, théoriquement, d'après l'équation de la droite de régression, pour toute valeur de $K_{ni\ TBS} < 20,9$ mg/L, soit ($\log K_{ni\ TBS} < 1,32$), les concentrations obtenues avec les anticorps monoclonaux (Siemens) sont supérieures à celles obtenues avec les polyclonaux (TBS), et inversement pour des concentrations supérieures. En d'autres termes, les anticorps monoclonaux (Siemens) ont une plus grande capacité à détecter les CLLk polyclonales que les anticorps

polyclonaux (TBS), ce qui se dégagait déjà des comparaisons précédentes et qui se retrouvent ici.

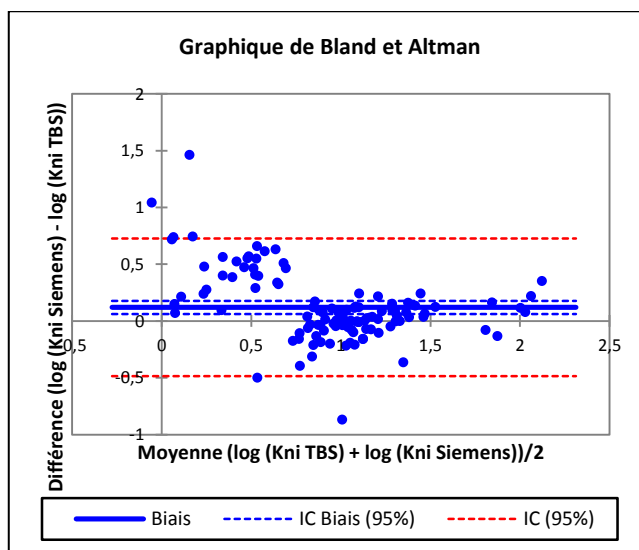


Figure 36 : Analyse de concordance entre $K_{ni\ Siemens}$ et $K_{ni\ TBS}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\log K_{ni\ Siemens} - \log K_{ni\ TBS} = 0,12$; dont IC $_{95\%} =] 0,063 ; 0,178[$

Ecart type des différences = 0,309 ; Limites d'agrément = $] -0,485 ; 0,726[$

De l'analyse de concordance par la méthode de Bland-Altman, il ressort qu'il existe une différence significative (biais=0,12) entre les deux concentrations (0 situé en dehors de l'intervalle de confiance du biais), les valeurs observées avec les anticorps polyclonaux (TBS) étant plus faibles qu'avec les monoclonaux (Siemens). On peut donc en conclure, ici aussi, que les anticorps monoclonaux détectent mieux les CLLk polyclonales que ne le font les anticorps polyclonaux. L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 36) montre que la différence entre les log des concentrations en CLL $_{k_{ni}}$ de 4 échantillons se situe au-dessus de la limite supérieure d'agrément et que pour 2 échantillons, elle se situe en dessous de la limite inférieure : il en découle que le pourcentage de discordances pour K_{ni} s'élève à 5,3%.

$K_{ni\ TBS}$ \ $K_{ni\ Siemens}$	< 3,3 mg/L	3,3 – 19,4 mg/L	> 19,4 mg/L
< 6,7 mg/L	25	11	1
6,7 – 22,4 mg/L	6	49	5
>22,4 mg/L	0	1	15

Tableau 17 : Tableau de concordance entre les concentrations $K_{ni\ siemens}$ et $K_{ni\ TBS}$

Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles de valeurs usuelles des concentrations des deux réactifs. La concordance calculée est de 78,8 % (= 89/113).

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 17), il vient que 24 échantillons sur 113 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance s'élevant donc à 21,2 %.

- Etude du rapport $R_{kni/\lambda i}$

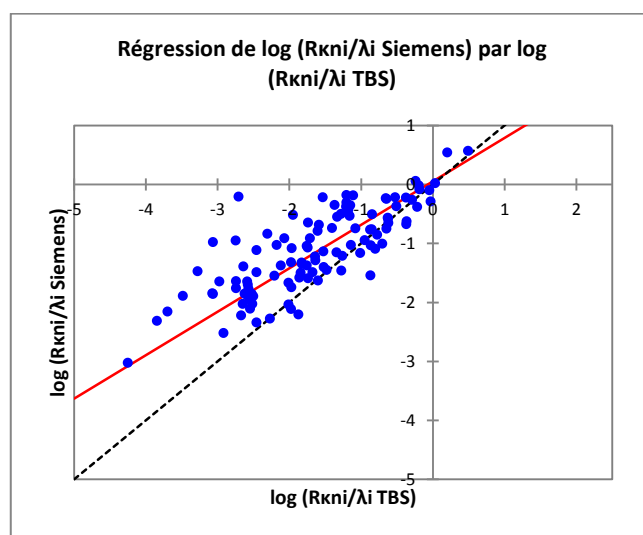


Figure 37 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de

Passing-Bablok pour comparer $R_{kni/\lambda i\ Siemens}$ à $R_{kni/\lambda i\ TBS}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\log R_{kni/\lambda i\ Siemens}$ et $\log R_{kni/\lambda i\ TBS}$ avec $N = 113$.

L'équation de la droite s'écrit : $\log R_{kni/\lambda i\ Siemens} = 0,737 \times \log R_{kni/\lambda i\ TBS} + 0,052$

$IC_{95\%}$ de la pente $[0,649 ; 0,834]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine $[-0,070 ; 0,194]$

Coefficient de corrélation $r = 0,801$ ($R = 0,642$)

L'analyse comparative menée entre les rapports $R_{kni/\lambda i\ Siemens}$ et $R_{kni/\lambda i\ TBS}$, montre qu'il existe entre eux une corrélation moins forte que dans le cas des GM de type κ ($r=0,801$ vs $0,924$) et que moins de 65% des échantillons suivent

l'équation de la droite de régression. La prise en compte des $IC_{95\%}$ de la pente et de l'ordonnée à l'origine indique qu'il existe une différence proportionnelle mais pas systématique entre les résultats obtenus avec ces deux réactifs. On note également, d'après l'équation de la droite de régression que pour toute valeur $R_{kni/\lambda_i \text{ TBS}} < 1,58$ (soit $\log R_{kni/\lambda_i \text{ TBS}} < 0,20$), la valeur du rapport obtenu avec les anticorps monoclonaux (Siemens) est supérieure à celle obtenue avec les polyclonaux (TBS), et inversement pour $R_{kni/\lambda_i \text{ TBS}} > 1,58$.

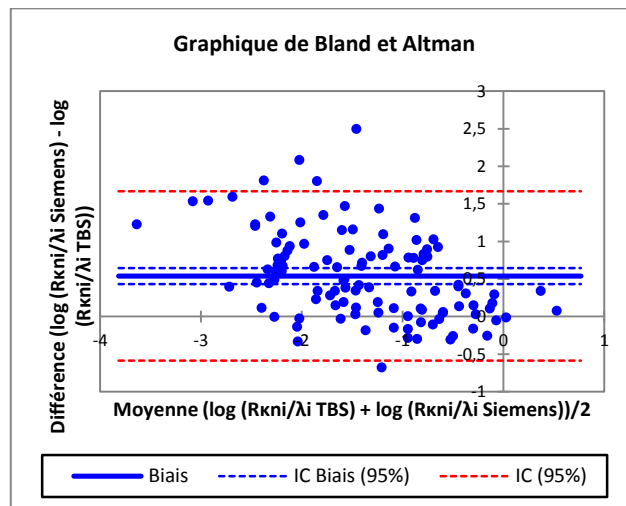


Figure 38 : Analyse de concordance entre $R_{kni/\lambda_i \text{ TBS}}$ et $R_{kni/\lambda_i \text{ Siemens}}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\log R_{kni/\lambda_i \text{ Siemens}} - \log R_{kni/\lambda_i \text{ TBS}} = 0,54$; dont $IC_{95\%} =]0,433 ; 0,647[$

Ecart type des différences = 0,575 ; Limites d'agrément = $] -0,586 ; 1,666 [$

De l'analyse de concordance par la méthode de Bland-Altman, il ressort qu'il existe un biais positif (biais=0,54) significatif (0 en dehors de l'intervalle de confiance). Les valeurs de R_{kni/λ_i} observées avec les anticorps monoclonaux (Siemens) sont donc plus élevées qu'avec les anticorps polyclonaux (TBS), ce qui s'explique par le fait que les anticorps polyclonaux détectent mieux les CLLA monoclonales. L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 38) montrant que la différence entre les log du rapport R_{kni/λ_i} de 5 échantillons est située en dehors des limites d'agrément, le pourcentage de discordances, pour ce paramètre, s'élève donc à 4,4%.

$R_{K/\Lambda}$ TBS $R_{K/\Lambda}$ Siemens	< 0,26	0,26 – 1,65	> 1,65
< 0,31	85	2	0
0,31 – 1,56	13	11	0
> 1,56	0	1	1

Tableau 18 : Tableau de concordance des rapports R_{Kni/Λ_i} Siemens et R_{Kni/Λ_i} TBS

Dans ce tableau, sont répartis les échantillons suivant les intervalles des valeurs usuelles des rapports obtenus avec les deux techniques. La concordance calculée est de 85,8% (= 97/113).

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 18), il vient que 16 échantillons sur 113 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance s'élevant donc à 14,2 %.

- Récapitulatif des résultats de la population B2

	CLL Λ_i	CLL K_{ni}	R_{Kni/Λ_i}
Population	N = 113	N = 113	N = 113
Passing Bablok			
Equation	$\log \lambda_i \text{ Siemens} = 0,878 \times \log \lambda_i \text{ TBS} - 0,078$	$\log K_{ni} \text{ Siemens} = 0,793 \times \log K_{ni} \text{ TBS} + 0,274$	$\log R_{Kni/\Lambda_i} \text{ Siemens} = 0,737 \times \log R_{Kni/\Lambda_i} \text{ TBS} + 0,052$
IC _{95%} pente IC _{95%} ordonnée à l'origine	[0,765 ; 1,019] [-0,408 ; 0,173]	[0,684 ; 0,901] [0,170 ; 0,391]	[0,649 ; 0,834] [-0,070 ; 0,194]
Corrélation			
Coefficient de corrélation	r = 0,748	r = 0,826	r = 0,801
Coefficient de détermination	R = 0,560	R = 0,682	R = 0,642
Bland-Altman			
Biais	-0,419 Significativement négatif	0,12 Significativement positif	0,54 Significativement positif
IC _{95%} du biais] -0,516 ; -0,323[] 0,063 ; 0,178[] 0,433 ; 0,647[
Concordance			
	83,2%	78,8%	85,8%

Tableau 19 : Récapitulatif des résultats de la population B2

Le tableau 19 récapitule l'ensemble des résultats obtenus pour l'étude de la population avec GM de CLL Λ . La corrélation relativement faible observée entre les

concentrations en CLL λ i conforte l'hypothèse d'une reconnaissance moindre des CLL monoclonales λ par les anticorps monoclonaux.

2.2.6. Discussion

Tous les résultats obtenus montrent que les deux types d'anticorps reconnaissent différemment les CLL, selon qu'elles sont issues d'une prolifération monoclonale ou polyclonale.

Dans tous les cas de synthèses polyclonales de CLL (CLL λ i pour une GM ou CLL polyclonales en l'absence de GM), les concentrations observées avec les anticorps monoclonaux (Siemens) sont toujours supérieures à celles mesurées avec les anticorps polyclonaux (TBS).

En ce qui concerne l'étude globale, donc indépendamment de la nature des CLL, il existe une bonne corrélation entre les concentrations obtenues avec les deux réactifs ($r = 0,96$ pour κ et $r = 0,874$ pour λ). Il a cependant été mis en évidence qu'il existait une différence systématique et proportionnelle entre les résultats obtenus avec les deux réactifs et que le niveau de concordance n'était que de 86,9% pour les CLL κ et de 72,8% pour les CLL λ . Lorsque la comparaison s'adresse aux CLLi issues de la population avec GM, on observe une concordance plus élevée que dans l'étude globale et également plus élevée pour κ i que pour λ i (94,2% vs 83,2 %). Dans cette population avec GM, quelle que soit la CLLi, les concentrations observées avec les anticorps polyclonaux (TBS) sont toujours supérieures à celles mesurées avec les anticorps monoclonaux (Siemens).

La complexité structurale des chaînes légères libres polyclonales, amplifiée lors d'une production monoclonale, permet d'expliquer en partie les différences existant entre les niveaux de réponse de ces deux réactifs. En effet, on rappelle que les CLL polyclonales κ sériques sont constituées de 50% de monomères, 25% de dimères issus d'une liaison covalente entre deux monomères et de 25% de dimères issus d'une liaison faible entre deux monomères. Dans cette configuration, les anticorps monoclonaux reconnaissant plus de CLL κ que les anticorps polyclonaux, on peut penser que les anticorps monoclonaux reconnaissent préférentiellement les CLL κ polyclonales sous forme de

monomères qui s'élèvent à plus de 50%, 25% des dimères pouvant se dissocier en monomères, et les anticorps polyclonaux vont reconnaître préférentiellement les polymères des CLL κ polyclonales, qui sont entre 25 et 50%. En revanche, cet argument ne s'applique pas aux CLL polyclonales λ dont 34% sont sous forme de monomères, 14% sous forme de dimères dissociables et 52% sous forme de dimères indissociables, dont la prédominance justifierait une meilleure reconnaissance par les anticorps polyclonaux. Or, ce n'est pas le cas car les résultats issus de l'étude portant sur une population sans GM montrent que c'est encore avec les anticorps monoclonaux que sont obtenues les concentrations en CLL λ les plus élevées. L'origine de cette différence reste donc à démontrer.

Concernant les dyscrasies plasmocytaires telles que le MM ou l'AAL, on sait que l'indice de polymérisation des CLLi est toujours supérieur à 5 et peut même être supérieur à 20 mais est, dans tous les cas, patient dépendant. Cette hétérogénéité structurale des CLL monoclonales explique parfaitement la différence importante, systématique et concentration dépendante, observée au niveau des concentrations obtenues par les anticorps monoclonaux et polyclonaux. Il est en effet probable que les épitopes sélectionnés lors de la production des anticorps monoclonaux (Siemens) soient complètement ou partiellement masqués dans les formes polymériques, rencontrées lors de dyscrasies plasmocytaires, entraînant ainsi une sous-estimation de la concentration en CLL monoclonales, le corollaire étant le comportement multiantigénique de ces CLL, à l'origine d'une surestimation relative de leur concentration par les anticorps polyclonaux.

La question qui se pose au terme de cette première étude comparative, c'est de savoir si ces différences observées ont un retentissement au niveau du suivi d'un patient, sachant en effet qu'une concentration mesurée à un temps donné ne prend tout son sens que par rapport à une valeur antérieure ou postérieure dans le cas d'une maladie chronique. C'est ce que nous verrons dans l'un des chapitres suivants.

2.3. Comparaison entre les résultats obtenus par turbidimétrie (SPAplus®) et néphélométrie (BN ProSpec®) avec les anticorps polyclonaux Freelite® (TBS).

2.3.1. Etude de la population 2

On rappelle que cette population 2 est constituée de 101 échantillons issus de 27 patients, tous atteints de myélome en phase active. Comme précédemment, une comparaison globale, sans tenir compte de la CLLi, va d'abord être réalisée, puis sera prise en compte, dans les comparaisons suivantes la nature des CLL, impliquées et non impliquées.

- **Etude des concentrations K_T**

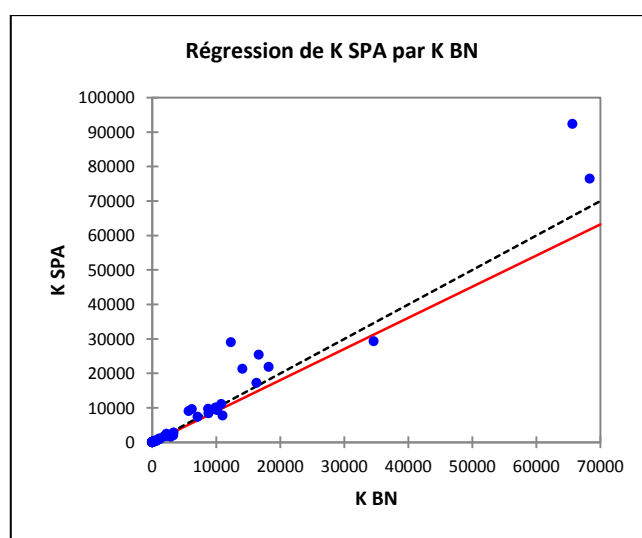


Figure 39 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour la comparaison entre $K_{turb(SPA)}$ et $K_{neph(BN)}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $K_{turb(SPA)}$ et $K_{neph(BN)}$ avec $N=101$.

L'équation de la droite de régression s'écrit : $K_{SPA} = 0,904 \times K_{BN} - 0,323$

$IC_{95\%}$ de la pente = $[0,827 ; 0,931]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine = $[-0,574 ; -0,034]$

Coefficient de corrélation $r = 0,979$ ($R = 0,959$)

Bien que la corrélation entre les concentrations de K_{SPA} et K_{BN} soit élevée ($r=0,979$), l'analyse des $IC_{95\%}$ de la pente et de l'ordonnée à l'origine montre qu'il existe une différence proportionnelle et systématique entre les résultats obtenus avec les deux méthodes. On note également, d'après l'équation de la droite de régression, que les concentrations des CLLk obtenues par la méthode

néphélométrique, sont très légèrement supérieures à celles issues de la méthode turbidimétrique.

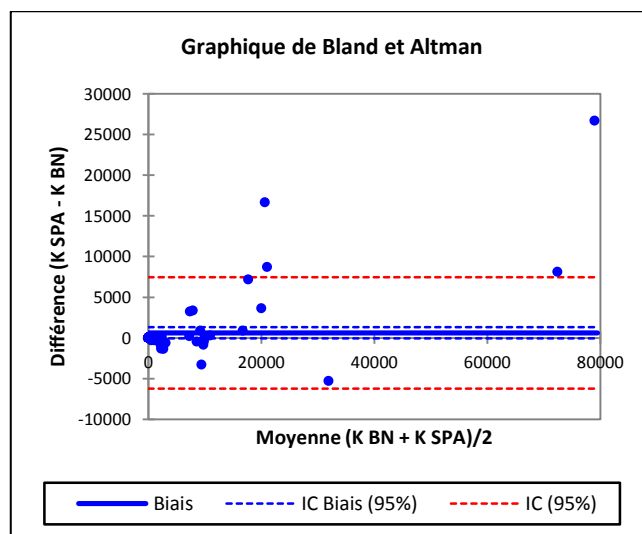


Figure 40 : Analyse de concordance entre $K_{turb(SPA)}$ et $K_{neph(BN)}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $K_{SPA} - K_{BN} = 618,317$; dont IC $_{95\%} =]-72,627 ; 1309,260[$

Ecart type des différences = 3500 ; Limites d'agrément $=]-6241,554 ; 7478,188[$

De l'analyse de concordance par la méthode de Bland-Altman, il ressort qu'il existe un biais de 618 mg/L, mais que celui-ci n'est pas significatif, puisque 0 est situé à l'intérieur de son intervalle de confiance. L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 40) montrant que la différence des concentrations pour 4 échantillons, de concentrations en CLLk élevées, est située au-dessus de la limite d'agrément supérieure, il vient que pour les CLLk, il y a 4% de discordances.

Bien que l'existence d'un biais positif ne soit pas statistiquement significative, elle montre malgré tout que les concentrations obtenues en turbidimétrie ont tendance à être supérieures à celles obtenues en néphélométrie (BN), ce qui n'est pas en adéquation avec ce qui a été déduit de la méthode de Passing-Bablok. Cela peut s'expliquer par le fait que pour des concentrations κ très élevées en néphélométrie (BN), on observe des concentrations encore bien plus élevées en turbidimétrie (SPA), ce qui tend à surestimer le biais. La population 2 comprenant des CLLi de très fortes concentrations et des CLLni de faibles concentrations, cette comparaison est biaisée : une étude séparant les CLLi des CLLni s'impose pour étudier ce type de population.

$K_{SPA} \backslash K_{BN}$	< 3,3 mg/L	3,3 – 19,4 mg/L	> 19,4 mg/L
< 3,3 mg/L	24	12	0
3,3 – 19,4 mg/L	3	13	1
> 19,4 mg/L	0	1	47

Tableau 20 : Concordance entre les concentrations $K_{turb(SPA)}$ et $K_{neph(BN)}$

Dans ce tableau, sont répartis les échantillons suivant les intervalles des valeurs usuelles des concentrations obtenues pour les deux méthodes. La concordance calculée est de 83,2% (= 84/101)

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre au réactif utilisé (tableau 20), il apparaît que 17 échantillons sur 101 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance s'élevant donc à 16,8 %. Celle-ci est à pondérer car la discordance n'est pas significative : sur les 17 échantillons, 16 d'entre eux présentent une valeur absolue de différence $K_{BN} - K_{SPA} < 9$ mg/L.

- Etude des concentrations λ_T

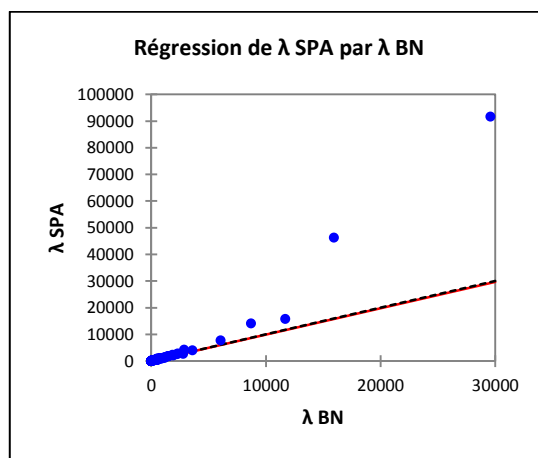


Figure 41 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{turb(SPA)}$ à $\lambda_{neph(BN)}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\lambda_{turb(SPA)}$ et $\lambda_{neph(BN)}$ avec $N = 101$.

L'équation de la droite s'écrit : $\lambda_{SPA} = 0,991 \times \lambda_{BN} - 3,461$

IC_{95%} de la pente [0,932 ; 1,099], IC_{95%} de l'ordonnée à l'origine [-4,655 ; -0,484]

Coefficient de corrélation $r = 0,968$ ($R = 0,938$)

Bien qu'un peu moins élevée que pour les CLLk ($r=0,968$ vs 0,979), il existe une forte corrélation entre les deux méthodes. L'interprétation des IC_{95%} de l'ordonnée

à l'origine et de la pente montre qu'il existe une différence systématique mais pas proportionnelle entre les deux méthodes.

On note également que d'après l'équation de la droite de régression les concentrations λ_T obtenues par la méthode néphélométrique (BN), sont très légèrement supérieures à celles issues de la méthode turbidimétrique (SPA).

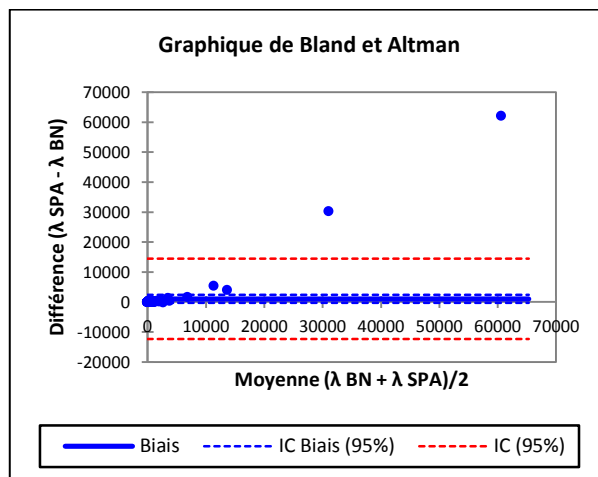


Figure 42 : Analyse de concordance entre $\lambda_{turb(SPA)}$ et $\lambda_{neph(BN)}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\lambda_{SPA} - \lambda_{BN} = 1053$; dont $IC_{95\%} = [-299, 2406]$

Ecart type des différences = 6853 ; Limites d'agrément = $[-12378, 14485]$

De l'analyse de concordance par la méthode graphique de Bland-Altman il ressort qu'il existe un biais positif de 1053 mg/L mais non significatif (0 situé à l'intérieur de l'intervalle de confiance). L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 42) montrant que la différence de concentration pour 2 échantillons est située au-dessus de la limite d'agrément supérieure, il vient que le pourcentage de discordances, pour les CLL λ , s'élève à 2,0%.

Bien que non significatif, l'existence d'un biais positif montre que les concentrations λ obtenues avec la turbidimétrie (SPA) ont tendance à être plus élevées que celles obtenues en néphélométrie (BN), ce qui est contraire aux conclusions tirées de la méthode de Passing-Bablok. Comme pour les CLL κ , cela peut résulter probablement du fait que, pour des concentrations néphélométriques λ élevées, on obtient des concentrations encore plus élevées en turbidimétrie, d'où une surestimation du biais. Cette population 2 est constituée d'échantillons à

très fortes concentrations en CLLi et d'échantillons à très faibles concentrations en CLLni, cette hétérogénéité extrême fausse les résultats.

$\lambda_{T SPA} \backslash \lambda_{T BN}$	< 5,7 mg/L	5,7 – 26,3 mg/L	> 26,3 mg/L
< 5,7 mg/L	20	12	0
5,7 – 26,3 mg/L	0	12	1
> 26,3 mg/L	0	0	56

Tableau 21 : Concordance entre les concentrations $\lambda_{turb(SPA)}$ et $\lambda_{neph(BN)}$

Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles des valeurs usuelles des concentrations obtenues pour les deux méthodes. La concordance calculée est de 87,1% (= 88/101).

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre à chaque réactif (tableau 21), il apparaît que 13 échantillons sur 101 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance s'élevant donc à 12,9 %. Celle-ci est à pondérer et n'apparaît vraisemblablement pas significative car, sur les 13 échantillons, 12 présentent une valeur absolue de différence $\lambda_{BN} - \lambda_{SPA} < 9$ mg/L.

- Récapitulatif des résultats de la population 2

	CLLk	CLLλ
Population	N = 101	N = 101
Passing Bablok		
Equation	$K_{SPA} = 0,904 \times K_{TBS} - 0,323$	$\lambda_{SPA} = 0,991 \times \lambda_{BN} - 3,461$
IC _{95%} pente IC _{95%} ordonnée à l'origine	[0,827 ; 0,931] [-0,574 ; -0,034]	[0,932 ; 1,099] [-4,655 ; -0,484]
Corrélation		
Coefficient de corrélation	r = 0,979	r = 0,968
Coefficient de détermination	R = 0,959	R = 0,938
Bland-Altman		
Biais	618,317	1053
IC _{95%} du biais]-72,627 ; 1309,260[]-299,455 ; 2406,308[
Concordance		
	83,2%	87,1%

Tableau 22 : Récapitulatif des résultats de la population 2

Le tableau 22 rassemble les résultats relatifs à la comparaison entre les concentrations de CLL indépendamment de leur statut (monoclonal ou polyclonal) en fonction de la méthode d'analyse. L'association d'une corrélation élevée et une concordance moyenne peut sans doute s'expliquer par l'hétérogénéité des concentrations, élevées ou très élevée pour les CLLi et basses ou très basses pour les CLLni. Il apparaît donc nécessaire d'analyser indépendamment les CLLi et les CLLni. C'est ce que se proposent les comparaisons suivantes.

2.3.2. Etude de la population C1 (k_i)

On rappelle que cette population C1 est constituée de 46 échantillons issus de 14 patients, tous atteints de myélome en phase active.

- Etude des concentrations K_i

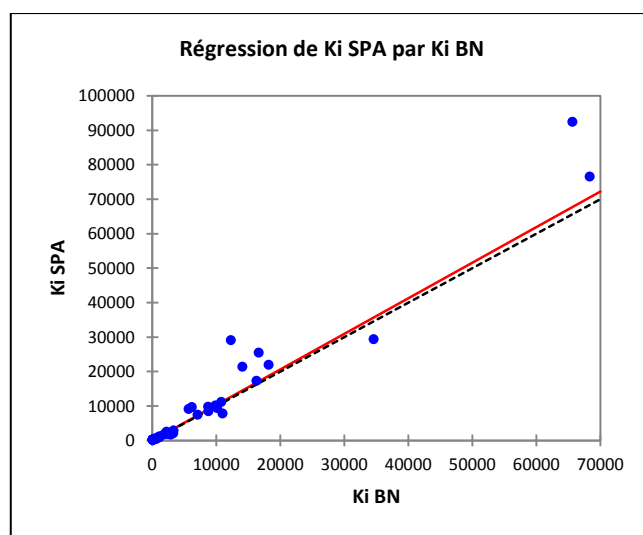


Figure 43 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $K_{i\ turb(SPA)}$ à $K_{i\ neph(BN)}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $K_{i\ turb(SPA)}$ et $K_{i\ neph(BN)}$ avec $N = 46$.

L'équation de la droite de régression s'écrit : $K_{i\ SPA} = 1,033 \times K_{i\ BN} - 63,243$

$IC_{95\%}$ de la pente = $[0,958 ; 1,107]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine = $[-221,504 ; -31,328]$

Coefficient de corrélation $r = 0,976$ ($R = 0,953$)

Bien que la corrélation entre les concentrations de $CLLk_i$ soit élevée ($r = 0,976$), l' $IC_{95\%}$ de la pente et de l'ordonnée à l'origine montre qu'il existe une différence systématique et une absence de différence proportionnelle entre les résultats obtenus avec les deux méthodes. On note également, d'après l'équation de la

droite de régression, que pour toute valeur $K_{i\text{ neph(BN)}} < 1916 \text{ mg/L}$, les concentrations obtenues avec la méthode néphélométrique (BN) sont supérieures à celles obtenues en turbidimétrie (SPA), et inversement, pour des concentrations supérieures à 1916 mg/L.

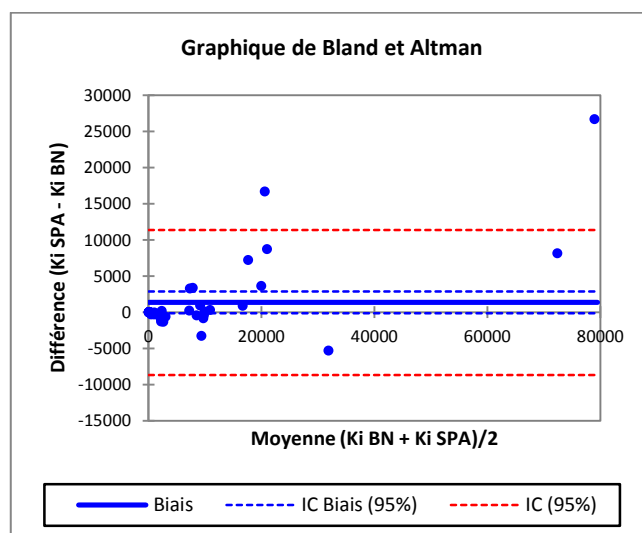


Figure 44 : Analyse de concordance entre $K_{i\text{ turb(SPA)}}$ et $K_{i\text{ neph(BN)}}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $K_{i\text{ SPA}} - K_{i\text{ BN}} = 1360$; dont $IC_{95\%} = [-159,821 ; 2879,656]$

Ecart type des différences = 5118 ; Limites d'agrément $= [-8670,386 ; 11390,221]$

De l'analyse de concordance par la méthode graphique de Bland-Altman, il ressort qu'il existe un biais positif (1360) statistiquement non significatif (0 étant situé à l'intérieur de l'intervalle de confiance). L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 44) montre que pour 2 échantillons, les différences de concentration sont situées au-delà de la limite d'agrément supérieure : il vient donc que le pourcentage de discordances pour les CLLki s'élève à 4,3%.

$K_{i\text{ SPA}} \backslash K_{i\text{ BN}}$	< 3,3 mg/L	3,3 – 19,4 mg/L	> 19,4 mg/L
< 3,3 mg/L	0	0	0
3,3 – 19,4 mg/L	0	0	0
>19,4 mg/L	0	0	46

Tableau 23 : Tableau de concordance entre les concentrations $K_{i\text{ turb(SPA)}}$ et $K_{i\text{ neph(BN)}}$

Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles des valeurs usuelles des concentrations obtenus pour les deux méthodes. La concordance calculée est de 100%.

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre au réactif utilisé (tableau 23), il apparaît que tous les échantillons appartiennent au même groupe, la concordance s'élevant donc à 100%.

- Etude des concentrations λ_{ni}

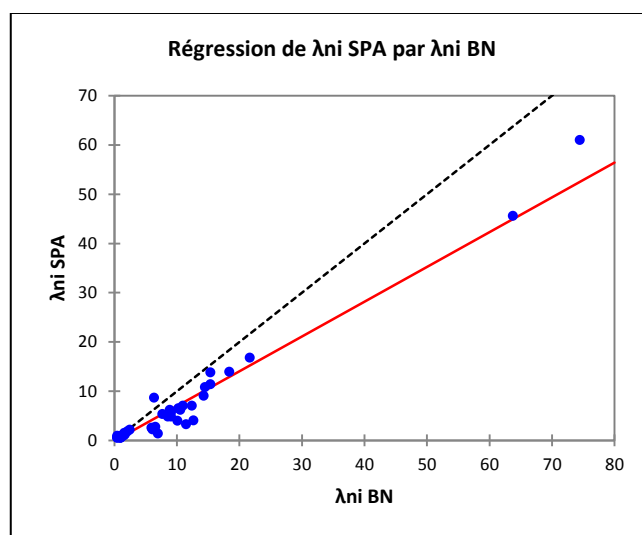


Figure 45 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{ni\ turb(SPA)}$ à $\lambda_{ni\ neph(BN)}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\lambda_{ni\ turb(SPA)}$ et $\lambda_{ni\ neph(BN)}$ avec $N = 46$.

L'équation de la droite de régression s'écrit : $\lambda_{ni\ SPA} = 0,707 \times \lambda_{ni\ BN} - 0,122$

IC_{95%} pour la pente [0,609 ; 0,760], pour l'ordonnée à l'origine [-0,298 ; 0,097]

Coefficient de corrélation $r = 0,986$ ($R = 0,972$)

Bien que la corrélation entre les concentrations de CLL λ_{ni} soit élevée ($r = 0,986$), l'IC_{95%} de la pente et de l'ordonnée à l'origine montre qu'il existe une différence proportionnelle, mais pas de différence systématique, entre les résultats obtenus avec les deux méthodes. De plus, on note, d'après l'équation de la droite de régression, que les concentrations de CLL λ_{ni} (polyclonales), obtenues par la méthode néphélométrique (BN), sont supérieures à celles issues de la méthode turbidimétrique (SPA), les concentrations étudiées allant jusqu'à 74,5 mg/L.

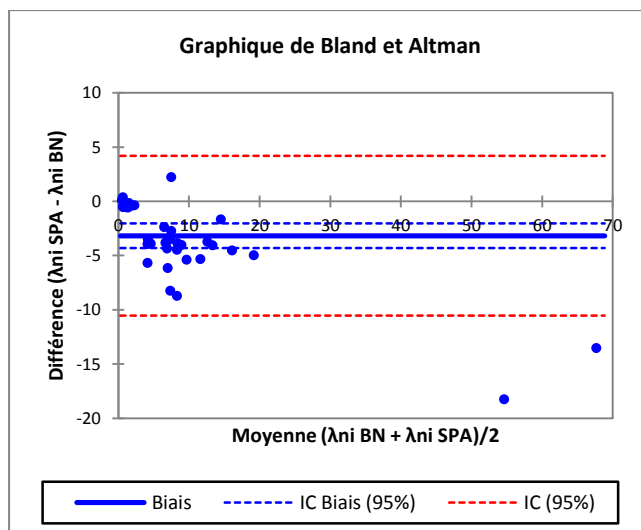


Figure 46 : Analyse de concordance entre $\lambda_{ni\ turb(SPA)}$ et $\lambda_{ni\ neph(BN)}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\lambda_{ni\ SPA} - \lambda_{ni\ BN} = -3,041$; dont $IC_{95\%} =] -4,148 ; -1,935[$

Ecart type des différences = 3,726 ; Limites d'agrément = $] -4,148 ; -1,935[$

De l'analyse de concordance par la méthode de Bland-Altman, il ressort qu'il existe un biais (-3,041) significativement négatif (0 situé à l'intérieur de l'intervalle de confiance du biais) qui implique que les concentrations en CLL λ_{ni} sont plus élevées en néphélométrie (BN) qu'en turbidimétrie (SPA).

L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 46) montre que pour 2 échantillons, les différences de concentration sont situées au-dessous de la limite d'agrément inférieure. Il en découle que le pourcentage de discordances, pour les CLL λ_{ni} , s'élève à 4,3%.

$\lambda_{ni\ SPA} \backslash \lambda_{ni\ BN}$	< 5,7 mg/L	5,7 – 26,3 mg/L	> 26,3 mg/L
< 5,7 mg/L	20	12	0
5,7 – 26,3 mg/L	0	12	0
> 26,3 mg/L	0	0	2

Tableau 24 : Tableau de concordance entre les concentrations $\lambda_{ni\ turb(SPA)}$ et $\lambda_{ni\ neph(BN)}$

Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles des valeurs usuelles des concentrations obtenus pour les deux méthodes. La concordance calculée est de 73,9% (=34/46).

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre au réactif utilisé (tableau 24), il apparaît que 12 échantillons n'appartiennent pas au même groupe, la discordance s'élevant à 26,1%. Ce niveau, apparemment élevé, de discordances doit être à pondérer car il est sans conséquence sur le plan de l'interprétation face à une CLLi correspondante de forte concentration. De plus, les 12 échantillons présentent une différence en valeur absolue $\lambda_{ni\ BN} - \lambda_{ni\ SPA} < 9\text{ mg/L}$.

- Etude du rapport $R_{ki/\lambda_{ni}}$

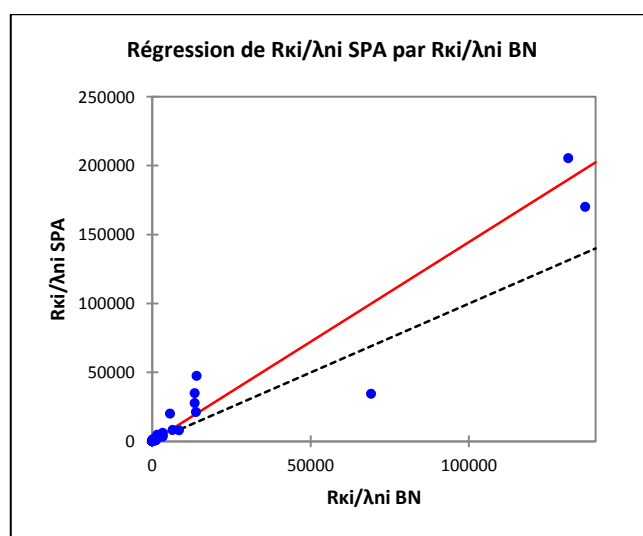


Figure 47 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de *Passing-Bablok* pour comparer $R_{ki/\lambda_{ni}\ turbid(SPA)}$ à $R_{ki/\lambda_{ni}\ neph(BN)}$

Cette figure représente la droite de régression de *Passing et Bablok* illustrant la corrélation existant entre $R_{ki/\lambda_{ni}\ turbid(SPA)}$ à $R_{ki/\lambda_{ni}\ neph(BN)}$ avec $N = 46$

L'équation de la droite s'écrit : $R_{ki/\lambda_{ni}\ SPA} = 1,446 \times R_{ki/\lambda_{ni}\ BN} - 3,715$

$IC_{95\%}$ de la pente $[1,249 ; 1,606]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine $[-10,260 ; 3,453]$

Coefficient de corrélation $r = 0,958$ ($R = 0,918$)

Bien que la corrélation entre les rapports soit élevée ($r = 0,958$), l' $IC_{95\%}$ de la pente et de l'ordonnée à l'origine montre qu'il existe une différence proportionnelle et une absence de différence systématique entre les résultats obtenus avec les deux méthodes. On note également, d'après l'équation de la droite de régression, que les rapports κ_i/λ_{ni} obtenus par la méthode turbidimétrique (SPA) sont plus élevés que ceux issus de la méthode néphélométrique (BN).

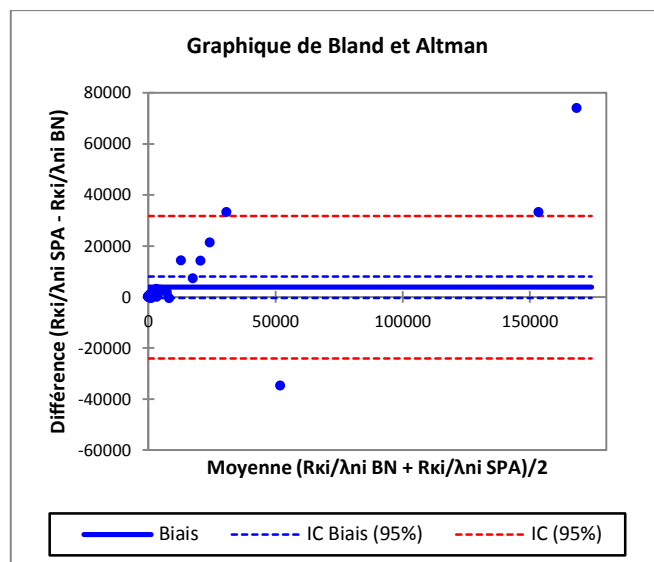


Figure 48 : Analyse de concordance entre $R_{ki/\lambda ni turb(SPA)}$ et $R_{ki/\lambda ni neph(BN)}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $R_{ki/\lambda ni SPA} - R_{ki/\lambda ni BN} = 3830$; dont $IC_{95\%} =]-400,339 ; 8060,690[$

Ecart type des différences = 14246 ; Limites d'agrément = $]-24091,304 ; 31751,656 [$

De l'analyse de concordance par la méthode graphique de Bland-Altman, il ressort qu'il existe un biais particulièrement élevé (3830), mais non significatif entre les deux méthodes (0 situé à l'intérieur de l'intervalle de confiance) entre les deux méthodes.

L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 48) montre que pour 4 échantillons la différence entre les rapports est située en dehors des limites d'agrément, il vient que le pourcentage de discordances pour les rapports κ_i/λ_{ni} s'élève à 8,7%.

$R_{ki/\lambda ni SPA} \backslash R_{ki/\lambda ni BN}$	< 0,26	0,26 – 1,65	> 1,65
< 0,26	0	0	0
0,26 – 1,65	0	0	0
> 1,65	0	0	46

Tableau 25 : Tableau de concordance des rapports $R_{ki/\lambda ni trub (SPA)}$ et $R_{ki/\lambda ni neph(BN)}$

Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles des valeurs usuelles des rapports obtenus pour les deux méthodes. La concordance calculée est de 100%.

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre au réactif utilisé (tableau 25), il apparaît que tous les échantillons appartiennent au même groupe, la concordance s'élevant donc à 100%.

- Récapitulatif des résultats de la population C1 (κ i)

	CLL κ_i	CLL λ_{ni}	R κ_i/λ_{ni}
Population	N = 46	N = 46	N = 46
Passing Bablok			
Equation	$K_i \text{ SPA} = 1,033 \times K_i \text{ BN} - 63,243$	$\lambda_{ni} \text{ SPA} = 0,707 \times \lambda_{ni} \text{ BN} - 0,122$	$R_{\kappa_i/\lambda_{ni} \text{ SPA}} = 1,446 \times R_{\kappa_i/\lambda_{ni} \text{ BN}} - 3,715$
IC _{95%} pente IC _{95%} ordonnée à l'origine	[0,958 ; 1,107] [-221,504 ; -31,328]	[0,609 ; 0,760] [-0,298 ; 0,097]	[1,249 ; 1,606] [-10,260 ; 3,453]
Corrélation			
Coefficient de corrélation	r = 0,976	r = 0,986	r = 0,958
Coefficient de détermination	R = 0,953	R = 0,972	R = 0,918
Bland-Altman			
Biais	1360	-3,041 significatif	3830
IC _{95%} du biais] -159,821 ; 2879,656[=] -4,148 ; -1,935[=] -400,339 ; 8060,690[
Concordance			
	100%	73,9%	100%

Tableau 26 : Récapitulatif des résultats de la population C1 (κ i)

Dans le tableau 26 sont rassemblés l'ensemble des résultats relatifs à la comparaison des résultats obtenus pour le dosage des CLL κ_i et λ_{ni} de 46 sérums issus de 14 patients atteints d'un MM actif de type κ , avec ou sans Ig entière. Il en ressort qu'il existe une corrélation élevée et comparable entre les 3 paramètres et une concordance totale entre les deux méthodes pour ce qui est de la CLLi et du rapport.

2.3.3. Etude de la population C2 (λ i)

On rappelle que cette population C2 est constituée de 55 échantillons issus de 13 patients, tous atteints de myélome en phase active de type λ , avec ou sans Ig entière.

- Etude des concentrations λ_i

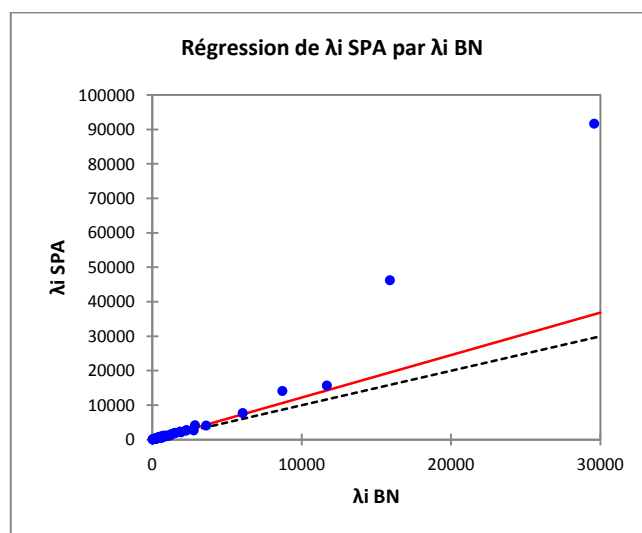


Figure 49 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $\lambda_{i \text{ turb(SPA)}}$ et $\lambda_{i \text{ neph(BN)}}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $\lambda_{i \text{ turb(SPA)}}$ et $\lambda_{i \text{ neph(BN)}}$ avec $N = 55$.

L'équation de la droite de régression s'écrit : $\lambda_{i \text{ SPA}} = 1,232 \times \lambda_{i \text{ TBS}} - 102,855$

$IC_{95\%}$ de la pente = $[1,155 ; 1,295]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine = $[-158,984 ; -65,924]$

Coefficient de corrélation $r = 0,971$ ($R = 0,943$)

La corrélation entre les concentrations de $CLL\lambda_i$ est élevée et équivalente à celle des $CLL\lambda_i$ ($r = 0,971$ vs $0,976$). L'interprétation des $IC_{95\%}$ de la pente et de l'ordonnée à l'origine montre qu'il existe une différence systématique et proportionnelle entre les résultats obtenus avec les deux méthodes. On note également, d'après l'équation de la droite de régression, que, pour toute valeur $\lambda_{i \text{ neph(BN)}} < 443 \text{ mg/L}$, les concentrations obtenues avec la méthode néphélométrique (BN) sont supérieures à celles obtenues avec celle turbidimétrique (SPA), et inversement, pour des concentrations supérieures à 443 mg/L .

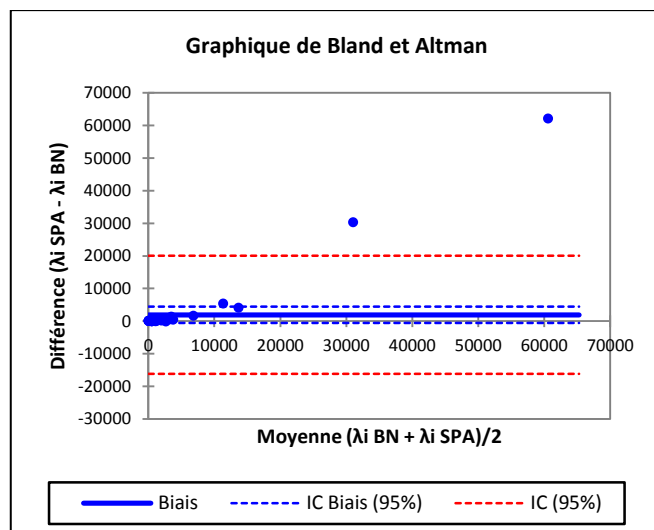


Figure 50 : Analyse de concordance entre $\lambda_{i\text{ turb(SPA)}}$ et $\lambda_{i\text{ neph(BN)}}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $\lambda_{i\text{ SPA}} - \lambda_{i\text{ BN}} = 1937$; dont IC_{95%} =]-558,677 ; 4432,711[

Ecart type des différences = 9232 ; Limites d'agrément =]-16156,8995 ; 20030,934[

De l'analyse de concordance par la méthode de Bland-Altman, il ressort qu'il existe un biais positif (1937 mg/L), mais non significatif (0 étant situé à l'intérieur de l'intervalle de confiance), entre les deux concentrations. L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 50) montre que pour 2 échantillons les différences de concentration sont situées au-dessus de la limite d'agrément supérieure : il en résulte un pourcentage de discordances de 3,6%.

$\lambda_{i\text{ SPA}} \backslash \lambda_{i\text{ BN}}$	< 5,7 mg/L	5,7 – 26,3 mg/L	> 26,3 mg/L
< 5,7 mg/L	55	0	0
5,7 – 26,3 mg/L	0	0	0
> 26,3 mg/L	0	0	0

Tableau 27 : Tableau de concordance entre les concentrations $\lambda_{i\text{ turb(SPA)}}$ et $\lambda_{i\text{ neph(BN)}}$

Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles des valeurs usuelles des concentrations obtenus pour les deux méthodes. La concordance calculée est de 100%.

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre au réactif utilisé (tableau 27), il apparaît que tous les échantillons appartiennent au même groupe, la concordance s'élevant donc à 100%.

- Etude des concentrations K_{ni}

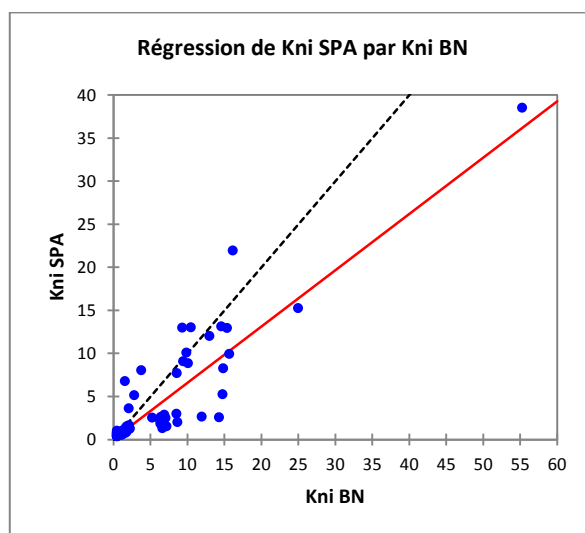


Figure 51 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $K_{ni\ turb(SPA)}$ et $K_{ni\ neph(BN)}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $K_{ni\ turb(SPA)}$ et $K_{ni\ neph(BN)}$ avec $N = 55$

L'équation de la droite s'écrit : $K_{ni\ SPA} = 0,654 \times K_{ni\ BN} + 0,053$

$IC_{95\%}$ de la pente = $[0,489 ; 0,865]$, $IC_{95\%}$ de l'ordonnée à l'origine = $[-0,241 ; 0,315]$

Coefficient de corrélation $r = 0,891$ ($R = 0,793$)

Bien que la corrélation entre les concentrations de kni soit élevée, elle est moins importante que pour λ_{ni} (0,891 vs 0,986). L'interprétation des $IC_{95\%}$ de la pente et de l'ordonnée à l'origine montre qu'il existe une différence systématique et proportionnelle entre les résultats obtenus avec les deux méthodes. On relève également que, d'après l'équation de la droite de régression, les concentrations de CLLkni (polyclonales), obtenues par la méthode néphélométrique (BN), sont supérieures à celles issues de la méthode turbidimétrique (SPA), les concentrations étudiées allant jusqu'à 55,3 mg/L.

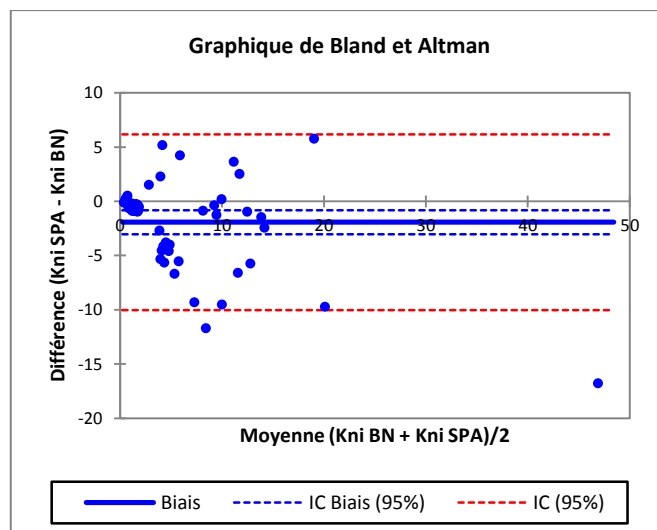


Figure 52 : Analyse de concordance entre $K_{ni\ turb(SPA)}$ et $K_{ni\ neph(BN)}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $K_{ni\ SPA} - K_{ni\ BN} = -1,931$; dont $IC_{95\%} =] -3,049 ; -0,814[$

Ecart type des différences = 4,134 ; Limites d'agrément = $]-10,033 ; 6,171[$

De l'analyse de concordance par la méthode de Bland-Altman, il ressort qu'il existe un biais (-1,931) significativement négatif, (0 situé en dehors de l'intervalle de confiance). Les concentrations en CLLk polyclonales sont donc plus élevées lorsqu'elles sont mesurées par néphélométrie (BN) que par turbidimétrie (SPA). L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 52) montre que pour 2 échantillons, les différences de concentration sont situées en dessous de la limite d'agrément inférieure : il en résulte que le pourcentage de discordances pour les CLLkni s'élève à 3,6%.

$K_{ni\ BN} \backslash K_{ni\ SPA}$	< 3,3 mg/L	3,3 – 19,4 mg/L	> 19,4 mg/L
< 3,3 mg/L	24	12	0
3,3 – 19,4 mg/L	3	13	1
> 19,4 mg/L	0	1	1

Tableau 28 : Tableau de concordance entre les concentrations $K_{ni\ turb(SPA)}$ et $\lambda_{ni\ neph(BN)}$

Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles de références des concentrations obtenus pour les deux méthodes. La concordance calculée est de 69,1% (= 38/55).

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre au réactif utilisé (tableau 28), il apparaît que 17 échantillons sur 55 n'appartiennent pas au même groupe, la discordance s'élevant donc à 30,9%. Bien que très important, ce niveau de discordance n'a aucune conséquence sur l'interprétation des résultats : face à une CLLi de très forte concentration, une concentration en CLLni plus faible de 5 ou 10 mg/L que celle attendue, ne changera rien à l'interprétation des résultats. Sur les 17 échantillons, 16 présentent une valeur absolue de différence $K_{ni\ BN} - K_{ni\ SPA} < 9\text{ mg/L}$.

- Etude du rapport $R_{kni/\lambda i}$

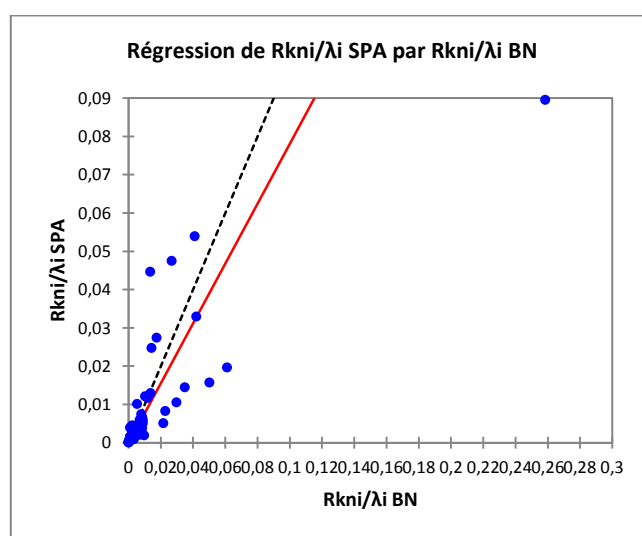


Figure 53 : Représentation de la droite de régression obtenue par la méthode de Passing-Bablok pour comparer $R_{kni/\lambda i\ turb(SPA)}$ à $R_{kni/\lambda i\ neph(BN)}$

Cette figure représente la droite de régression de Passing et Bablok illustrant la corrélation existant entre $R_{kni/\lambda i\ turb(SPA)}$ et $R_{kni/\lambda i\ neph(BN)}$ avec $N = 55$

L'équation de la droite de régression s'écrit: $R_{kni/\lambda i\ SPA} = 0,782 \times R_{kni/\lambda i\ BN} + 0,000$

IC_{95%} de la pente [0,532 ; 1,002], IC_{95%} de l'ordonnée à l'origine [0,000 ; 0,001]

Coefficient de corrélation $r = 0,807$ ($R = 0,652$)

Bien que la corrélation entre les rapports $R_{kni/\lambda i}$ soit bonne ($r=0,807$), elle est moins importante que pour $R_{ki/\lambda ni}$ ($r= 0,958$). L'interprétation des IC_{95%} de la pente et de l'ordonnée à l'origine montre qu'il n'existe aucune différence significative entre les deux méthodes de dosage des CLL en ce qui concerne le rapport $ki/\lambda ni$. On relève également que, d'après l'équation de la droite de régression, les rapports issus des concentrations de CLL mesurées en néphélométrie (BN) sont supérieurs à ceux issus des concentrations mesurées par turbidimétrie (SPA).

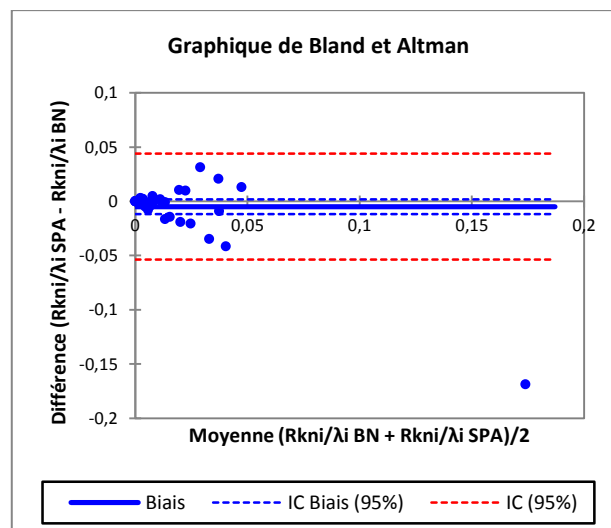


Figure 54 : Analyse de concordance entre $R_{kni/\lambda i \text{ trub}(SPA)}$ et $R_{kni/\lambda i \text{ neph}(BN)}$ par la méthode de Bland-Altman

Biais de $R_{kni/\lambda i \text{ SPA}} - R_{kni/\lambda i \text{ BN}} = -0,005$; dont $IC_{95\%} =]-0,012 ; 0,002[$

Ecart type des différences = 0,025 ; Limites d'agrément = $]-0,054 ; 0,044[$

De l'analyse de concordance par la méthode de Bland-Altman, il ressort qu'il existe un biais (-0,005) non significatif (0 situé à l'intérieur de l'intervalle de confiance) entre les deux méthodes.

L'analyse du diagramme de Bland Altman (fig 54) montre que pour un seul échantillon la différence entre les rapports est située en dessous de la limite d'agrément inférieure : il en découle que le pourcentage de discordances, pour les rapports $R_{kni/\lambda i}$, s'élève à 1,8%.

$R_{kni/\lambda i \text{ BN}} \backslash R_{kni/\lambda i \text{ SPA}}$	< 0,26	0,26 – 1,65	> 1,65
< 0,26	55	0	0
0,26 – 1,65	0	0	0
> 1,65	0	0	0

Tableau 29 : Tableau de concordance des rapports $R_{ki/\lambda ni \text{ trub}(SPA)}$ et $R_{ki/\lambda ni \text{ nep}(BN)}$

Dans ce tableau sont répartis les échantillons suivant les intervalles des valeurs usuelles obtenus pour les deux méthodes. La concordance calculée est de 100%.

Si on répartit les échantillons en fonction de leur position par rapport à l'intervalle des valeurs usuelles propre au réactif utilisé (tableau 29), il apparaît que tous les échantillons appartiennent au même groupe, la concordance s'élevant donc à 100%.

- Récapitulatif des résultats de la population C2 (λ i)

	CLL λ_i	CLL κ_{ni}	R κ_{ni}/λ_i
Population	N = 55	N = 55	N = 55
Passing Bablok			
Equation	$\lambda_i \text{ SPA} = 1,232 \times \lambda_i \text{ TBS} - 102,855$	$\kappa_{ni} \text{ SPA} = 0,654 \times \kappa_{ni} \text{ BN} + 0,053$	$R_{\kappa_{ni}/\lambda_i} \text{ SPA} = 0,782 \times R_{\kappa_{ni}/\lambda_i} \text{ BN}$
IC _{95%} pente IC _{95%} ordonnée à l'origine	[1,155 ; 1,295] [-158,984 ; -65,924]	[0,489 ; 0,865] [-0,241 ; 0,315]	[0,532 ; 1,002] [0,000 ; 0,001]
Corrélation			
Coefficient de corrélation	r = 0,971	r = 0,891	r = 0,807
Coefficient de détermination	R = 0,943	R = 0,793	R = 0,652
Bland-Altman			
Biais	1937 Pas significatif	-1,931 significatif	-0,005 Pas significatif
IC _{95%} du biais] -558,677 ; 4432,711[] -3,049 ; -0,814[] -0,012 ; 0,002[
Concordance			
	100%	69,1%	100%

Tableau 30 : Récapitulatif des résultats de la population C2 (λ i)

Dans le tableau 30 sont rassemblés l'ensemble des résultats relatifs à la comparaison des résultats obtenus pour le dosage des CLL λ_i et κ_{ni} dans 55 sérums issus de 13 patients atteints d'un MM actif de type λ , avec ou sans Ig entière. Il en ressort, comme pour l'étude portant sur κ_i , de bonnes corrélations pour les 3 paramètres et une concordance totale entre la CLLi et le rapport κ_{ni}/λ_i .

2.3.4. Discussion concernant les résultats précédents

L'étude comparative turbidimétrie versus néphélométrie basée dans un premier temps sur une analyse globale de 101 échantillons issus de 27 patients, tous en phase active de MM, montre que quelle que soit la CLL étudiée et indépendamment de son caractère monoclonal ou polyclonal, il existe une bonne corrélation entre les deux techniques ($r = 0,979$ pour κ ; $r = 0,968$ pour λ) mais une concordance modérée (83,2% pour κ et 88,1% pour λ) quand il s'agit de répartir les concentrations en fonction des intervalles de normalité.

Ce qui importe est ce qui se passe au niveau des CLLi κ et λ et donc des rapports κ_i/λ_{ni} et κ_{ni}/λ_{ni} . Outre des corrélations de haut niveau ($>0,9$), on observe une concordance de 100% pour ces deux paramètres. De plus, l'analyse des CLLi et CLLni a mis en évidence qu'il existait une différence systématique et proportionnelle entre les deux techniques et que les concentrations obtenues en turbidimétrie étaient plus élevées qu'en néphélométrie, pour toute valeur de $\kappa > 1916$ mg/L et de $\lambda > 443$ mg/L. Cependant, les résultats de turbidimétrie n'apparaissent très supérieurs à ceux de néphélométrie qu'à partir de concentrations extrêmes $> 10\,000$ mg/L : exemples pour les CLL κ : 8820 (BN) vs 8340 (SPA) ; 9930 (BN) vs 10009 (SPA) ; 12320 mg/L (BN) vs 28970 mg/L (SPA) ; 65700 mg/L (BN) vs 92377mg/L SPA. Pour les CLL λ : 6070 mg/L (BN) vs 7615 mg/L (SPA) ; 3620 mg/L (BN) vs 3971 mg/L (SPA) ; 11700 mg/L (BN) vs 15653 mg/L (Spa) ; 15940 mg/L (BN) vs 46156 mg/L (SPA) ; 29600 mg/L (BN) vs 91619 mg/L (SPA). En ce qui concerne les CLL κ_i et λ_i , le biais n'est pas significatif et ne montre pas de différence entre les deux techniques. Les biais des CLL K_{ni} et λ_{ni} sont, quant à eux significativement négatifs, montrant que, pour des concentrations en CLL inférieures à 56 mg/L pour κ et 75 mg/L pour λ , les concentrations mesurées par néphélométrie sont supérieures à celles mesurées par turbidimétrie.

Les différences observées entre les concentrations de niveau très élevé peuvent s'expliquer par la taille des complexes formés avec l'anticorps, les formes dimériques et polymériques donnant des complexes de taille plus élevée que les formes monomériques. Jusqu'à une certaine taille de complexe et une certaines concentrations en CLL ($\kappa < 1916$ mg/L et $\lambda < 443$ mg/L), la diffusion Mie de lumière déplace le faisceau vers l'avant de la particule. La turbidimétrie mesurant la lumière transmise, elle détecte une intensité lumineuse plus forte que la néphélométrie et donc un absorbance moins importante, ce qui rend une concentration plus faible. Lors de concentrations beaucoup plus importante et donc des complexes encore plus volumineux ($\kappa > 1916$ mg/L et $\lambda > 443$ mg/L), il en résulte une plus grande absorption de la lumière incidente et une élévation de l'absorbance et donc de la concentration mesurée. Dans ce cas, les concentrations mesurées, par turbidimétrie et néphélométrie, ne sont pas significativement différentes jusque $10\,000$ mg/L. Au-delà de $10\,000$ mg/L,

interviennent très probablement la nature des capteurs optiques et le traitement du signal par l'automate concerné, avec une amplification variable selon les fabricants, ce qui donnent des concentrations bien plus élevées pour la turbidimétrie que pour la néphélométrie. Sans doute aussi, le recours à des dilutions successives participerait à ces différences d'amplitude de résultats.

2.4. Comparaison de l'évolution dans le temps des concentrations des CLLi en fonction de la nature des réactifs (anticorps monoclonaux vs anticorps polyclonaux) et de la méthode de mesure : turbidimétrie (SPAplus[®]) vs néphélométrie (BN ProSpec[®])

L'évolution dans le temps des concentrations en CLLi a fait l'objet de deux études : l'une comparant l'information apportée par l'utilisation des anticorps monoclonaux à celle des anticorps polyclonaux et l'autre comparant l'évolution dans le temps des CLLi selon la méthode de dosage, turbidimétrie ou néphélométrie. En fonction des différentes considérations concernant les RCV respectifs des CLL et du rapport κ/λ , une croissance ou une décroissance des CLLi a été considérée comme significative lorsque son taux de variation était supérieur à 50% et donc son coefficient multiplicateur supérieur à 1,5 ou inférieur à 0,5. En l'absence d'évolution significative, on conclue à la présence d'un plateau.

2.4.1. Comparaison de l'évolution au cours du temps des concentrations en CLLi en fonction de la nature des réactifs : anticorps monoclonaux (Siemens) vs anticorps polyclonaux (TBS)

Cette étude, portant sur l'évolution en fonction du temps de la concentration en CLLi, a concerné 26 patients, tous atteints de MM (18 à CLL et 8 à Ig entière ; 11 de type κ et 15 de type λ) et a été basée sur trois modes de représentation faisant appel à un T0 virtuel, correspondant à celui du moment de l'inclusion dans l'étude : une première représentation a reposé sur les concentrations brutes exprimées en mg/L ; une deuxième s'est appuyée sur le taux de variation de la concentration de la CLLi par rapport T0 (T_n/T_0) ; et enfin la troisième a fait appel au \log_{10} de la concentration en CLLi.

Evolution en fonction du temps des concentrations en CLL_ki

Comme le montrent les figures représentant cette évolution de la concentration des CLL_ki en fonction du temps (voir l'ensemble des figures en annexe), quel que soit le mode de représentation considéré, toutes les courbes apportent la même information, les phases d'ascension des concentrations, celles de plateau ou de décroissance étant retrouvées aux mêmes temps, à l'exception d'un seul patient (patient 8 Gas) sur lequel on reviendra ultérieurement. La principale différence observée entre les deux réactifs se situe au niveau des concentrations selon qu'il s'agit des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, différence bien démontrée dans le précédent chapitre. Considérées individuellement, les concentrations peuvent varier du simple (patient 1 à T8 avec 2540 vs 2020 mg/L ; patient 2 à T4 avec 3980 vs 3350 mg/L), au double ou triple (patient 1 à T0 avec 1260 vs 445 mg/L), voire être multipliée par 40 (patient 8 à T4 avec 41 vs 1500 mg/L), les plus élevées étant toujours celles obtenues avec les anticorps polyclonaux. Il est à noter que, pour le patient 8, le niveau de concentration observé avec les anticorps monoclonaux est relativement bas (6 à 230 mg/L) alors que les concentrations observées avec les anticorps polyclonaux varie de 14 à 1500 mg/L. Ces variations amènent à interpréter la variation de T0 à T4 comme étant une phase de plateau avec les anticorps monoclonaux alors qu'avec les anticorps polyclonaux, elle correspond à une phase de décroissance du pic de CLLi (de 1500 mg/L à 14).

En ce qui concerne le pic électrophorétique, il apparaît le plus souvent comme un indicateur grossier du niveau de concentration en CLLi sans qu'il y ait de corrélation forte entre sa concentration et celle des CLLi.

En dehors du patient 8 pour lequel on a abouti à des interprétations différentes du suivi des concentrations en CLLi, on ne met pas en évidence de différence majeure entre les deux réactifs : les deux sont sensibles (un peu moins les anticorps monoclonaux) au comportement multiantigénique des CLL, dont on connaît l'extrême complexité résultant d'indices de dimérisation très élevé dans les dyscrasies plasmocytaires malignes. En revanche, il apparaît impossible de passer indifféremment d'un réactif à un autre pour un patient donné.

Evolution en fonction du temps des concentrations en CLL λ i

De la comparaison de l'évolution de la concentration des CLL λ i en fonction des anticorps utilisés il ressort qu'il existe des différences majeures entre les deux réactifs. En effet, il y a un facteur multiplicatif moyen de 30 entre l'ensemble des concentrations mesurées par les deux types d'anticorps ($[TBS]=30*[Siemens]$). De plus, la prise en considération de la concentration du pic électrophorétique objective de façon formelle la sous-estimation des CLL monoclonales λ par les anticorps monoclonaux. Sur 13 pics électrophorétiques mesurés, 11 se caractérisaient par des concentrations de CLL mesurées avec les anticorps monoclonaux bien plus basses que celles du pic (cas des patients 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 22 et 23). Patient 12 : 125 mg/L vs 3200 mg/L (*0,04) ; patient 13 : 555 mg/L vs 1700 mg/L (*0,3) ; patient 14 : 53 mg/L vs 600 mg/L (*0,09) ; patient 15 : 7 mg/L vs 1400 mg/L (*0,005) ; patient 16 : 54 vs 630 mg/L (*0,09) ; patient 18 : 20 mg/L vs 610 (*0,03) ; patient 19 : 1670 vs 7700 mg/L (*0,20) ; patient 20 : 125 vs 6000 mg/L (*0,02) ; patient 21 : 2230 vs 6700 mg/L (*0,33) ; patient 22 : 684 vs 1200 mg/L (0,6) ; patient 23 : 731 vs 1600 mg/L (*0,45). Dans un seul cas, la concentration du pic électrophorétique et celle des CLL mesurées par les anticorps monoclonaux sont proches : patient 23 : 3090 mg/L vs 2300. Dans un dernier cas (patient 17), il y a de toute évidence une surestimation du pic électrophorétique (3600 mg/L), les deux anticorps aboutissant à des concentrations très voisines (482 pour siemens et 677 pour TBS).

Dans 4 cas sur 13, les concentrations du pic et des CLL mesurées par TBS sont très proches : patient 12 : 3200 vs 2890 ; patient 14 : 600 vs 695 ; patient 18 : 610 mg/L vs 587 ; patient 22 : 1200 mg/L vs 1170 ; Dans 7 cas sur 13, il y a surestimation des CLL mesurées par TBS comparativement à la concentration du pic électrophorétique : patient 13 : 1700 vs 6070 mg/L (*3,5) ; patient 16 : 630 mg/L vs 3620 mg/L (*5,7) ; patient 19 : 7700 mg/L vs 15940 mg/L (*2) ; patient 20 : 6000 mg/L vs 11700 mg/L (*1,95) ; patient 21 : 6700 vs 29600 mg/L (*4,4) ; patient 23₁ et 23₂ : 2300 vs 4700 mg/L (*2) et 1600 mg/L vs 4320 mg/L (*2,7). La surestimation par les anticorps polyclonaux, quand elle existe, est comprise entre 2 et 4 fois la concentration du pic électrophorétique.

Dans 3 cas (patients 14, 15 et 18), la discordance entre les deux réactifs apparaît majeure, le faible niveau des concentrations en CLL avec les anticorps monoclonaux pourrait laisser penser à une normalisation alors que comme le montre le pic électrophorétique, il n'en est rien. Sur les 15 patients avec une GM de type λ , pour un seul (patient 25), on a observé des concentrations de CLL λ plus élevées avec les Ac monoclonaux qu'avec les Ac polyclonaux et ce, dans un rapport de 2 à 1.

L'importance et la fréquence des discordances observées avec la quantification des CLL λ par les Ac monoclonaux, très certainement en lien direct avec la structure des CLL λ monoclonales, n'incitent pas à opter pour leur utilisation en routine.

2.4.2. Comparaison de l'évolution au cours du temps des concentrations en CLLi selon la méthode de dosage : turbidimétrie (SPAplus®) vs néphélométrie (BN Prospec®)

Cette étude portant sur l'évolution en fonction du temps de la concentration en CLLi a concerné 17 patients, tous atteints de MM (14 à CLL et 3 à Ig entière ; 7 de type κ et 10 de type λ) et a été basée sur deux modes de représentation faisant appel à un T0 virtuel, correspondant à celui du moment de l'inclusion dans l'étude : la première représentation a reposé sur les concentrations brutes exprimées en mg/L ; la deuxième s'est appuyée sur le taux de variation de la concentration de la CLLi par rapport à T0 (T_n/T_0).

Evolution en fonction du temps des concentrations en CLL κ i et CLL λ i

Comme le montrent les figures des suivis en annexe, quelle que soit la méthode considérée, toutes les courbes apportent la même information, les phases d'ascension des concentrations, celles de plateau ou de décroissance sont retrouvées aux mêmes temps pour 15 patients sur 17 (88%). En effet, pour les patients 4 et 5, il y a divergence d'interprétation : pour le patient 4 un plateau (BN) s'oppose à une ascension du pic (SPA) et pour le patient 5, le cas de figure est inverse. Une autre différence concerne le niveau des concentrations mesurées, selon qu'il s'agit de la turbidimétrie ou de la néphélométrie. En effet si les deux méthodes aboutissent à des concentrations du même ordre de grandeur pour 11 patients sur 15 (74%), pour 4 patients (2, 3, 4 et 6) une seule concentration (soit

de début, soit de fin d'évolution) est affectée d'un facteur multiplicateur allant de 1,4 à 2,5 [patient 2 : 12320 vs 28970 mg/L (*2,5) ; patient 3 : 65700 mg/L vs 92377 mg/L (*1,4)]. Les concentrations les plus élevées sont toujours celles obtenues avec la turbidimétrie, à l'exception des patients 5, 7, 11, 13 et 15 où les concentrations mesurées étant relativement faibles (<1000 mg/L), c'est avec la néphélométrie que l'on obtient les concentrations les plus élevées. Ces résultats sont conformes aux conclusions tirées des expériences précédentes avec calcul d'un seuil de 1916 mg/L et 443 mg/L pour les CLL κ et λ respectivement, seuils en dessous desquels les concentrations mesurées en néphélométrie sont supérieures à celles mesurées en turbidimétrie.

Malgré quelques inévitables différences, mais plutôt minimes, ces deux méthodes sont comparables et au sein d'un même laboratoire le passage de l'une à l'autre pourrait être envisageable.

CONCLUSION

A l'issue de ce travail, il apparaît quelques éléments de réponse relatifs à la question de savoir s'il est possible à un laboratoire, utilisant depuis longtemps un néphélomètre et des réactifs à base d'anticorps polyclonaux (Freelite®), de changer sa pratique et de recourir pour le dosage des chaînes légères libres soit à des anticorps monoclonaux (réactifs N latex FLC®), soit à de la turbidimétrie.

S'il n'existe pas de différences majeures entre les deux réactifs à base d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, en ce qui concerne les CLL κ monoclonales. Il en va autrement pour les CLL λ monoclonales, dont la profonde sous-estimation par les anticorps monoclonaux est avérée : en effet, la prise en considération de l'existence d'un pic électrophorétique mesurable démontre la non reconnaissance par les anticorps monoclonaux de ces protéines à la structure extrêmement complexe.

Concernant l'étude visant à comparer la turbidimétrie à la néphélométrie dans leur application au dosage des chaînes légères libres, il n'est pas apparu de discordances majeures conduisant à des erreurs diagnostiques.

En présence d'un recrutement élevé de patients atteints de dyscrasies plasmocytaires malignes ou de maladies de dépôts, pathologies où l'hétérogénéité structurale des chaînes légères libres est de règle, le recours à des anticorps polyclonaux pour le dosage des chaînes légères libres apparaît comme un choix raisonnable. Concernant la turbidimétrie et la néphélométrie, on peut conclure que l'une et l'autre détectent bien les chaînes légères libres monoclonales des dyscrasies plasmocytaires et que ce n'est qu'à partir de concentrations très importantes en chaînes légères libres que la différence entre les deux techniques s'amorce.

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : Mme CORDONNIER Anne

La protéine dite de Bence Jones a été le premier marqueur tumoral identifié en pathologie humaine et sa recherche dans les urines est restée longtemps le seul moyen de mettre en évidence la présence de chaînes légères libres monoclonales dans l'organisme. Grâce à l'introduction sur le marché de réactifs à base d'anticorps polyclonaux en 2001 et monoclonaux en 2011, il est devenu possible de doser en routine les chaînes légères libres circulantes.

Tout utilisateur d'une méthode ou d'une technique de quantification d'un analyte donné est amené à se poser la question du maintien ou du changement de sa façon de procéder lors de l'apparition sur le marché d'un nouvel automate ou de nouveaux réactifs. C'est à ce questionnement qu'a été confronté le laboratoire du centre hospitalier Lyon Sud et c'est pour y répondre que ce travail de comparaison a été entrepris. Il s'est, en effet, agi pour nous de comparer les résultats obtenus sur la quantification des chaînes légères libres circulantes selon que l'on utilise des anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou que l'on fasse appel à des anticorps polyclonaux, mais selon deux méthodes différentes, l'immunoturbidimétrie ou l'immunonéphélométrie.

Une première partie de ce travail a été consacrée aux caractéristiques structurales, physiologiques et métaboliques des chaînes légères libres circulantes polyclonales et monoclonales. Après un rappel des difficultés rencontrées pour leur mise en évidence par les techniques conventionnelles d'électrophorèse, l'intérêt de leur quantification a été développé, en particulier pour le diagnostic et le suivi des dyscrasies plasmocytaires malignes (myélome multiple), ou pour le suivi des pathologies liées à des particularités structurales des chaînes légères libres (amyloses AL, maladies de dépôts de chaînes légères libres).

Une deuxième partie, portant sur une population initiale de 432 échantillons issus de 250 patients, rapporte d'abord nos résultats concernant la comparaison des concentrations de chaînes légères libres obtenues en fonction de la nature des réactifs commerciaux utilisés, anticorps polyclonaux versus anticorps monoclonaux, avec la méthode néphélométrique (283 échantillons, 250 patients). Ensuite, notre étude a porté sur la comparaison des résultats obtenus en turbidimétrie et en néphélométrie (101 échantillons, 27 patients). Enfin, nous avons recherché une influence éventuelle de la technique (174 échantillons, 26 patients) ou de la méthode (88 échantillons, 27 patients) sur l'interprétation des courbes de suivis de patients atteints d'un myélome multiple.

La comparaison portant sur les anticorps polyclonaux et monoclonaux et reposant sur les méthodes statistiques de Passing-Bablok et de Bland-Altman, montre que quelle que soit la chaîne légère libre étudiée, il existe une bonne corrélation entre les deux techniques ($r = 0,96$ pour κ ; $r = 0,874$ pour λ et $r = 0,963$ pour κ/λ) et une bonne concordance de 91,2% pour le rapport κ/λ . Cependant cette analyse a également mis en évidence qu'il existait une différence systématique et proportionnelle entre les deux techniques et que la concordance pour les chaînes légères libres κ était seulement de 86,9% et de 72,8% pour λ . Dans tous les cas les concentrations obtenues avec les anticorps polyclonaux étaient toujours plus élevées qu'avec les anticorps monoclonaux pour toute valeur de $\kappa > 44$ mg/L et de $\lambda > 34$ mg/L. Plus la concentration en chaînes légères libres augmente, plus la différence entre les concentrations obtenues avec les deux techniques augmente. La complexité structurale des chaînes légères monoclonales permet d'expliquer en partie les différences existant entre les niveaux de réponse de ces deux réactifs. En effet, les chaînes légères libres monoclonales d'un patient atteint de myélome sont sous forme d'un mélange de monomères, dimères et polymères parfois, l'ensemble se comportant comme un multiantigène réagissant fortement avec les anticorps polyclonaux, mais beaucoup moins bien avec les anticorps monoclonaux, les épitopes concernés étant dans ce cas, partiellement masqués dans les dimères et autres polymères. En d'autres termes, les anticorps polyclonaux semblent mieux reconnaître les chaînes légères libres sous forme de dimères, les anticorps monoclonaux reconnaissant mieux les monomères.

L'étude comparative turbidimétrie versus néphélométrie, reposant également sur les méthodes statistiques de Passing-Bablok et de Bland-Altman, montre que quelle que soit la chaîne légère libre étudiée, il existe une bonne corrélation entre les deux techniques ($r = 0,979$ pour κ ; $r = 0,968$ pour λ , $r = 0,960$ pour κ/λ) ainsi qu'une concordance de 100% pour le rapport

κ/λ , de 83,2% pour κ et de 88,1% pour λ . Cependant ici aussi, cette analyse a mis en évidence qu'il existait une différence systématique et proportionnelle entre les deux techniques et que les concentrations obtenues avec la turbidimétrie étaient plus élevées qu'avec la néphélométrie pour toute valeur de $\kappa > 1\,916$ mg/L et de $\lambda > 443$ mg/L. Ce phénomène peut s'expliquer d'une part par la taille des complexes formés avec l'anticorps, les dimères donnant des complexes de taille plus élevée que les formes monomériques et d'autre part, par la nature des capteurs optiques et le traitement du signal qui est soumis à une amplification variable selon les fabricants. Sans doute aussi, le recours à des dilutions successives pourrait participer à ces différences d'amplitude de résultats

L'analyse des suivis patients retrouve qualitativement ce que l'on observe avec les comparaisons des concentrations obtenues en fonction des réactifs. En effet, dans la plupart des cas, l'allure générale de la courbe est comparable, mais l'amplitude de la variation minimisée avec les anticorps monoclonaux et amplifiée au-delà de certains valeurs avec la turbidimétrie.

Ce travail permet donc de disposer de quelques éléments de réponse en regard de la question initialement posée, à savoir s'il est possible de changer de technique ou de méthode pour doser les chaînes légères libres. Il semblerait que les anticorps monoclonaux fussent plus adaptés à des populations où les monomères de chaînes légères libres prédominent sur les autres formes. En présence d'un recrutement élevé de patients atteints de dyscrasies plasmocytaires malignes ou de maladies de dépôts, pathologies où l'hétérogénéité structurale des chaînes légères libres est de règle, le recours à des anticorps polyclonaux pour le dosage des chaînes légères libres apparaît comme un choix raisonnable. Concernant la turbidimétrie et la néphélométrie, on peut conclure que l'une et l'autre détectent bien les chaînes légères libres monoclonales des dyscrasies plasmocytaires et que ce n'est qu'à partir de concentrations très importantes en chaînes légères libres que la différence entre les deux techniques s'amorce.

Le Président de la thèse,

Nom : **BIENVENU** Jacques

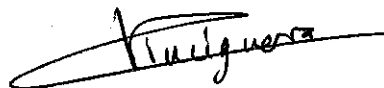
Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **22 SEP. 2015**

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,



Professeure C. VINCIGUERRA

ANNEXES 1

Mesures des concentrations des CLL κ et λ avec les réactifs d'anticorps monoclonaux N latex FLC[®] de Siemens et les réactifs Freelite[®] de TBS, avec le BN Prospec[®]

	K Ac poly (TBS)	λ Ac poly (TBS)	K Ac mono (Siemens)	λ Ac mono (Siemens)	CLLi	pathologie
1	19,8	862	28,6	480	L	MMCL
2	23,2	1100	25	772	L	MM
3	853	9,6	722	16,1	K	MMCL
4	702	11,2	578	15,5	K	MMCL
5	33,2	1,04	31,2	6,48	K	MM
6	15,3	23,4	9,4	11,4	L	LLC
7	41,7	21,2	43,4	16,1		Sans GM
8	1,8	236	6,35	150	L	MM
9	1,68	270	4,98	176	L	MM
10	22,9	12,4	43	16,8	K	WM
11	51,1	8,95	40,7	12,4	K	CLL
12	1,6	1840	5,91	56,7	L	MMCL
13	3020	22,3	825	37,1	K	MMCL
14	21,3	2490	25,3	208	L	MM
15	93	22,5	111	29,9	K	GMSI
16	34	11040	14,7	1560	L	MMCL
17	157	6,1	32,4	1,22	K	MMCL
18	7,7	8,6	8,82	8,68	K	WM
19	14,7	7,6	21,8	7,26	K	GMSI
20	52,9	22,7	78,1	46,9		Sans GM
21	13,6	99,9	13,6	478	L	MM
22	19,6	16,5	34	34,2		Sans GM
23	6,1	5000	1,93	642	L	MMCL
24	20,4	129	20,2	249	L	MMCL
25	18,4	92,7	14,4	146	L	MMCL
26	8,9	293	10,6	267	L	MM
27	3	306	6,51	305	L	MM
28	26,7	22,3	38	44,3		Sans GM
29	12320	6,4	11900	4,05	K	MMCL
30	27,5	2570	31,7	1760	L	MM
31	1,86	13,5	7,64	82,5	L	MMCL
32	3,1	286	6,52	78,8	L	MM
33	7,02	302	6,49	127	L	MM
34	13,1	6,2	11	5,13	K	GMSI
35	9,75	12,1	11,8	10,4	K	WM
36	607	1,7	437	3,52	K	MM
37	26,4	6,6	29,1	4,27	K	GMSI/WM
38	7,04	11	4,88	5,11	L	MM
39	29,6	8,7	43,3	9,89	K	MM
40	408	21,7	440	23,1	K	MMCL
41	39	13,8	34,9	21,6	K	GMSI
42	32,6	14,5	67,5	34,3	K	WM
43	367	16,9	274	44	K	MMCL
44	39,8	9,1	56,7	8,51	K	MM
45	2910	2,5	638	3,33	K	MMCL
46	99,9	10,9	88,8	7,41	K	GMSI
47	78,4	11,3	67	23,1	K	MMCL
48	197	15,4	105	23,3	K	MMCL
49	1,01	3050	1,65	128	L	MMCL
50	2,2	732	5,46	389	L	MMCL
51	2170	11,2	1540	11	K	MMCL
52	20,5	9,2	21,2	14,1	K	GMSI
53	98,8	109	153	169		Sans GM
54	1510	1,2	611	1,46	K	MMCL
55	33,7	32,4	39,2	41,5		Sans GM

56	14,1	144	9,04	132	L	WM
57	16,5	11,6	10,3	6,94	K	GMSI
58	9,66	42,3	12,1	68,5	L	ALA
59	9,38	55,8	8,85	63,2	L	ALA
60	16	371	11,1	25	L	MMCL
61	293	17,8	125	27,6	K	MMCL
62	233	54,4	228	54,8	K	MMCL
63	95,1	15,5	62,6	27,5	K	MM
64	55,3	7,2	78	13,9	K	LZM
65	163	5,3	171	5,27	K	MM
66	3330	2,3	1960	5,82	K	MMCL
67	89,8	664	148	869	L	GMIS
68	88,3	624	115	668	L	GMSI
69	14,8	9,12	13,6	13,9	K	MMCL
70	48,6	10,6	114	11,4	K	MNS
71	540	5,26	230	6,8	K	MM
72	11,4	12,6	11,4	14,3	L	GMSI
73	12,6	718	10,5	116	L	MM
74	19,5	82,3	21,7	80,5	L	ALA
75	24,6	26,4	40,9	36,5		Sans GM
76	13,8	11,8	8,53	5,47	K	GMSI
77	195	10,1	108	8,49	K	GMSI
78	7,8	736	7,19	151	L	LMNH
79	9,6	635	6,24	139	L	LMNH
80	0,635	238	3,51	239	L	MM
81	588	29,1	371	34,3	K	MM
82	6,65	677	4,42	482	L	MM
83	22,7	1,32	16,9	2,88	K	CLL
84	1160	1,5	421	3,75	K	MM
85	88,6	8,61	45,6	8,53	K	MMCL
86	0,266	1320	7,71	1110	L	MM
87	26,5	27,3	31,7	30,9		Sans GM
88	27,5	24,9	33	31,9		Sans GM
89	457	11,8	217	7,82	K	MMCL
90	988	11,5	543	9,13	K	MM
91	10,5	595	13,6	323	L	MMCL
92	12,8	176	12,5	134	L	AAL
93	16	532	11,1	152	L	AAL
94	6280	1,97	6530	12,6	K	MM
95	497	9,65	322	13,2	K	MM
96	27,5	10,6	48,1	26,5	K	MM
97	27,8	5130	3,74	704	L	MM
98	8,11	441	8,32	324	L	MM
99	12,8	185	12,5	28,8	L	L de malt
100	19640	1,9	9020	9,78	K	MMCL
101	17,5	526	21,6	611	L	MMCL
102	5,9	2620	8,74	930	L	MM
103	18,2	720	22,3	950	L	GMSI
104	37,2	29,9	57,4	66,5		Sans GM
105	8,55	160	6,27	181	L	MM
106	9,45	22,1	9,51	15,9	L	P
107	28,1	14,6	48,6	18,8	K	GMSI
108	1140	10,9	1270	29,1	K	WM
109	21,4	339	21,3	43,4	L	MM
110	9,89	3720	10,7	538	L	MMCL
111	9,97	3750	4,83	382	L	MMCL
112	70,8	137	58,7	107	L	MMCL
113	8,9	301	7,31	12,2	L	MM
114	2,08	2450	5,32	377	L	MM
115	64,1	89,7	107	138		Sans GM
116	82,2	14,5	43,8	7,06	K	WM
117	117	7,9	114	13,8	K	GMSI
118	20,1	6330	17,9	1410	L	MM
119	13,5	16,2	25,9	41,5		Sans GM

120	452	0,5	175	0,673	K	MM
121	8,06	578	7,37	280	L	MMCL
122	2650	2,5	2050	7,03	K	MMCL
123	11,6	12,8	14,5	12,9		Sans GM
124	691	24,8	647	56,2	K	LCDD
125	31,6	7,12	22,4	5,3	K	WM
126	47,1	50,7	52,7	61		Sans GM
127	12,6	839	20,7	440	L	MMCL
128	607	6,1	190	5,72	K	MMCL
129	13,6	2020	14,4	153	L	MMCL
130	53,6	5,2	27,7	4,24	K	WM
131	359	2,4	221	6,91	K	MMCL
132	1690	2,4	873	4,48	K	MMCL
133	1160	3	776	5,36	K	MMCL
134	10,5	125	14	78,4	L	MM
135	7,9	113	10,1	34,7	L	MM
136	5850	1,5	3470	3,14	K	MMCL
137	1,6	613	3,88	173	L	MM
138	15,1	226	12,8	34,5	L	LMNH
139	16,3	37,7	23	97,9	L	GMSI
140	1,31	485	2,26	133	L	MMCL
141	230	1,2	95,8	1,34	K	MMCL
142	29,7	5,51	29,1	6,94	K	GMSI
143	80,1	7,6	36,6	8,07	K	MMCL
144	443	5,32	275	612	K	MM
145	13,2	5490	10,5	745	L	MM
146	1370	0,96	705	1,94	K	MM
147	98	2140	117	1660	L	MMCL
148	87,4	1590	64,3	1050	L	MMCL
149	1,91	2190	5,56	402	L	MMCL
150	13,8	60,6	8,35	14,8	L	MMCL
151	11	76,9	14,5	46,8	L	GMSI
152	11	18,9	6,93	6,1	L	AHAI
153	830	1,03	281	1,91	K	P
154	32,5	33,7	41	54		Sans GM
155	262	1,44	67,8	1,63	K	MMCL
156	121	14,8	186	33,3	K	GMSI
157	2180	151	1360	557	K	MM
158	5590	544	2190	460	K	MM
159	15	16,2	23,5	26,8		Sans GM
160	100	105	123	194		Sans GM
161	15,2	17,6	22,5	28,2		Sans GM
162	30,3	0,23	45	1,51	K	MM
163	1070	7,26	637	7,65	K	MM
164	89	370	199	753	L	MM
165	11,7	37,4	10,3	24,3	L	MM
166	12,4	41,2	12,3	20,4	L	MM
167	631	2,97	369	3,25	K	MM
168	127	10,9	144	10,7	K	LLC
169	0,5	252	2,73	4,43	L	MM
170	30,2	31,3	49,5	63		Sans GM
171	90	93,6	114	115		Sans GM
172	32,6	21,6	39,3	26,4	K	WM
173	825	2,37	912	7,52	K	MMCL
174	25,3	7,7	37,7	7,35	K	MM
175	9,3	8,5	14,7	11,8		Sans GM
176	204	1,5	300	8,34	K	MMCL
177	933	1,03	773	8,01	K	MMCL
178	1090	9,1	924	14,5	K	GMSI
179	44	0,9	6,66	3,83	K	MM
180	96,7	87,3	88,8	70,9		Sans GM
181	17	20,3	22,7	27,7		Sans GM
182	3590	10,4	1580	25	K	MMCL
183	135	0,33	102	2,17	K	MMCL

184	574	5,6	705	5,36	K	MMCL
185	46,5	10	25,3	5,44	K	LZM
186	424	298	317	320		Sans GM
187	21,2	137	31,9	58,4		Sans GM
188	14,4	1350	15,6	2030	L	LMNH
189	19,7	15,3	38,3	32,4		Sans GM
190	293	1,1	66	1,6	K	MMCL
191	2,4	9,9	4,66	20,9	L	MM
192	9,38	6,84	13,9	8,07	K	WM
193	0,56	0,525	4,26	2,47	K	WM
194	84	6,2	36,4	4,38	K	GMSI
195	1020	20,5	1140	123	K	MMCL
196	365	18,1	685	86,4	K	MMCL
197	23,9	20,6	39,1	39,3		Sans GM
198	21,1	5,37	35,1	10,8	K	WM
199	2,9	5490	8,41	250	L	MMCL
200	539	1,63	197	2,54	K	MMCL
201	19,8	20,9	31,7	39,2		Sans GM
202	18,1	7,7	34	4,24	K	MM
203	934	22,8	331	33	K	MMCL
204	704	12,2	332	12,5	K	GMSI
205	764	12,4	283	13,2	K	GMSI
206	7,3	2090	8,64	112	L	MM
207	211	113	253	186		Sans GM
208	6,14	116	8,07	25,5	L	MM
209	5650	10,1	3700	23,8	K	MM
210	5150	11,8	4600	24,4	K	MM
211	812	8,2	531	3,81	K	MMCL
212	9	462	5,5	45,2	L	GMSI
213	6,66	8,67	9,05	10,4		Sans GM
214	20	9,2	12,1	7,86	K	GMSI
215	20	9,2	12,3	12,2	K	GMSI
216	10,7	737	9,82	311	L	MMCL
217	549	10	474	19	K	MMCL
218	897	9,99	545	23,8	K	MMCL
219	1630	1,35	1200	5,78	K	MM
220	16,1	14,8	13,5	12,9	K/L	GMSI
221	1,44	78,4	4,79	21,2	L	MM
222	1,39	29,7	3,48	12,4	L	MMCL
223	1,6	881	7,29	321	L	MMCL
224	3920	1	2330	29,2	K	MM
225	362	12,7	166	16	K	MMCL
226	1,6	321	5,68	39,2	L	MM
227	1,1	613	1,29	11,5	L	MM
228	6,7	169	5,21	28,7	L	MM
229	29,4	68,6	38,9	185	L	GMSI
230	684	5,5	331	6,4	K	MM
231	1,94	552	2,41	529	L	MM
232	118	11,6	103	12,8	K	WM
233	628	0,5	296	1,93	K	MM
234	106	11,1	79,9	5,14	K	MMCL
235	0,5	468	2,61	116	L	MM
236	21,4	6	24,5	6,62	K	MM
237	8,86	9,44	10,8	21	L	GMSI
238	12,5	500	12,3	75,9	L	MMCL
239	6,22	99,3	6,8	10,3	L	MM
240	18,8	30	21,4	19,1		Sans GM
241	1550	1,3	874	3,95	K	MM
242	57,9	18,5	84,2	22,8	K/L	WM
243	392	12,7	204	13	K	MMCL
244	607	9,85	216	12,2	K	MMCL
245	1	8,8	3	26,4	L	MM
246	129	2,1	240	15,4	K	WM
247	22,6	11	13	8,23	K	GMSI

248	143	186	182	215		Sans GM
249	820	8,21	202	6	K	MMCL
250	10,8	48,3	10,6	18,2	L	MM
251	40000	8,8	10280	6,5	K	MMCL
252	15,4	17	15,4	17,1		Sans GM
253	9,62	2750	16,7	518	L	MM
254	20,2	19,4	30,2	26,1		Sans GM
255	323	0,5	36,3	0,723	K	MMCL
256	1	6960	1,4	289	L	MMCL
257	9,37	3260	3,75	345	L	MMCL
258	6,8	601	8,44	27,7	L	MM
259	203	14	161	10,4	K	MMCL
260	1,15	498	4,2	103	L	MMCL
261	1,3	712	2,45	141	L	MMCL
262	637	2	112	5,15	K	WM
263	403	11,5	253	9,12	K	MMCL
264	5120	1,1	1710	5,02	K	MMCL
265	2,1	978	8,92	1490	L	MMCL
266	7,05	523	6,1	985	L	MMCL
267	24,7	26,2	23,4	24,2	K	GMSI
268	9,6	123	9,56	14,7	L	GMSI
269	15,9	26,1	16,5	39,8	L	GMSI
270	1450	18,3	530	21,9	K	MM
271	2090	14,6	757	23,2	K	MM
272	9,94	140	8,91	20,3	L	MMCL
273	2,68	42,8	8,65	20,6	L	MMCL
274	15,4	5380	18,7	2390	L	MMCL
275	1520	11,2	734	10,7	K	MMCL
276	94,5	1,8	171	8,2	K	MM
277	0,266	4700	2,93	3090	L	MM
278	21,2	13,2	35,8	7,7	K	WM
279	21,2	13,2	36,8	10,6	K/L	WM
280	16,8	12	26,4	21,4		Sans GM
281	27,9	1540	30,2	356	L	MMCL
282	22,4	863	30,4	148	L	MM
283	15,4	8,2	15,8	6	K	WM

ANNEXES 2

Mesures des concentrations des CLL κ et λ avec le turbidimètre SPA plus[®] et le néphélomètre BN Prospec[®], avec les réactifs Freelite[®] de TBS

	K néphélo (BN)	λ néphélo (BN)	K turbi (SPA)	λ turbi (SPA)	CLLi
1	10,5	595	13	475	L
2	10180	1,56	9300,1	1,14	K
3	1,15	498	0,54	454	L
4	34600	0,5	29278	0,85	L
5	6,4	1880	1,83	2229	L
6	9,35	648	12,97	524,84	K
7	12320	6,4	28970	8,59	L
8	9930	6,13	10009	2,15	L
9	8820	6,58	8340	2,65	K
10	186	12,4	169,5	6,98	K
11	7,1	1940	2,49	2010	L
12	195	11	122,5	6,95	K
13	324	14,3	294,9	8,95	K
14	1,28	47,4	1,06	22,34	L
15	88,6	8,61	71,95	4,75	L
16	8,54	373	2,98	363,8	L
17	1260	14,5	1000,8	10,74	L
18	1,75	644	1,46	511,4	L
19	15,7	372	9,94	302,65	K
20	1,94	552	1,58	622	L
21	2,15	52,3	1,62	30,09	K
22	2230	1	2075	0,64	L
23	7140	2,15	7334	1,73	K
24	6,35	894	2,19	1084,72	K
25	14,6	1210	13,12	1132	L
26	2,23	2800	1,24	2573	K
27	0,5	461	0,85	610	K
28	6220	18,4	9560	13,84	K
29	16,2	1540	21,94	1823	K
30	11040	1,3	7747	0,98	K
31	126	7,7	87,98	5,3	K
32	2910	2,5	1593	2,11	L
33	3340	1	1980	0,61	L
34	10800	15,4	11080	13,7	K
35	10100	15,4	9664	11,3	L
36	0,5	587	0,56	577,52	L
37	666	5,99	342,76	2,46	L
38	14,8	422	5,24	365	L
39	8750	21,7	9638	16,7	K
40	129	8,75	80,24	4,96	K
41	6,42	15940	2,61	46156	L
42	55,3	6070	38,5	7615	K
43	0,5	197	0,55	123,17	K
44	3390	1	2760	0,45	K
45	0,5	252	1	246,5	K
46	6,65	677	1,3	717,5	L
47	0,5	215	0,73	171,51	K
48	16300	1,17	17150	0,81	K
49	145	10,3	107,16	6,42	K
50	1,64	714	0,73	1014	L
51	68400	0,5	76498	0,45	L
52	607	1,7	432,57	1,1	K
53	1160	1,5	839,27	1	L
54	988	11,5	768,46	3,22	L
55	2140	74,5	1936	60,94	L
56	2290	10,1	2435	3,91	L

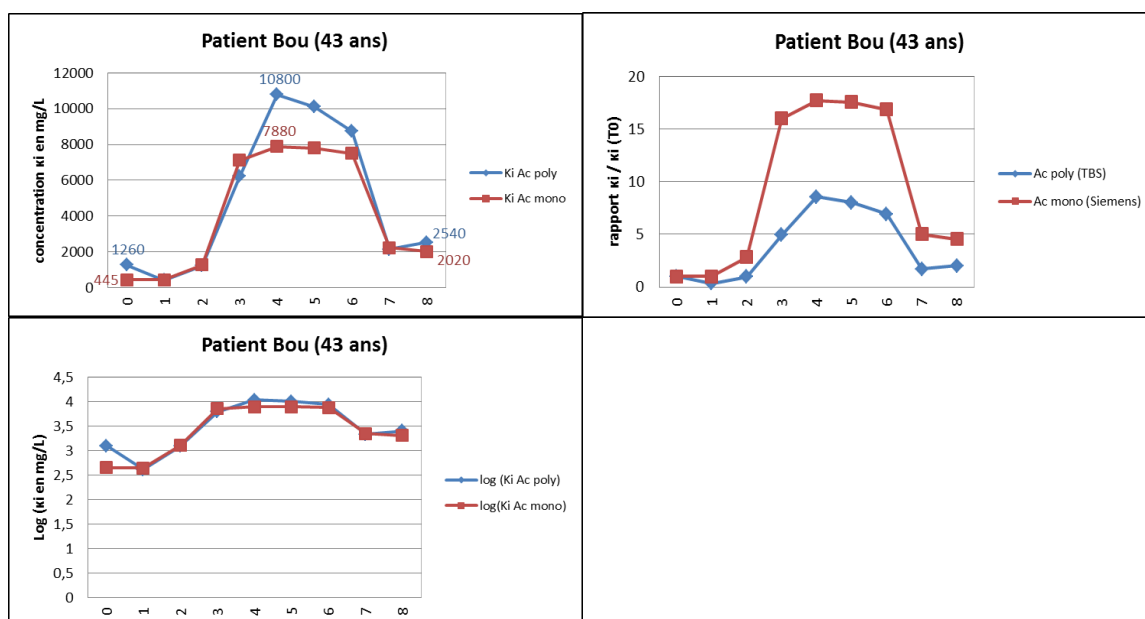
57	14,9	500	8,27	788,7	K
58	362	12,7	336,82	3,95	K
59	2,23	3620	1,31	3971	K
60	0,5	524	0,38	420,96	K
61	6,9	29600	2,86	91619	L
62	65700	0,5	92377	0,45	L
63	117	9,12	81,13	4,75	K
64	12	238	2,65	169,86	L
65	2,1	155	3,6	80,8	L
66	9,89	1220	10,06	1366	L
67	13	1520	12,01	1820	L
68	1,24	535	0,58	449,06	L
69	1,51	900	0,99	835,2	L
70	628	0,5	401,45	0,58	L
71	0,5	468	0,65	429,85	L
72	1940	7	1681	1,3	L
73	25	2890	15,25	4109	K
74	7,2	331	1,52	304,8	L
75	0,5	232	0,38	187,54	K
76	18200	1,35	21806	0,79	L
77	2540	63,8	1730	45,51	L
78	5,26	578	2,52	429,54	K
79	8,7	142	2	102,3	K
80	1,6	1520	6,76	1771	L
81	108	10,6	84,46	6,09	L
82	2,86	528	5,13	510,7	K
83	995	1,61	761,24	1,43	L
84	3,8	1920	8,02	2151	K
85	111	9,12	92,15	5,58	L
86	0,5	232	0,38	185,54	K
87	1,28	11700	0,67	15653	L
88	8,6	2260	7,7	2521	K
89	0,5	188	0,38	151,15	K
90	16680	1,24	25377	0,73	K
91	14,3	55,3	2,56	28,6	L
92	10,1	2320	8,83	2726	L
93	15,4	1110	12,95	1005	K
94	1,5	473	0,9	664,1	L
95	9,46	1350	9,06	1543	K
96	127	8,9	103,36	6,13	K
97	1,8	530	0,87	684,2	L
98	5740	1	8981	0,45	K
99	1140	1,5	1059,01	1,01	L
100	14100	1	21282	0,45	L
101	0,5	8720	0,69	14044	L

ANNEXES 3

Comparaison de l'évolution en fonction du temps des concentrations en CLL mesurées par les anticorps monoclonaux (Siemens) vs les anticorps polyclonaux (TBS)

CLL impliquée κ

Avec détection d'un pic électrophorétique mesurable



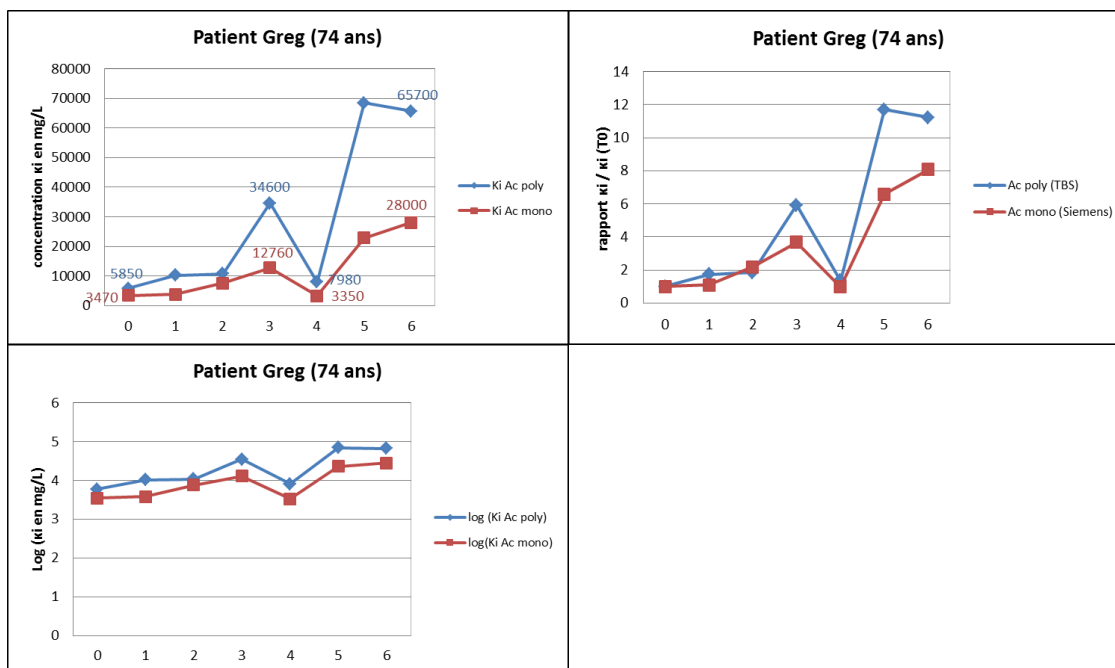
Patient 1 Bou : Les suivis ont été réalisés sur une période de 6 mois. Le pic électrophorétique mesuré à T0 était à 0.5 g/L et à T4, à 3,5 g/L .

TBS : ascension significative de 757% (coefficient multiplicateur de 8,57) de T0 à T4 (1260 à 10800 mg/L) puis décroissance significative de 76% (coefficient multiplicateur de 0,24) de T4 à T8 (10800 à 2540 mg/L)

Siemens : ascension significative de 1671% (coefficient multiplicateur de 17,71) de T0 à T4 (445 à 7880 mg/L) puis décroissance significative de 74% (coefficient multiplicateur de 0,26) de T4 à T8 (7880 à 2020 mg/L)

Conclusions : suivis comparables avec courbes logarithmiques parallèles. Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont en moyenne 2 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux. La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est inférieure aux concentrations des CLL, dans un rapport de 1 à 2 et 1 à 3 respectivement : pic 3.5g/L < 7880 mg/L (Siemens) < 10800 mg/L (TBS), sachant par ailleurs que le pic ne représente que la partie émergée de l'iceberg.

Le suivi réalisé avec les anticorps polyclonaux est comparable à celui réalisé avec les anticorps monoclonaux.



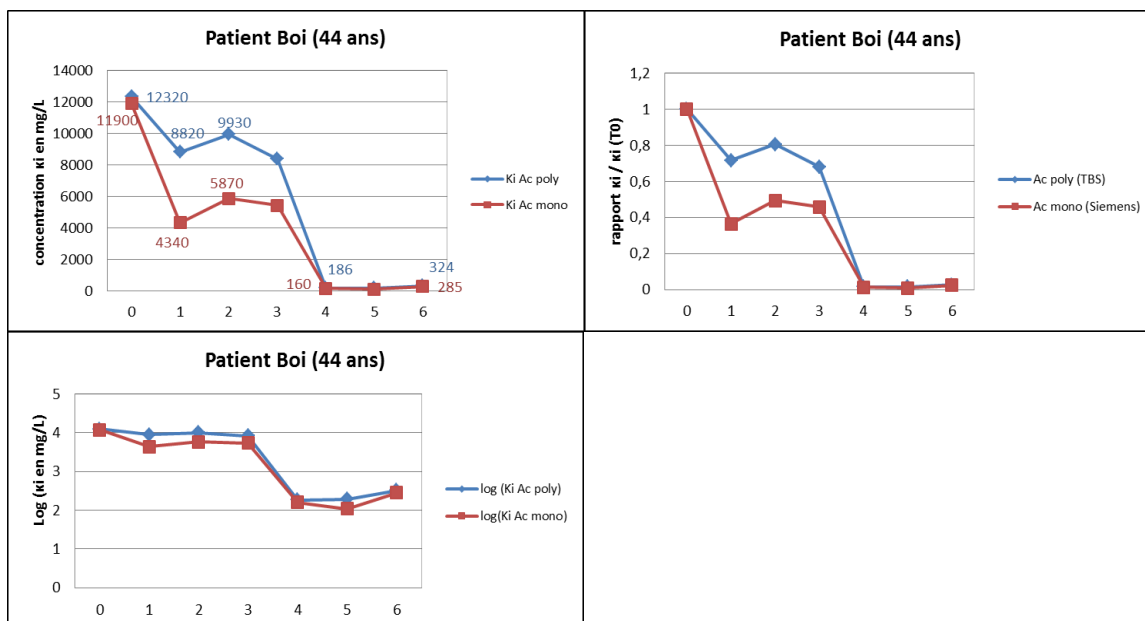
Patient 2 Greg : Les suivis ont été réalisés sur une période de 11 mois. Le pics électrophorétique mesuré à T0 était de 5 g/L et à T6 de 9 g/L

TBS : ascension significative de 491% (coefficient multiplicateur de 5,91) de T0 à T3 (5850 à 34600 mg/L) puis décroissance significative de 77% (coefficient multiplicateur de 0,23) de T3 à T4 (34600 à 7980mg/L) puis ré-ascension de 723% (coefficient multiplicateur de 8,23) de T4 à T6 (7980 à 65700 mg/L)

Siemens : ascension significative de 268% (coefficient multiplicateur de 3,68) de T0 à T3 (3470 à 12760 mg/L) puis décroissance significative de 74% (coefficient multiplicateur de 0,26) de T3 à T4 (12760 à 3350mg/L) puis ré-ascension de 736% (coefficient multiplicateur de 8,36) de T4 à T6 (3350 à 28000 mg/L)

Conclusions : Les suivis sont comparables et les courbes logarithmiques strictement parallèles. Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont en moyenne 2 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux (5850 vs 3470 ; 34600 vs 12760 ; 65700 vs 28000). La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est très inférieure aux concentrations des CLL, dans un rapport de 1 à 3 et de 1 à 7 respectivement : pic 9g/L < 28000 mg/L (Siemens) < 65700 mg/L (TBS).

Le suivi réalisé avec les anticorps polyclonaux est comparable à celui réalisé avec les anticorps monoclonaux.



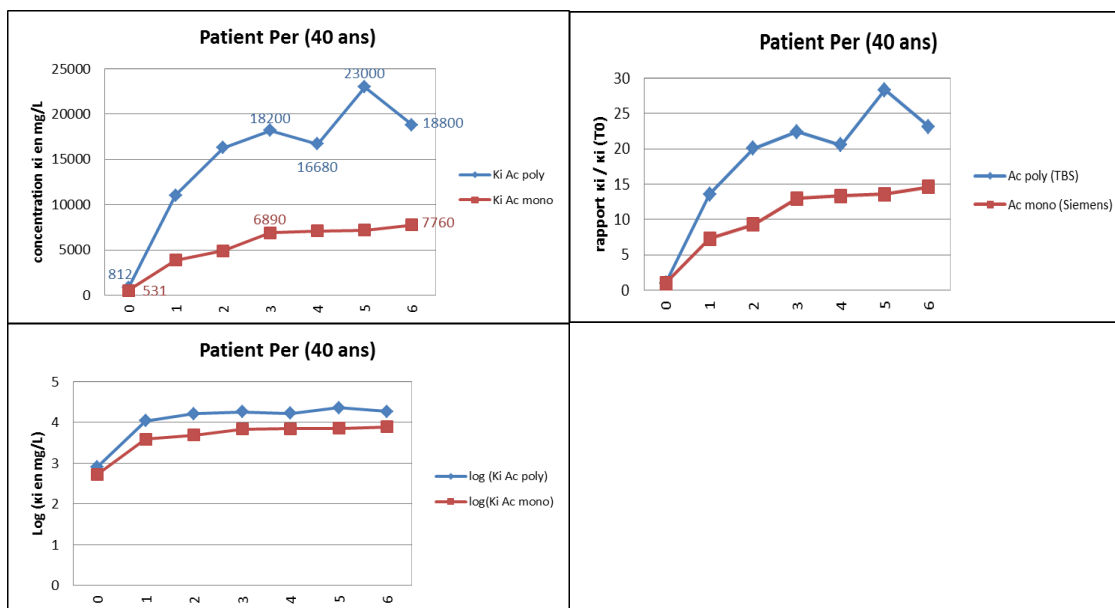
Patient 3 Boi : Les suivis ont été réalisés sur une période de 1 mois, le patient étant régulièrement dialysé. Le pic électrophorétique mesuré à T0 était de 4,4 g/L et à T3 de 1,6 g/L.

TBS : stabilité du pic de T0 à T2 avec oscillation des concentrations autour d'une valeur moyenne de 9800 mg/L, suivie d'une décroissance très significative de 98% (coefficient multiplicateur de 0,02) de T2 à T4 (9930 à 186 mg/L) puis d'une ré-ascension significative de 74% (coefficient multiplicateur de 1,74) de T4 à T6 (186 à 324 mg/L).

Siemens : décroissance significative de 64% (coefficient multiplicateur de 0,36) de T0 à T1 (11900 à 4340 mg/L) puis stabilité du pic autour d'une valeur moyenne de 5200 mg/L de T1 à T3 (4340 à 5600 mg/L), puis de nouveau décroissance de 97% très significative (coefficient multiplicateur de 0,03) de T2 à T4 (5600 à 160 mg/L) et stabilité du pic de T4 à T6 (160 à 285 mg/L).

Conclusions : Les suivis sont comparables, avec des courbes logarithmiques très similaires. Pour les deux réactifs, les concentrations sont du même ordre de grandeur quand elles sont < 500 mg/L et supérieures à 11000 ; entre les deux, elles sont multipliées par 1,5 au-delà de ce seuil en faveur de TBS (8820 vs 4340 ; 9930 vs 5870). La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est très inférieure aux concentrations des CLL, dans un rapport de 1 à 3 : pic 4,4 g/L < 11900 (Siemens) < 12320 (TBS), alors que les concentrations Siemens et TBS sont très voisines.

Le suivi réalisé avec les anticorps polyclonaux est comparable à celui réalisé avec les anticorps monoclonaux.



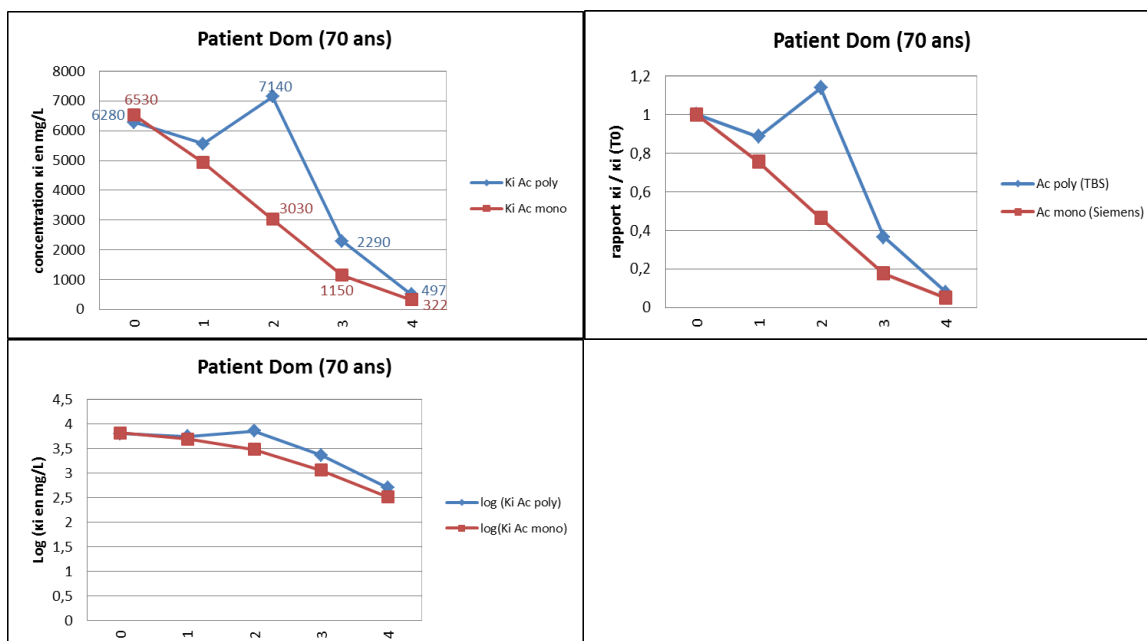
Patient 4 Per : Les suivis ont été réalisés sur une période de 1 an. Le pic électrophorétique était de 6,3 g/L à T5.

TBS : croissance significative de 2141% (coefficient multiplicateur de 22,41) de T0 à T3 (812 à 18200 mg/L) puis plateau oscillant entre 16680 et 23000 mg/L.

Siemens : croissance significative de 1198% de T0 à T3 (531 à 6890 mg/L) puis plateau ascendant non significatif de T3 à T6 (6890 à 7760 mg/L).

Conclusions : l'évolution apparaît en dents de scie avec TBS (Ac polyclonaux) et continue avec Siemens (Ac monoclonaux), mais montre dans tous les cas une ascension globale significative jusqu'à T3. Les suivis représentés avec les courbes logarithmiques sont comparables, similarité révélant une ascension continue. Les concentrations sont du même ordre de grandeur en dessous de 1000 mg/L mais multiplié par 2,5 en moyenne au-delà (18200 vs 6290 ; 18800 vs 7760). La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est comparable à la concentration en CLL mesurée par les anticorps monoclonaux et plus faible dans un rapport de 1 à 3 avec TBS : pic 6,3 g/L \cong 7000 mg/L Siemens < 23000 TBS mg/L.

Le suivi réalisé avec les anticorps polyclonaux est comparable à celui réalisé avec les anticorps monoclonaux.



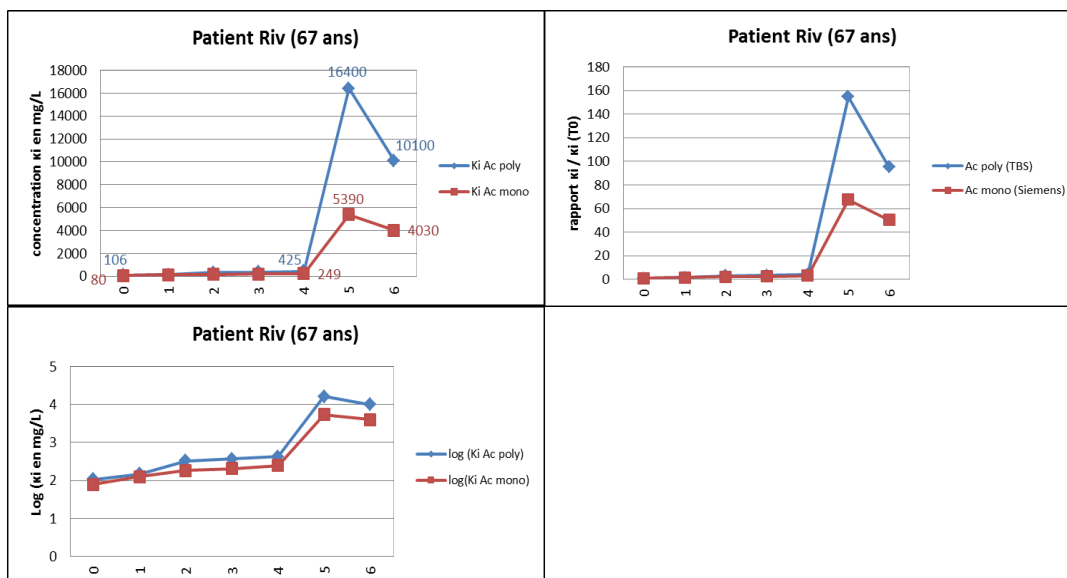
Patient 5 Dom : Les suivis ont été réalisés sur une période de 2 ans. Le pic électrophorétique mesuré à T2 était de 0,85 g/L.

TBS : croissance non significative de 14% (coefficient multiplicateur de 1,14) de T0 à T2 (6280 à 7140 mg/L) puis décroissance continue très significative de 93% (coefficient multiplicateur de 0,07) de T2 à T4 (7140 à 497 mg/L).

Siemens : Décroissance continue très significative de 95% (coefficient multiplicateur de 0,05) de T0 à T4 (6530 à 322 mg/L).

Conclusions : il n'y a pas de différence significative entre les deux réactifs et tous les modes de représentation montrent une décroissance globale. Les concentrations sont du même ordre de grandeur (6530 vs 6280 ; 497 vs 322), à l'exception d'un pic à T2 de 7140 avec TBS et de 3030 avec Siemens. La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est très inférieure aux concentrations en CLL dans un rapport de 1 à 4 et de 1 à 9: pic 0.85 g/L < 3030 mg/L (Siemens) < 7140 mg/L (TBS).

Le suivi réalisé avec les anticorps polyclonaux est comparable à celui réalisé avec les anticorps monoclonaux.



Patient 6 Riv : Les suivis ont été réalisés sur une période de 2 ans. Le pic électrophorétique était de 3,7 g/L à T5.

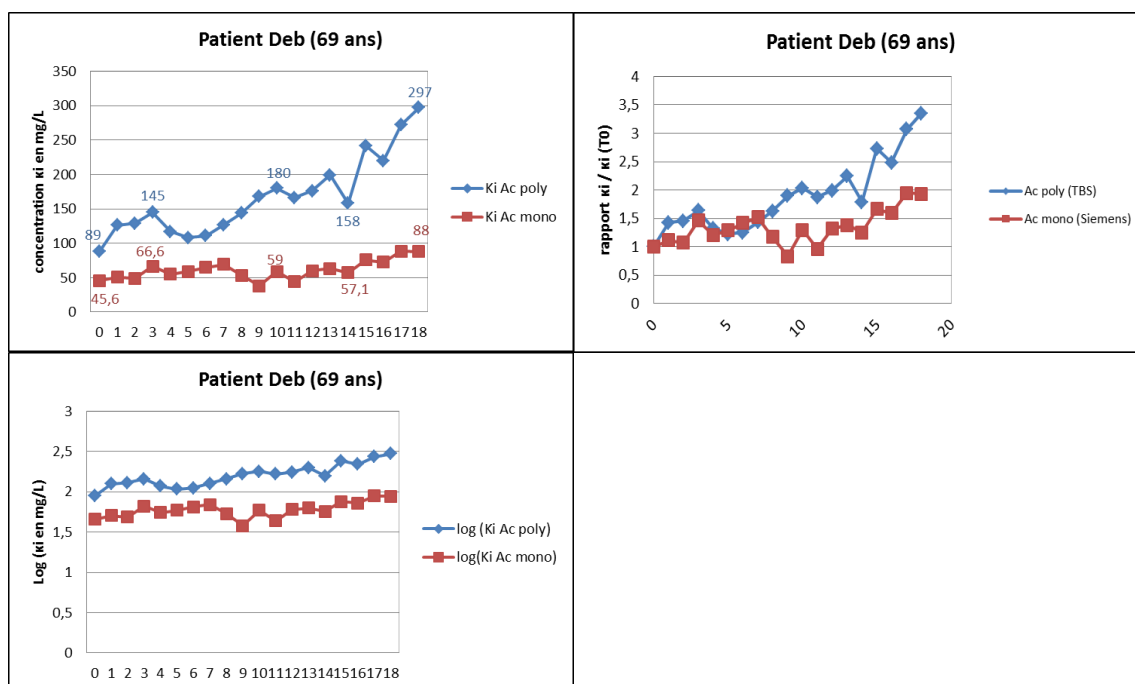
TBS : ascension significative de 301% (coefficient multiplicateur de 4,01) entre T0 et T4 (106 à 425 mg/L) puis ascension hautement significative de 3759% (coefficient multiplicateur de 38,59) à T5 (425 à 16400 mg/L) puis décroissance non significative de 38% (coefficient multiplicateur de 0,62) à T6 (16400 à 10100 mg/L).

Siemens : ascension significative de 211% (coefficient multiplicateur de 3,11) entre T0 à T4 (80 à 249) puis ascension hautement significative de 2065% (coefficient multiplicateur de 21,65) à T5 (249 à 5390 mg/L) puis décroissance de 25% non significative (coefficient multiplicateur de 0,75) à T6 (5390 à 4030 mg/L).

Conclusions : Il n'y a pas de différence significative entre les modes de représentation. Il y a peu de différence entre les concentrations pour les valeurs faibles (1000 mg/L) mais les concentrations observées avec les Ac polyclonaux (TBS) sont en moyenne 3,5 fois plus élevée qu'avec les Ac monoclonaux (Siemens) (16400 vs 5390 et 10100 vs 4030). La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est très inférieure aux concentrations en CLL dans un rapport de 1 à 1,5 et de 1 à 4,5: pic 3,7 g/L < 5390 mg/L (Siemens) < 16400 (TBS).

Le suivi réalisé avec les anticorps polyclonaux est comparable à celui réalisé avec les anticorps monoclonaux.

Sans détection de pic à l'électrophorèse



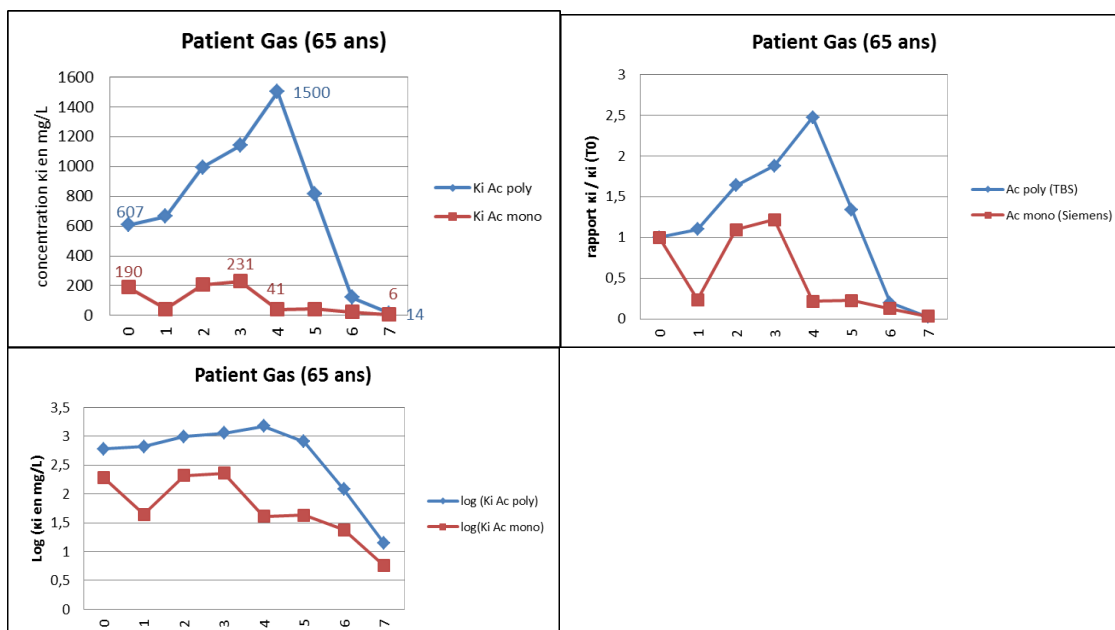
Patient 7 Deb : Les suivis ont été réalisés sur une période de 2 ans.

TBS : ascension progressive et significative de 233% (coefficient multiplicateur de 3,33) de T0 à T18 (89 à 297 mg/L). La représentation logarithmique illustre également cette lente ascension des CLL.

Siemens : ascension progressive et significative de 93% (coefficient multiplicateur de 1,93) de T0 à T18 (45,6 à 88 mg/L). La représentation logarithmique illustre également cette lente ascension des CLL.

Conclusions : évolution lente mais significative de la concentration en CLL pour les deux techniques. Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont en moyenne 2,8 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux (89 vs 46 ; 180 vs 59 ; 297 vs 88).

Le suivi réalisé avec les anticorps polyclonaux est comparable à celui réalisé avec les anticorps monoclonaux.



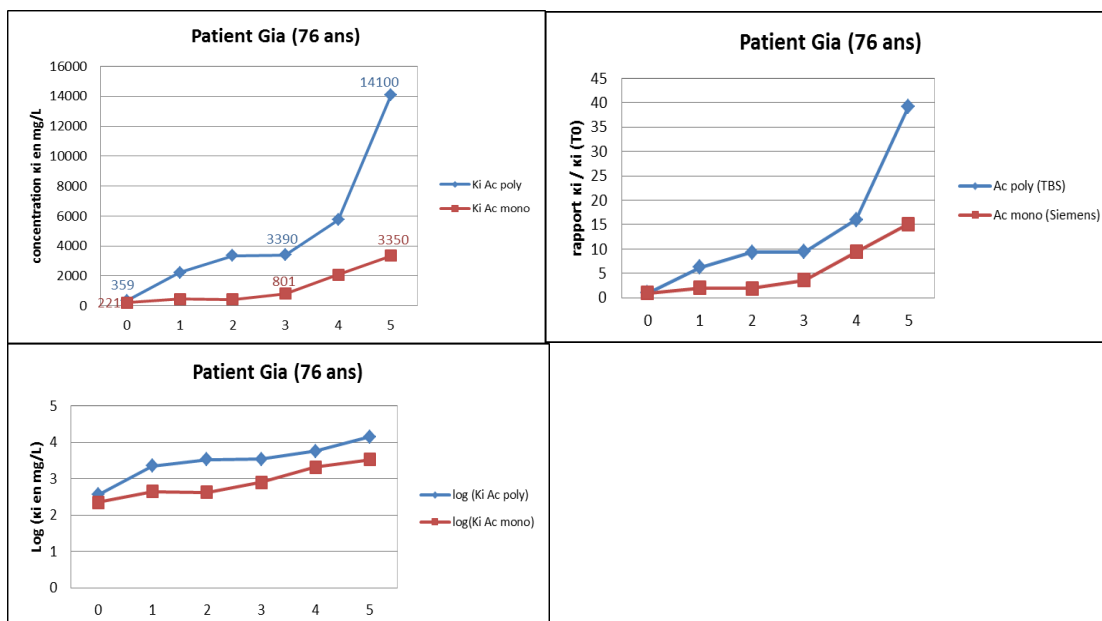
Patient 8 Gas : Les suivis ont été réalisés sur une période de 2 ans.

TBS : pour tous les modes de représentation, ascension significative de 147% (coefficient multiplicateur de 2,47) entre T0 et T4 (607 à 1500 mg/L) et une décroissance hautement significative de 99% (coefficient multiplicateur de 0,01) entre T4 et T7 (1500 à 14 mg/L). Quant à la représentation logarithmique, elle est plus lissée et le pic à T4 est moins visible.

Siemens : phase de plateau entre T0 et T3 puis la décroissance de 97% (coefficient multiplicateur de 0,03) hautement significative (231 à 6 mg/L). Quant à la représentation logarithmique, elle n'apporte aucune information supplémentaire.

Conclusions : discordance modérée entre les deux techniques où, avec TBS, on observe une ascension puis une décroissance à partir de T4 et avec Siemens un plateau puis une décroissance à partir de T4 (Siemens). Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont en moyenne 4 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux (607 vs 190 ; 1500 vs 230 ; 14 vs 6).

Le suivi réalisé avec les anticorps polyclonaux diffère de celui réalisé avec les anticorps monoclonaux, avec dans un cas un plateau (Ac monoclonaux) et dans l'autre une phase évolutive avec croissance des CLL (Ac polyclonaux).



Patient 9 Gia : Les suivis ont été réalisés sur une période de 1 an.

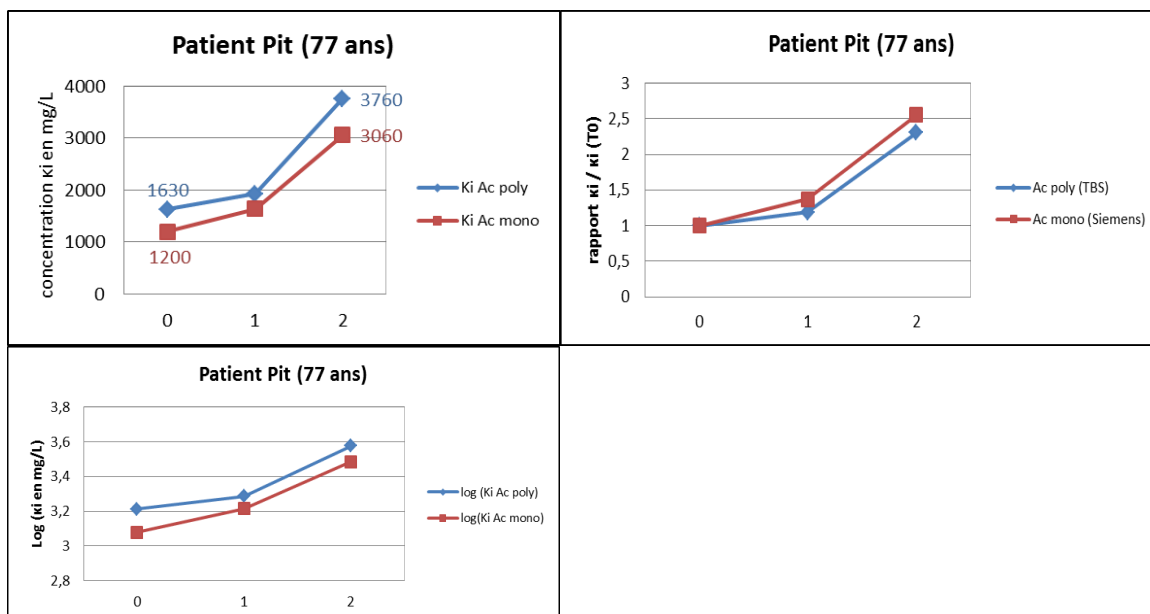
TBS : ascension progressive et significative de 844% (coefficient multiplicateur de 9,44) entre T0 et T3 (359 à 3390mg/L) puis brutale et significative de 316% (coefficient multiplicateur de 4,16) entre T3 et T5 (3500 à 14100 mg/L).

Aspect lissé de la courbe logarithmique avec décrochage à T4 moins visible

Siemens : passage de 221 mg/L à T0 à 801 à T3 et à 3350 à T5, soit une augmentation significative de 262% (coefficient multiplicateur de 3,62) puis de 318% (coefficient multiplicateur de 4,18).

Conclusions : suivis comparables, avec des courbes logarithmiques très similaires. Les concentrations sont du même ordre de grandeur en dessous de 500 mg/L mais multiplié par 4,2 au-delà (3390 vs 801 ; 14100 vs 3350).

Le suivi réalisé avec les anticorps polyclonaux est comparable à celui réalisé avec les anticorps monoclonaux.



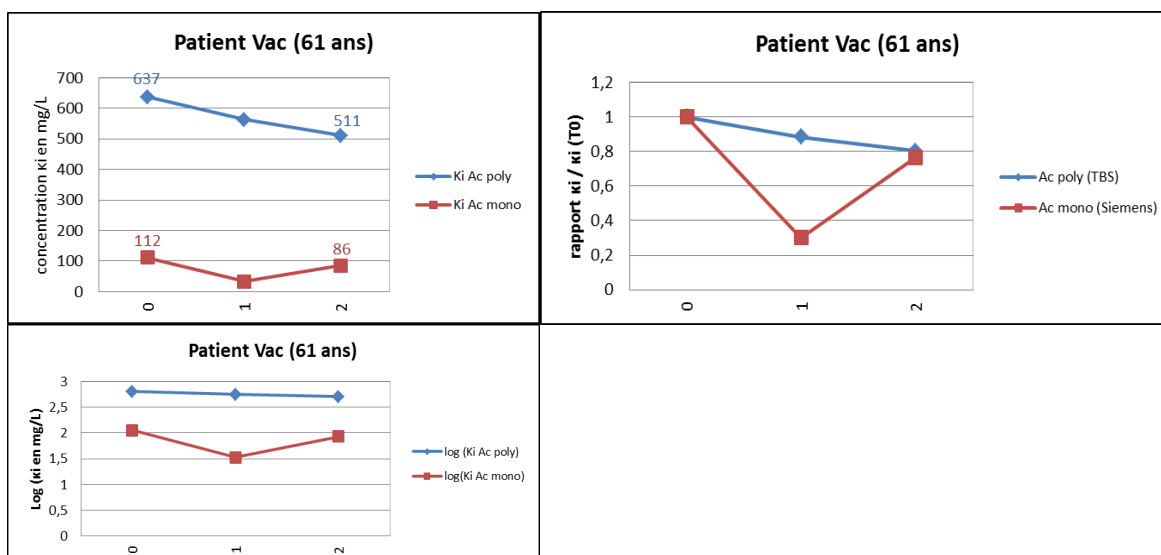
Patient 10 Pit : Les suivis ont été réalisés sur une période de 1 mois.

TBS : ascension continue de T0 à T2 de 131% (coefficient multiplicateur de 2,3)

Siemens : ascension continue de T0 à T2 de 155% (coefficient multiplicateur de 2,6)

Conclusions : Toutes les représentations montrent une évolution parallèle de la concentration des CLL. Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont du même ordre de grandeur avec les concentrations mesurées par les Ac polyclonaux (TBS).

Le suivi réalisé avec les anticorps polyclonaux est comparable à celui réalisé avec les anticorps monoclonaux.



Patient 11 Vac : Les suivis ont été réalisés sur une période de 1 an et demi.

TBS : plateau avec des concentrations oscillant autour d'une valeur moyenne de 580 mg/L

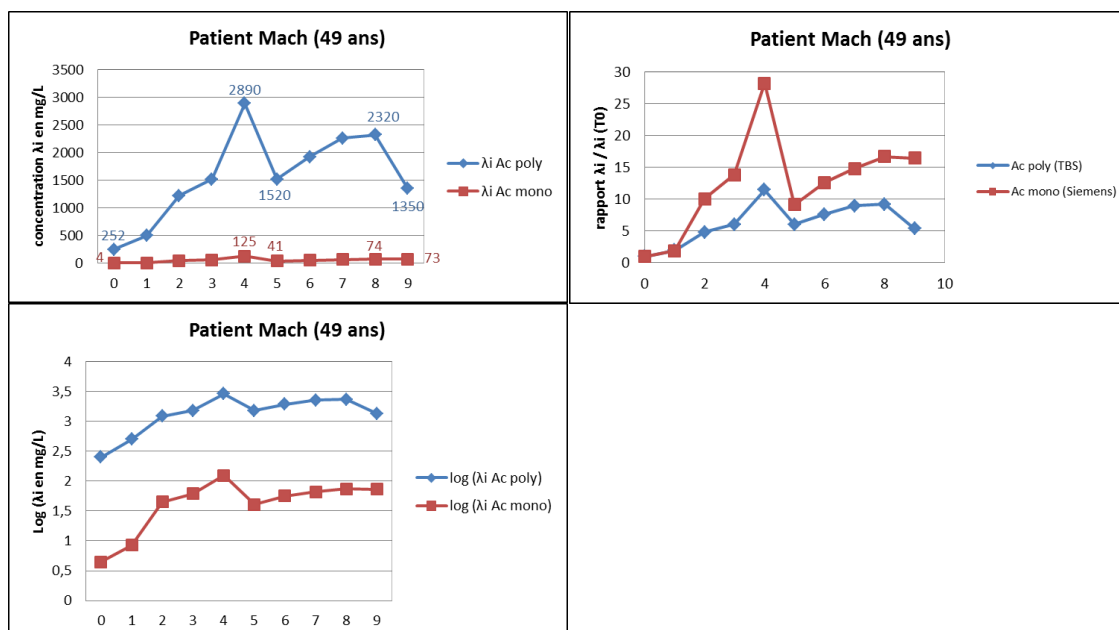
Siemens : plateau avec des concentrations oscillant autour d'une valeur moyenne de 83 mg/L

Conclusions : Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont en moyenne 5,5 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux.

Le suivi réalisé avec les anticorps polyclonaux est comparable à celui réalisé avec les anticorps monoclonaux.

CLL impliquée λ

Avec détection d'un pic électrophorétique mesurable

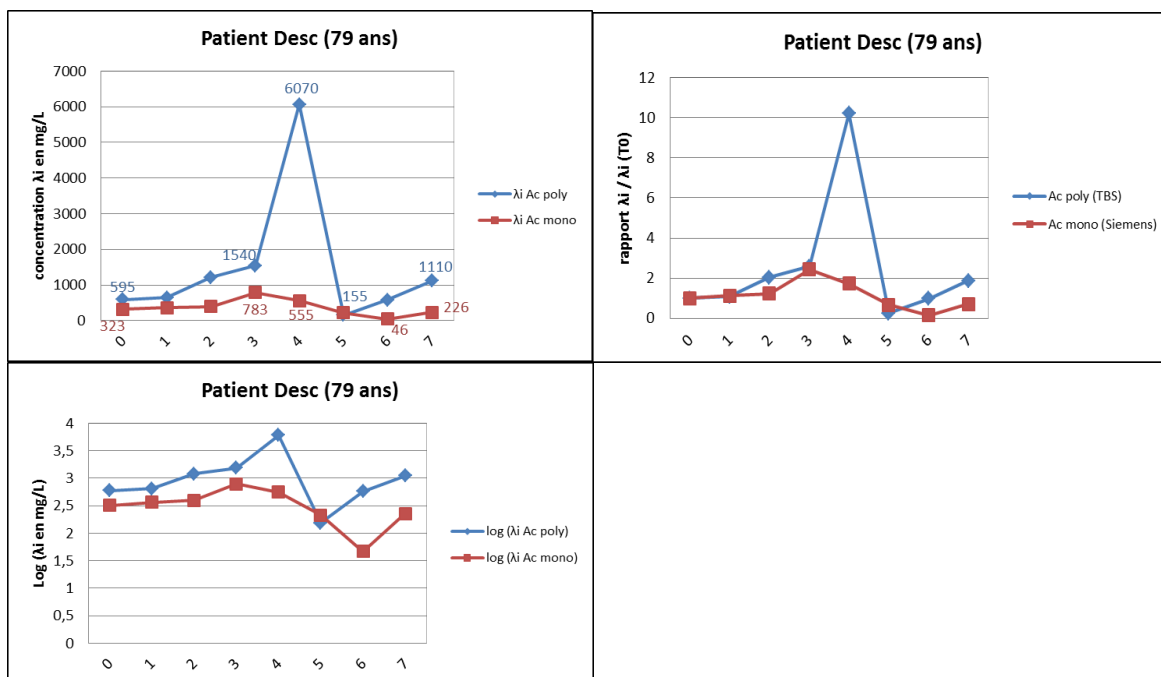


Patient 12 Mach : Les suivis ont été réalisés sur une période de 3 mois. Le pic électrophorétique était de 3,2 g/L à T4.

TBS : ascension significative de 1047% (coefficient multiplicateur de 11,47) de T0 à T4 (252 à 2890 mg/L) puis décroissance non significative de 47% (coefficient multiplicateur de 0,53) de T4 à T5 (2890 à 1520 mg/L) puis une ascension significative de 53% (coefficient multiplicateur de 1,53) de T5 à T8 (1520 à 2320 mg/L) avant une décroissance non significative de 42% (coefficient multiplicateur de 0,58) (2320 à 1350 mg/L). La courbe logarithmique montre la croissance globale des concentrations.

Siemens : ascension significative de 3025% (coefficient multiplicateur de 31,25) de T0 à T4 (4 à 125 mg/L) puis après une décroissance rapide significative de 67%, il y a une ascension lente mais significative de 80% (coefficient multiplicateur de 1,80) entre T5 et T8 puis une décroissance non significative de 1% (coefficient multiplicateur de 0,99).

Conclusions : suivis comparables du point de vue qualitatif, entre deux représentations. Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont en moyenne 23 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux (2890 vs 125). La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est comparable à la concentration en CLL mesurée par les anticorps polyclonaux et 25 fois plus élevée qu'avec les anticorps monoclonaux (Siemens), ce qui démontre la réelle sous-estimation par des CLL λ par les anticorps monoclonaux : 125 mg/L (Siemens) < pic de 3,2 g/L \cong 2890 mg/L (TBS).

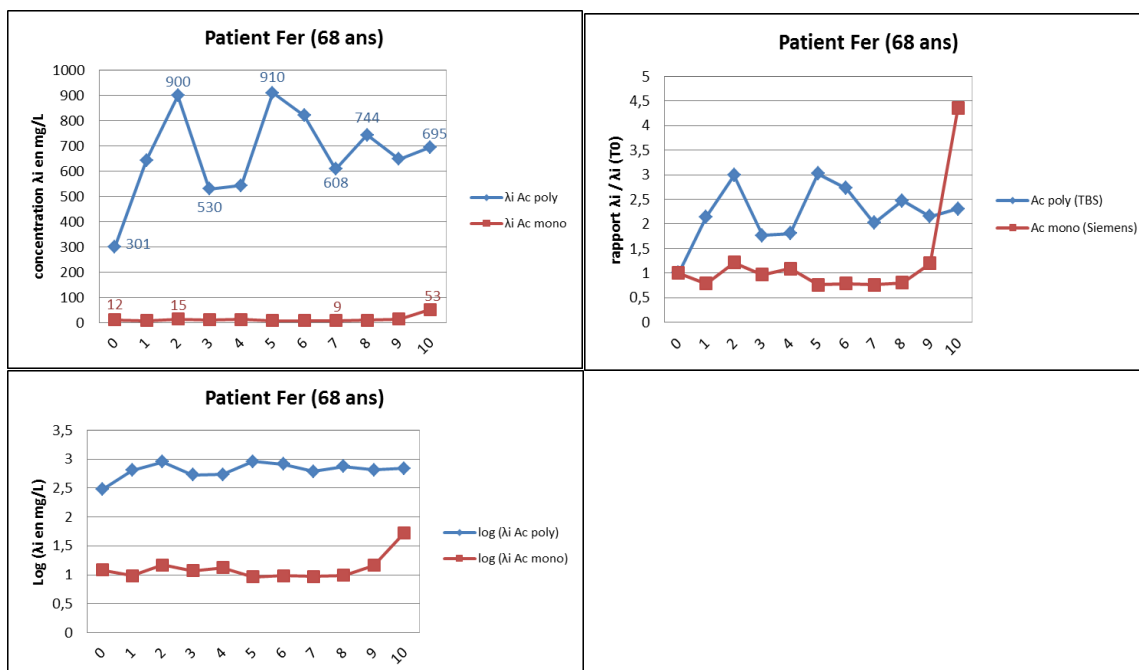


Patient 13 Desc : Les suivis ont été réalisés sur une période de 1 an. Le pic électrophorétique à T4 était de 1,7 g/L.

TBS : après une ascension significative de 159% et de coefficient multiplicateur de 2,6 de T0 à T3, un pic est observé en T4 (ascension de 294% ; 1540 à 6070 mg/L; coefficient multiplicateur de 3,9) puis une décroissance significative de 97% (coefficient multiplicateur de 0,03) de T4 à T5 (6070 à 155 mg/L) et s'en suit une ascension significative de 616% (coefficient multiplicateur de 7,2).

Siemens : avec cette technique, après une ascension significative de 142% (coefficient multiplicateur de 2,42) de T0 à T3, une décroissance de 94% (coefficient multiplicateur de 0,06) est observée jusque T6 avant une ascension de 391% (coefficient multiplicateur de 4,91) jusque T7 (46 à 226 mg/L)

Conclusions : suivis comparables en ce qui concerne les croissances et décroissances successive, cependant celles-ci n'apparaissent pas au même temps pour les deux techniques. Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont en moyenne 2 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux, à l'exception du pic noté en T4 dont la concentration est 10 fois plus élevée avec les anticorps polyclonaux (6070 vs 555 mg/L). La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est comprise entre les concentrations des CLL mesurées avec Siemens et TBS : 555 mg/L (Siemens) < pic 1,7g/L < 6070 mg/L (TBS).

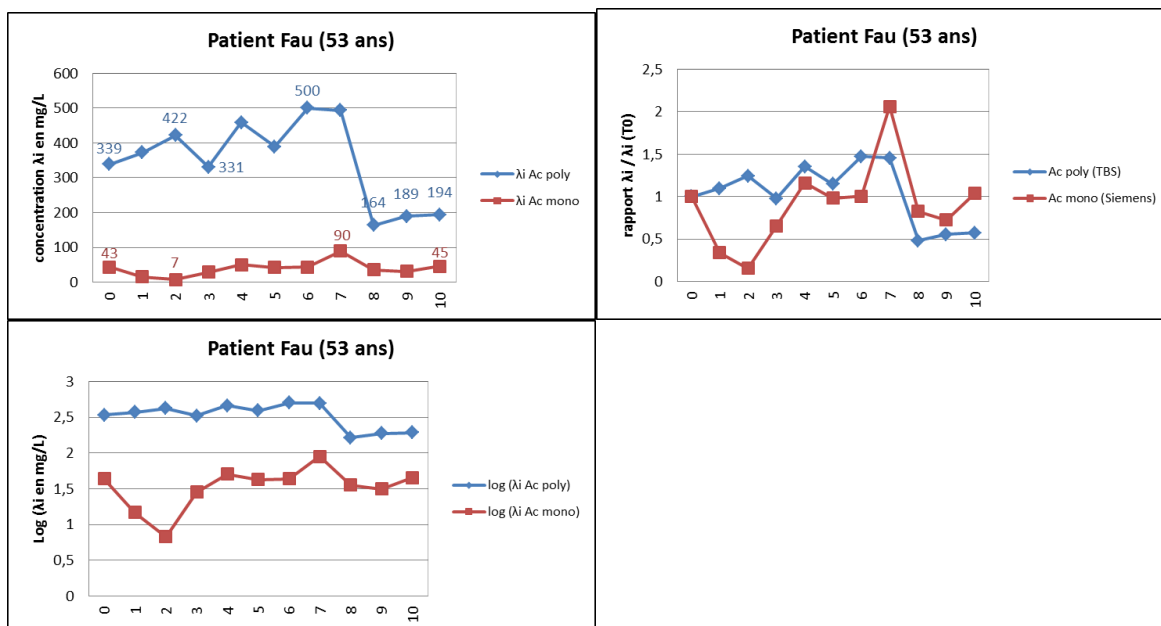


Patient 14 Fer : Les suivis ont été réalisés sur une période de 2 ans. Le pic électrophorétique à T10 était de 0,6 g/L.

TBS : Le suivi présente un profil en dents de scie jusque T8 avec alternance d'ascensions significatives (T0 à T2 : 199% ; T3 à T5 : 72%), de décroissances non significatives (41% entre T2 et T3, 33% entre T5 et T7) puis d'un plateau entre T8 et T10 (608 à 695). Au total, en l'espace de 24 mois, la concentration est passée de 301 mg/L à 695 mg/L soit un taux de variation de 130% et un coefficient multiplicateur de 2,3, ce qui peut être considéré comme une évolution très lente qui est relativement bien montrée par la représentation logarithmique.

Siemens : L'ensemble des représentations de l'évolution de la concentration des CLL λ montre l'existence de T0 à T8 d'un plateau, où les concentrations sont toutes situées à l'intérieur de l'intervalle des valeurs usuelles des anticorps monoclonaux. De T7 à T10, on observe une ascension significative de 489% (coefficient multiplicateur de 5,89 et passage de 9 à 53 mg/L)

Conclusions : Le suivi TBS présente un profil en dent de scie alors que celui de Siemens est relativement stable. Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont en moyenne 60 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux, à l'exception de celles à T10 qui est 13 fois plus élevée. La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est très proche de la concentration mesurée par les anticorps polyclonaux ; en effet, 53 mg/L (Siemens) < pic 0,6 g/L \cong 695 mg/L (TBS). Avec les anticorps monoclonaux, on passe complètement à côté d'un excès de CLL λ , dont l'existence est parfaitement objectivée par la présence d'un pic électrophorétique.

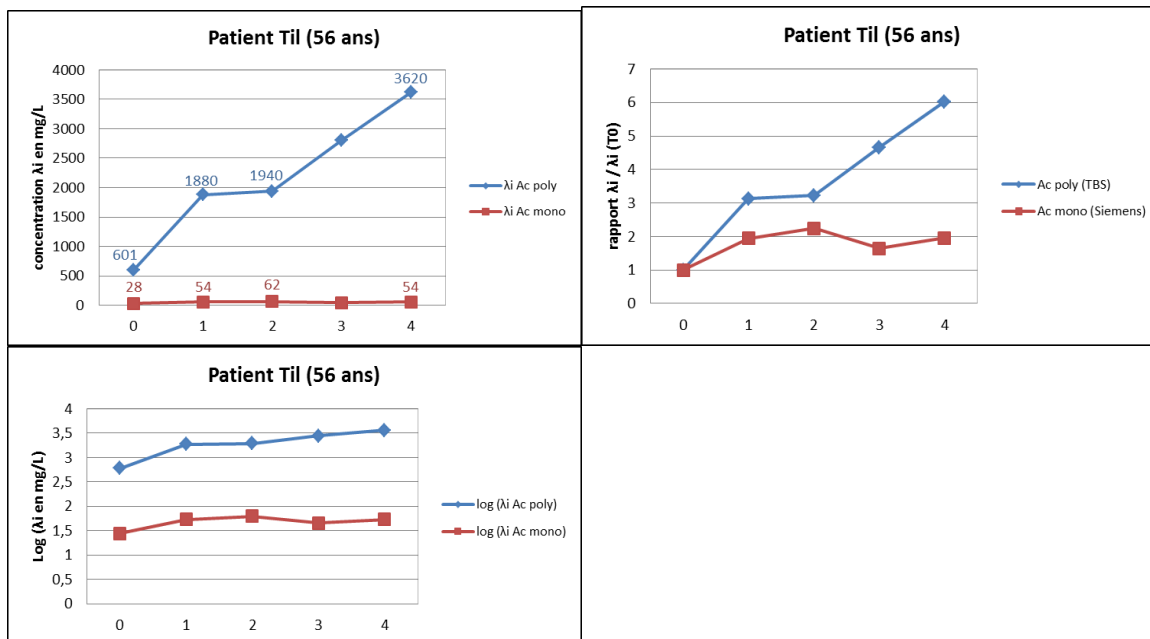


Patient 15 Fau : Les suivis ont été réalisés sur une période de 2 ans. Le pic électrophorétique à T2 était de 1,4 g/L.

TBS : après une phase de plateau de T0 à T6 où les concentrations oscillent autour d'une concentration moyenne de 300 mg/L, survient une croissance significative de 51% (331 à 500) puis une décroissance significative de 61% (500 à 194 mg/L). La représentation logarithmique de la variation des concentrations est plus explicite et objective l'existence d'un plateau jusqu'en T7 puis une décroissance suivi d'un nouveau plateau où les concentrations en CLL oscillent autour d'une valeur moyenne de 180 mg/L

Siemens Après une décroissance significative de 84% entre T0 à T3 (43 à 7 mg/L), on observe une phase de plateau où toutes les concentrations mesurées entre T3 et T6 oscillent autour d'une concentration moyenne de 40 mg/L. Comme pour TBS survient un pic en T7, lui-même suivi d'une phase de plateau où les concentrations oscillent de nouveau autour de 40 mg/L.

Conclusions : Le niveau des concentrations observées avec les anticorps polyclonaux facilite une interprétation qui est beaucoup plus difficile à faire avec les monoclonaux. Dans le premier cas, il y a un plateau suivi d'une décroissance puis d'un plateau. Pour l'autre, il est difficile de trancher entre plateau et ascension. Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont entre 5 et 60 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux. Le pic électrophorétique mesuré à T2 est probablement surestimé en raison d'un fond polyclonal important, mais en tout cas, on peut assurer que sa concentration était très supérieure à 7 mg/L. On peut donc conclure que, dans le cas de ce patient, il y a une très forte sous- estimation des CLL λ : 7 mg/L (Siemens) < 422 mg/L (TBS) < pic 1,4 g/L.

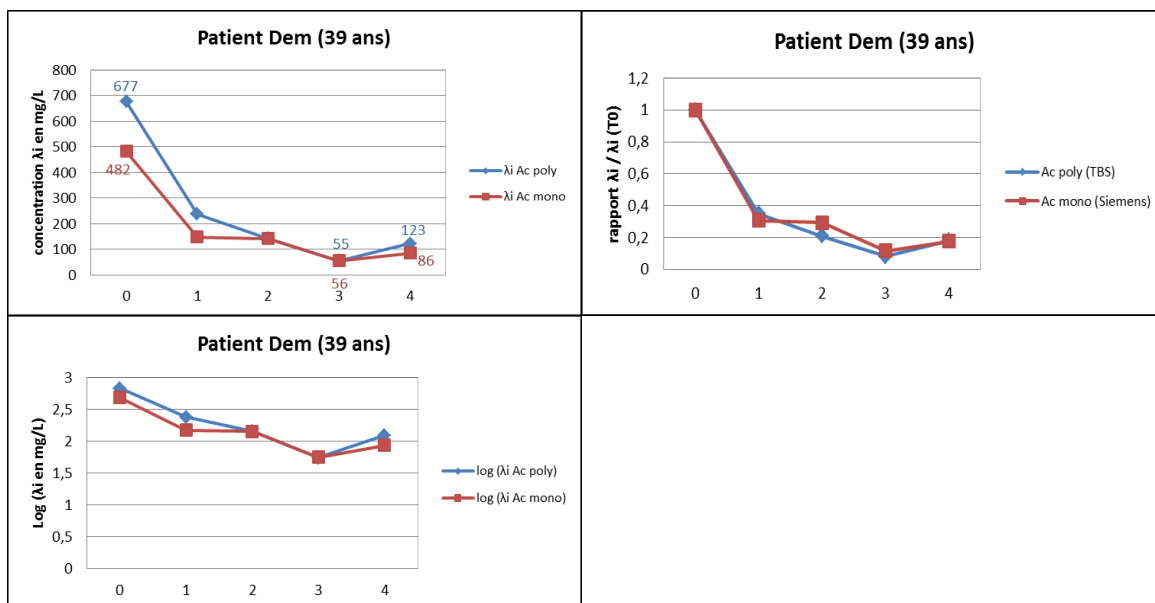


Patient 16 Til : Les suivis ont été réalisés sur une période de 10 mois. Le pic électrophorétique à T4 était de 0,63 g/L.

TBS : Ce suivi montre une ascension significative de 502% (coefficient multiplicateur de 6,02) entre T0 à T4 (601 à 3620 mg/L), avec un plateau à T1 et T2.

Siemens : après une ascension significative de 121% de T0 à T2 (28 à 62 mg/L), une phase de plateau est observée où les concentrations oscillent autour d'une moyenne de 50 mg/L.

Conclusions : De T0 à T2, l'évolution des concentrations de CLL est comparable mais diverge aux points suivants : ascension du pic pour TBS et plateau pour Siemens. Concernant les concentrations, celles observées avec les anticorps polyclonaux (TBS) sont de 31 à 67 fois plus élevées que celles de Siemens, pour de fortes concentration (>1000 mg/L). La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution étant de 630 mg/L, on peut en déduire qu'il y a forte sous-estimation de la concentration en CLL à ce temps, même si effectivement, et à un bien moindre degré, il y a une surestimation de la part des anticorps polyclonaux : 54 mg/L (Siemens) < pic 0,63 g/L < 3620 mg/L (TBS).

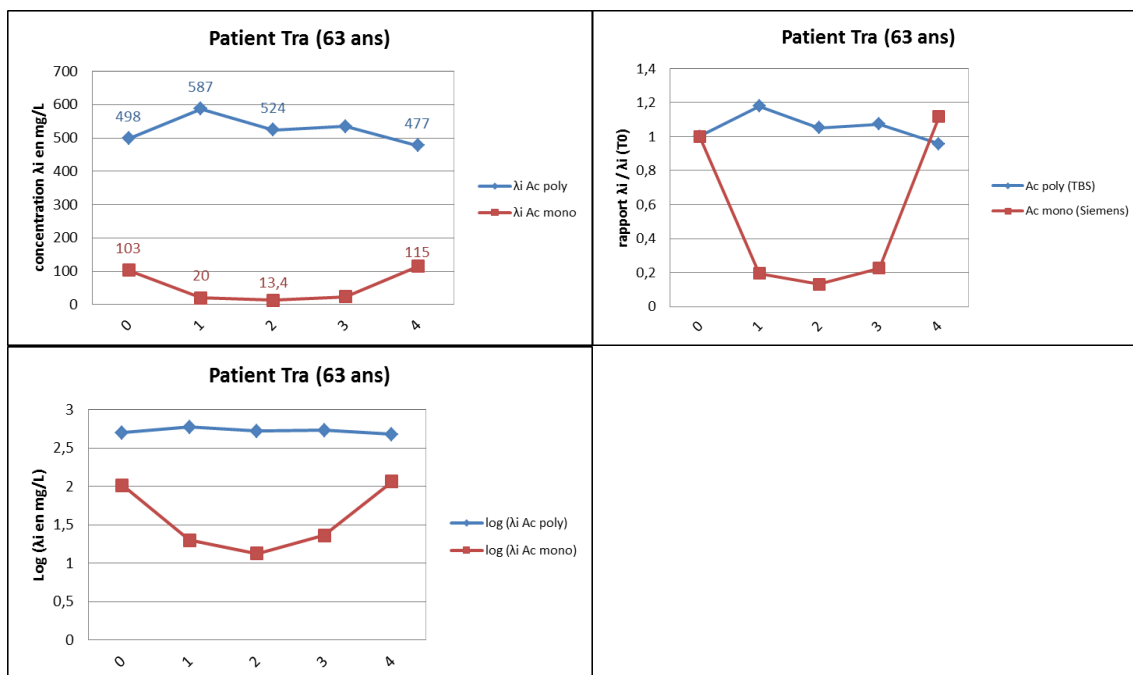


Patient 17 Dem : Les suivis ont été réalisés sur une période de 2 ans. Le pic électrophorétique à T0 était de 3,6 g/L.

TBS : décroissance significative de 82% de T0 à T4 (677 à 123 mg/L).

Siemens : décroissance significative de 82% de T0 à T4 (482 à 86 mg/L).

Conclusions : suivis comparables entre toutes les représentations. Les niveaux de concentrations obtenues avec les Ac polyclonaux sont du même ordre de grandeur que ceux observés avec monoclonaux : ils sont en moyenne 1,4 fois plus élevées que ceux obtenus avec les Ac monoclonaux. La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est supérieure aux concentrations des CLL, probablement en raison d'un bruit de fond gammaglobulinique important : 482 mg/L (Siemens) < 677 mg/L (TBS) < pic 3,6 g/L.

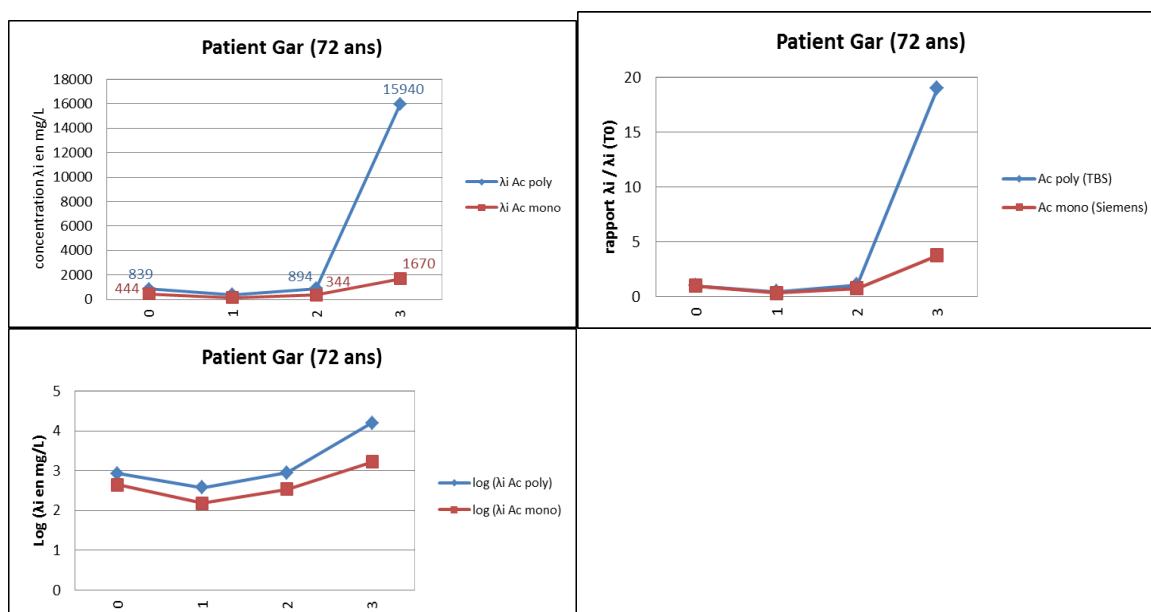


Patient 18 Tra : Les suivis ont été réalisés sur une période de 9 mois. Le pic électrophorétique à T1 était de 0,61 g/L.

TBS : Visualisation d'un plateau où toutes les concentrations oscillent autour d'une valeur moyenne de 520 mg/L

Siemens : évolution des concentrations difficiles à interpréter car on observe dès T1 un retour à la normale, les concentrations de T1, T2 et T3, étant situées à l'intérieur de l'intervalle des valeurs usuelles Siemens et à T4 un retour au niveau initial autour de 100 mg/L.

Conclusions : Il y a une discordance majeure entre les deux réactifs puisque dans un cas on observe un retour à la normale de T1 à T3 (Siemens) alors que dans l'autre cas, avec TBS, on observe pendant la même période un plateau constitué par des concentrations très pathologiques, de plus de 20 fois la limite supérieure de l'intervalle de normalité. De même que pour les suivis des autres patients, on retrouve au niveau des concentrations mesurées un facteur multiplicatif variant entre 4 et 30 en faveur de TBS. Comme précédemment également la concentration du pic électrophorétique mesurée à T1 à 610 mg/L, est très voisine de la concentration en CLL TBS (587 mg/L), ce qui démontre la réelle sous-estimation des CLL λ par les anticorps monoclonaux : 20 mg/L (Siemens) < pic 0.61 g/L \cong 587 mg/L (TBS) .

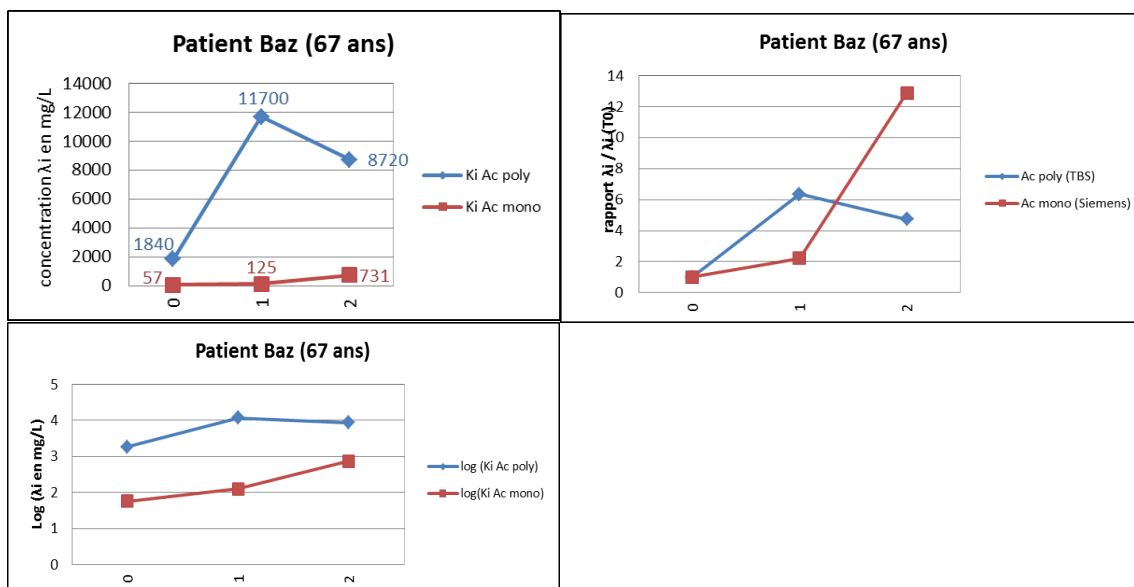


Patient 19 Gar : Les suivis ont été réalisés sur une période de 11 mois. Le pic électrophorétique était de 1,14 g/L à T2 et 7,7 g/L à T3.

TBS : après un plateau autour d'une concentration moyenne de 850 mg/L, on observe de T2 à T3 une ascension très significative de 1683%, soit un facteur multiplicatif de 18 (894 à 15940 mg/L).

Siemens : on retrouve ce même plateau avec Siemens avec des concentrations qui oscillent autour d'une concentration moyenne de 400 mg/L. Comme pour TBS, ce plateau est suivi d'une ascension significative de 385% de T2 à T4 (344 à 1670 mg/L).

Conclusions : quel que soit le mode de représentation de l'évolution des concentrations au cours du temps, les courbes sont comparables. On relève un coefficient multiplicateur de 9,5 entre les deux techniques (15940 vs 1670), pour des concentrations > 1000 mg/L. Comme pour le patient précédent, la concentration du pic électrophorétique mesurée à T2 (7,7 g/L) est beaucoup plus proche de la concentration en CLL mesurée avec les anticorps polyclonaux (15940 mg/L) que de celle mesurée avec les anticorps monoclonaux (1670 mg/L). Un exemple de plus de la réelle sous-estimation des CLL λ par les anticorps monoclonaux : 1670 mg/L (Siemens) < pic 7,7 g/L < 15940 mg/L (TBS)

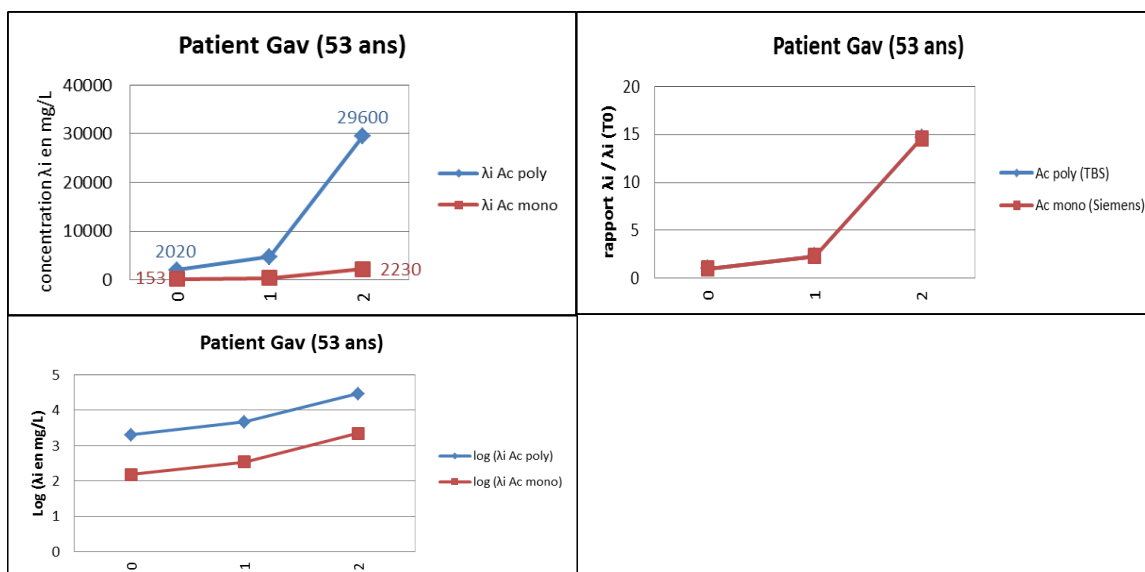


Patient 20 Baz : Les suivis ont été réalisés sur une période de 8 mois. Le pic électrophorétique à T2 était de 6 g/L.

TBS : Ascension de 842% (coefficient multiplicateur de 6,4) de la concentration en CLL de T0 à T1 suivie d'une diminution non significative de T1 à T2.

Siemens : ascension continue de T0 à T2 de 1182% (coefficient multiplicateur de 12)

Conclusions : bien qu'il soit difficile de tirer des conclusions catégoriques à partir de 3 points séparés dans le temps par 8 mois, les deux réactifs montrent qu'il y a une tendance globale à l'augmentation de synthèse des CLL, mieux mise en évidence par la représentation logarithmique. Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont entre 12 et 90 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux. Comme pour le patient précédent, la concentration du pic électrophorétique mesurée à T2 (6 g/L) est beaucoup plus proche de la concentration en CLL mesurée avec les anticorps polyclonaux (11700 mg/L) que de celle mesurée avec les anticorps monoclonaux (125mg/L). Un exemple de plus de la réelle sous-estimation des CLL λ par les anticorps monoclonaux : 125 mg/L (Siemens) < pic 6 g/L < 11700 mg/L (TBS).

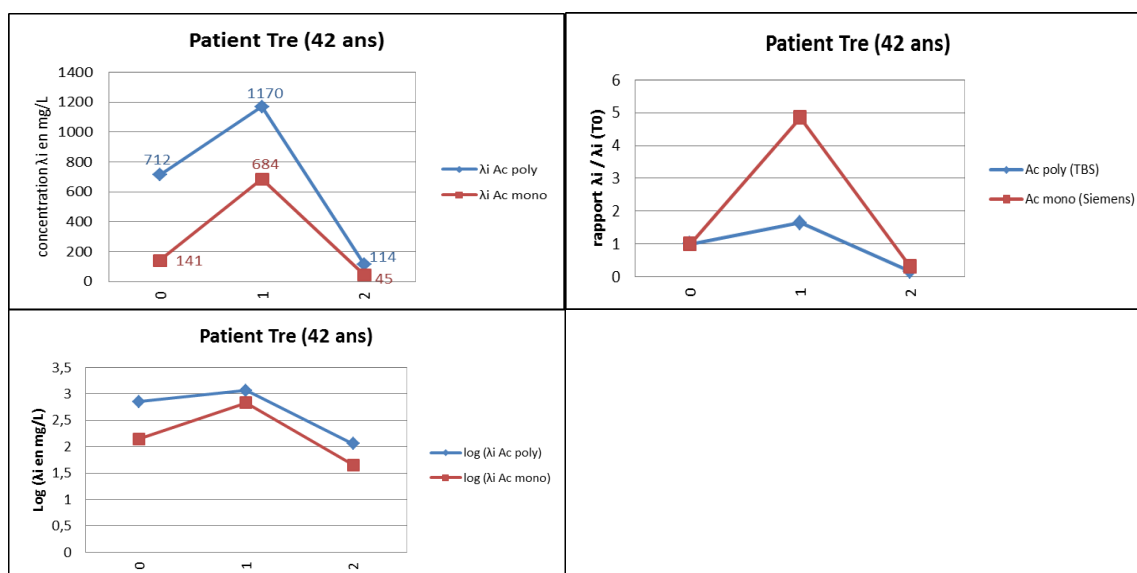


Patient 21 Gav : Les suivis ont été réalisés sur une période de 10 mois. Le pic électrophorétique à T2 était de 6,7 g/L.

TBS : Ascension très significative de 1365% (coefficient multiplicateur de 14,6) entre T0 et T2.

Siemens : Ascension très significative de 1357% (coefficient multiplicateur de 14,6) entre T0 et T2.

Conclusions : Bien que les concentrations mesurées soient très différentes, l'évolution observée est identique pour les deux réactifs. En revanche, les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont 13 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux. La concentration du pic électrophorétique mesurée à T2 (6,7 g/L) est surestimée par les anticorps polyclonaux (29600 mg/L) d'un facteur multiplicateur de 4,4 et sous-estimé par les anticorps monoclonaux (2230mg/L) d'un facteur multiplicateur de 0,33 : 2230 mg/L (Siemens) < pic 6,7 g/L < 29600 mg/L (TBS).

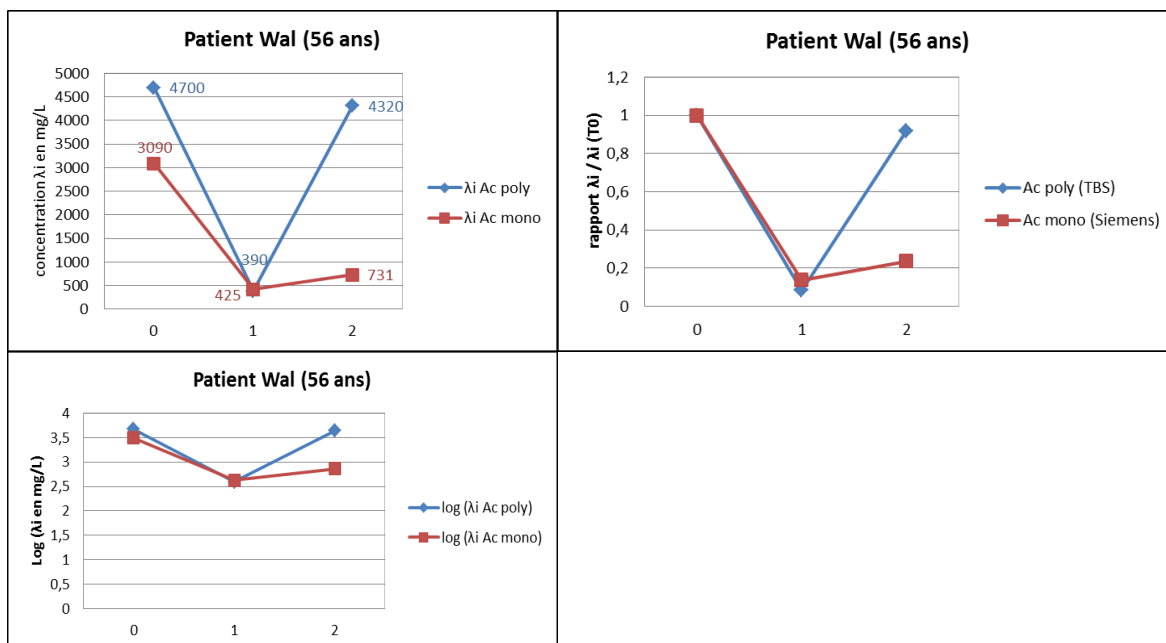


Patient 22 Tre : Les suivis ont été réalisés sur une période de 2 ans. Le pic électrophorétique à T1 était de 1,2 g/L.

TBS : Ascension du pic de T0 à T1 d'un facteur multiplicateur de 1,6 (712 à 1170 mg/L) puis décroissance de T1 à T2 d'un facteur 0,1.

Siemens : Ascension du pic de T0 à T1 d'un facteur multiplicateur de 5 (141 à 684 mg/L) puis décroissance de T1 à T2 d'un facteur 0,06 (684 à 45 mg/L).

Conclusions : Evolution strictement parallèle pour les deux réactifs. Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont entre 2 et 5 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux. Comme pour certains patients, la concentration du pic électrophorétique mesurée à T1 (1,2 g/L) est beaucoup plus proche de la concentration en CLL mesurée avec les anticorps polyclonaux (1170 mg/L) que de celle mesurée avec les anticorps monoclonaux (684 mg/L). Un exemple de plus de la réelle sous-estimation des CLL λ par les anticorps monoclonaux : 684 mg/L (Siemens) < pic 1,2 g/L \cong 1170 mg/L (TBS).



Patient 23 Wal : Le suivi a été réalisé sur une période de 2 ans. Le pic électrophorétique à T0 était de 2,3 g/L et à T2 de 1,6 g/L.

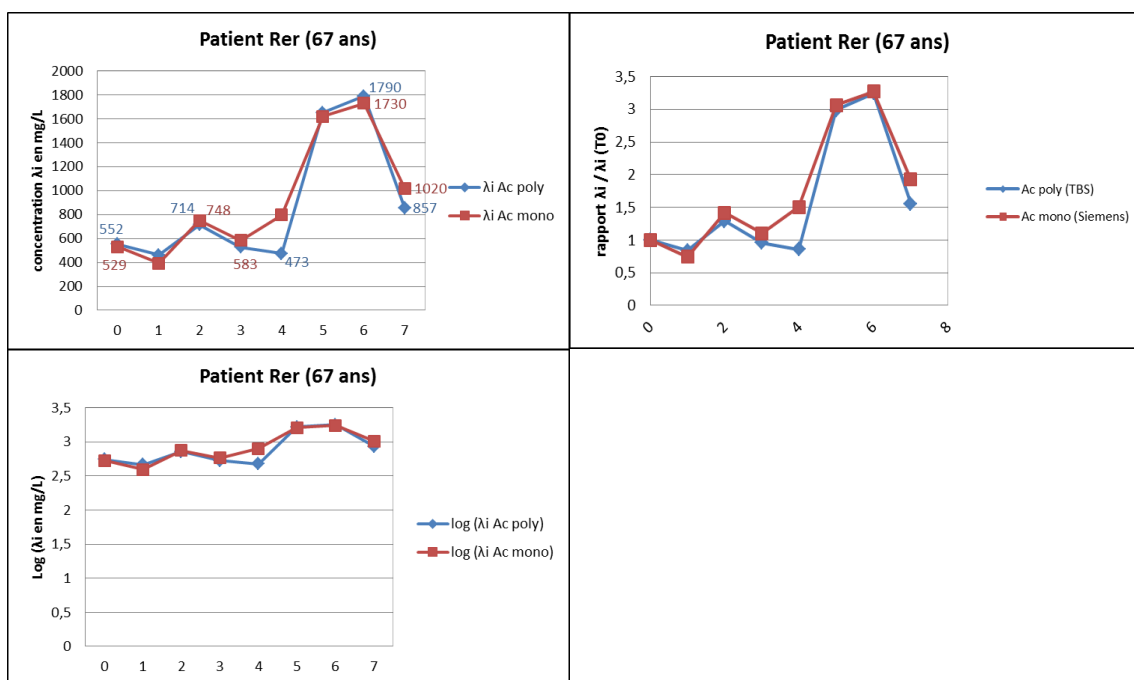
TBS : décroissance significative de 92% (facteur multiplicatif de 0,08) entre T0 et T1 (4700 à 390 mg/L) et croissance de 1008% (facteur multiplicatif de 11) entre T1 et T2 (390 à 4320 mg/L).

Siemens : décroissance significative de 86% (facteur multiplicatif de 0,15) entre T0 et T1 (3090 à 425 mg/L) et croissance de 72% (facteur multiplicatif de 1,7) entre T1 et T2 (425 mg/L à 731).

Conclusions : évolution comparable selon que l'on considère l'une ou l'autre méthode.

Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont 1,5 fois plus élevées à T0 et 6 fois plus élevées à T2 que celles obtenues avec les Ac monoclonaux. La concentration du pic électrophorétique mesurée à T0 est inférieure aux concentrations des CLL, dans un rapport de 1 à 1,3 et 1 à 2 respectivement : pic 2,3 g/L < 3090 mg/L (Siemens) < 4700 mg/L (TBS). La concentration du pic électrophorétique mesurée à T2 est comprise entre les concentrations des CLL de TBS et siemens, mais plus proche de ces dernières : 731 mg/L (Siemens) < pic 1,6 g/L < 4320 mg/L (TBS).

Sans détection de pic à l'électrophorèse

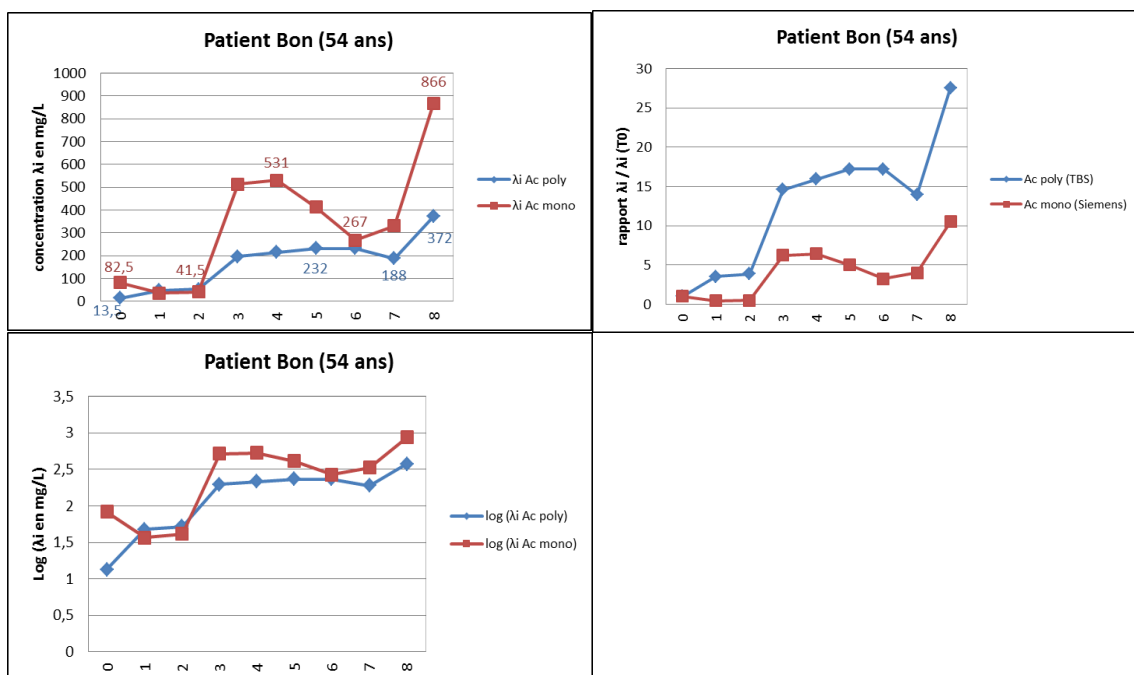


Patient 24 Rer: Les suivis ont été réalisés sur une période de 1 an.

TBS : plateau de T0 à T4 représenté par des concentrations oscillant autour d'une valeur moyenne de 560 mg/L puis ascension significative de 278% de T4 à T6 (473 à 1790 mg/L) suivie d'une décroissance significative de 52% de T6 à T7 (1790 à 857 mg/L).

Siemens : ascension significative de 227% de T0 à T6 (529 à 1730 mg/L) puis décroissance non significative de 41% de T6 à T7 (1730 à 1020 mg/L)

Conclusions : suivis comparables avec courbe logarithmiques très similaires. Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont très proches de celles obtenues avec les Ac monoclonaux (552 vs 529 ; 1790 vs 1730).

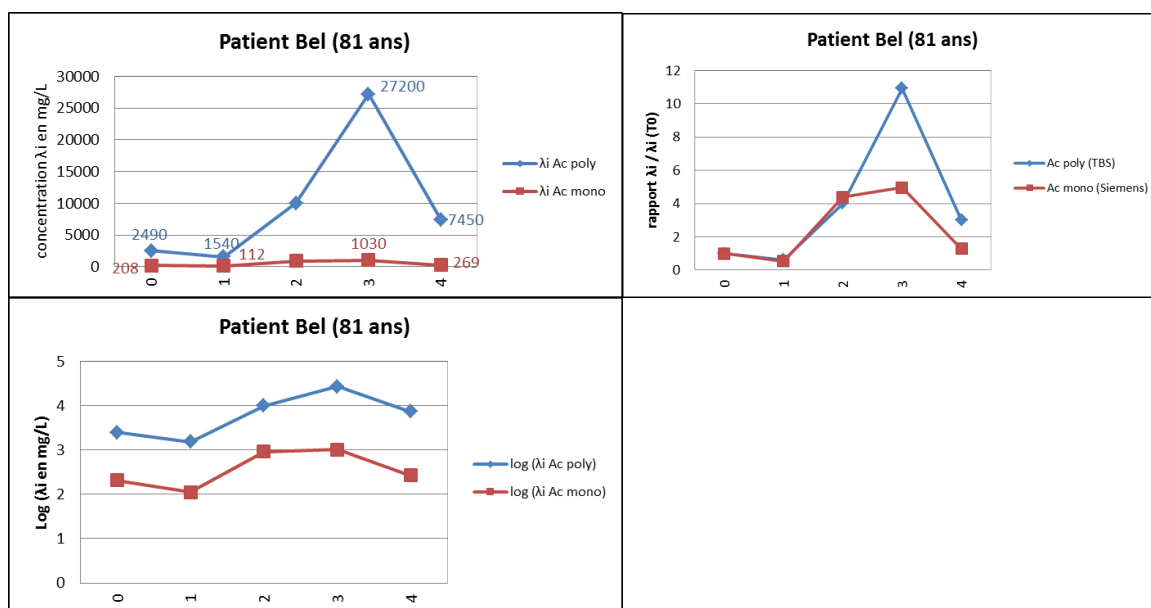


Patient 25 Bon : Les suivis ont été réalisés sur une période de 2 ans.

TBS : ascension significative de 2656% de T0 à T8 (13,5 à 372 mg/L).

Siemens : ascension significative de 544% de T0 à T4 (82,5 à 531 mg/L) puis décroissance de 50% à la limite de la signification de T4 à T6 (531 à 267 mg/L) et ascension significative de 224% de T6 à T8 (267 à 866 mg/L)

Conclusions : suivis comparables, avec une tendance marquée à l'augmentation des concentrations. Les concentrations observées avec les Ac monoclonaux sont en moyenne 2 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac polyclonaux.



Patient 26 Bel : Les suivis ont été réalisés sur une période de 2 ans.

TBS : après un plateau de T0 à T1, accroissement significatif de 1666% de T1 à T3 (1540 à 27200 mg/L) puis décroissance significative de 73% de T3 à T4 (27200 à 7450 mg/L).

Siemens : après un plateau de T0 à T1, accroissement significatif de 820% de T1 à T3 (112 à 1030 mg/L) puis décroissance significative de 74% de T3 à T4 (1030 à 269 mg/L).

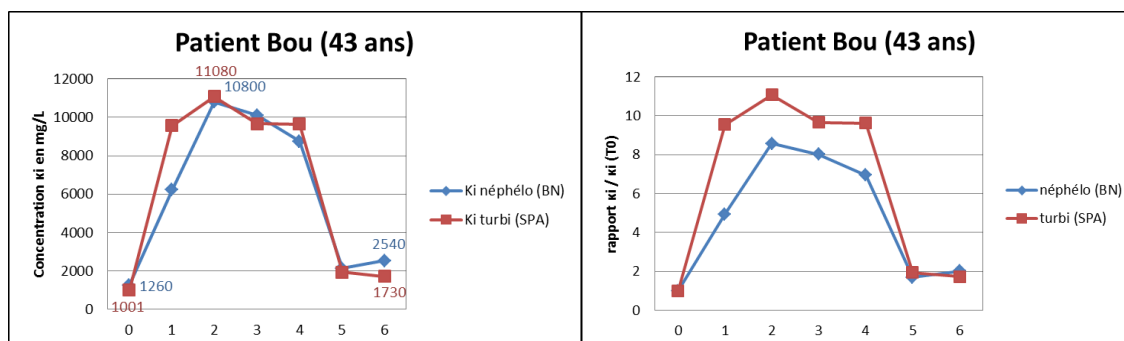
Conclusions : suivis comparables entre les différentes représentations. Les concentrations observées avec les Ac polyclonaux sont entre 13 et 25 fois plus élevées que celles obtenues avec les Ac monoclonaux.

ANNEXES 4

Comparaison de l'évolution en fonction du temps des concentrations en CLL mesurées par la turbidimétrie (SPAplus®) vs néphélométrie (BN Prospec®)

CLL impliquée κ

Avec détection d'un pic électrophorétique mesurable

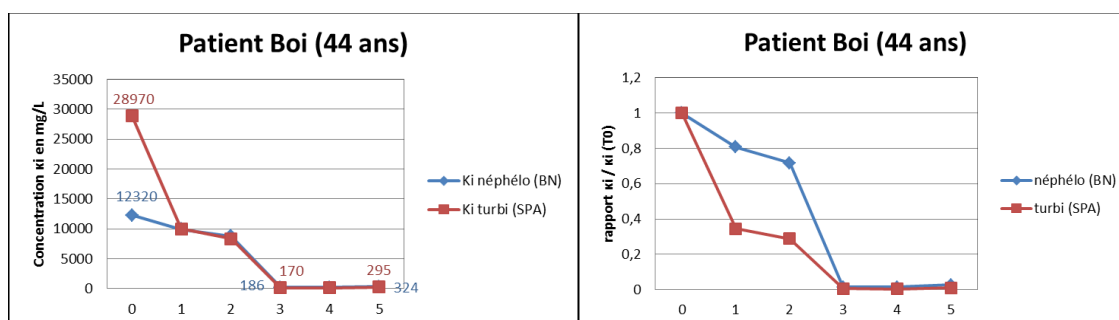


Patient 1 Bou : Les suivis ont été réalisés sur une période de 6 mois. Le pic électrophorétique à T3 était de 3,7 g/L.

BN : ascension significative de 757% (coefficient multiplicateur de 8,57) de T0 à T3 (1260 à 10800 mg/L) puis décroissance significative de 76% (coefficient multiplicateur de 0,24) de T2 à T6 (10800 à 2540 mg/L).

SPA : ascension significative de 1007% (coefficient multiplicateur de 11) de T0 à T2 (1001 à 11080 mg/L) puis décroissance significative de 77% (coefficient multiplicateur de 0,23) de T4 à T8 (11080 à 2540 mg/L)

Conclusions : suivis comparables pour les deux représentations. Les concentrations observées avec la turbidimétrie sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec la néphélométrie, à l'exception de la concentration à T6 qui est 1,5 fois plus élevées (2540 vs 1730). La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est inférieure aux concentrations des CLL, dans un rapport de 1 à 3 : pic 3,5 g/L < 10800 mg/L (néphélo) < 11080 mg/L (turbi).

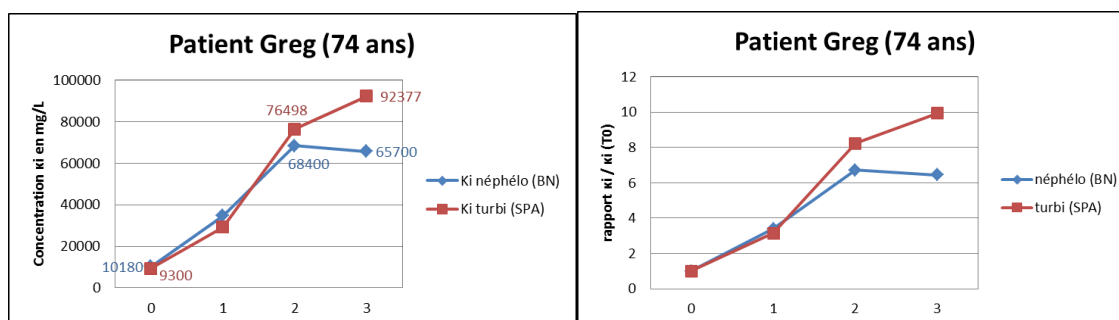


Patient 2 Boi : Les suivis ont été réalisés sur une période de 1 mois. Plusieurs pics électrophorétiques ont été détectés à T0, de valeur totale de 9,7 g/L. Ces multiples pics traduisent l'hétérogénéité électrique et dimensionnelle des CLL monoclonales κ .

BN : décroissance significative continue de 98% (coefficient multiplicateur de 0,015) de T0 à T3 (12320 à 186 mg/L) puis plateau avec des concentrations oscillant autour de 230 mg/L.

SPA : décroissance significative de 99% (coefficient multiplicateur de 0,01) de T0 à T3 (28970 à 170 mg/L) puis plateau de T3 à T5 avec des concentrations oscillant autour de 210 mg/L

Conclusions : Les suivis sont comparables. Les concentrations sont du même ordre de grandeur quand elles sont < 1000 mg/L et elles sont multipliées par 2,4 au-delà entre les deux méthodes (12320 vs 28970). La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est inférieure aux concentrations des CLL, dans un rapport de 1,3 à 3 : pic 9,7 g/L < 12320 mg/L (néphélo) < 28970 mg/L (turbi).

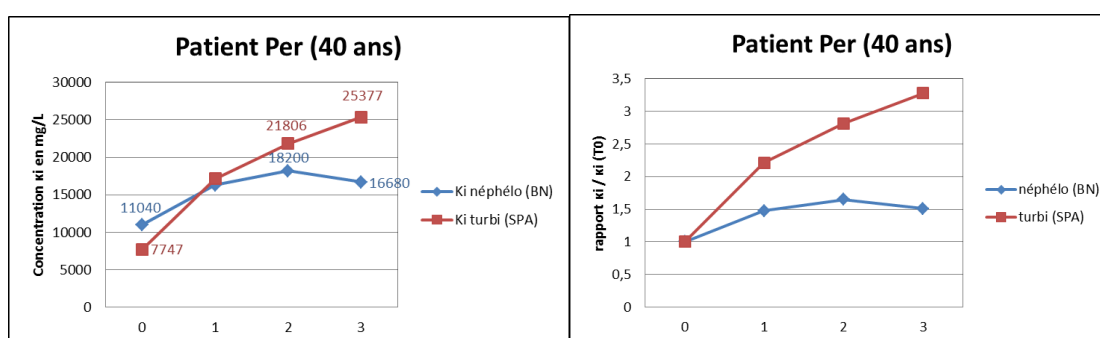


Patient 3 Greg : Les suivis ont été réalisés sur une période de 11 mois. Le pic électrophorétique à T2 et T3 était respectivement de 7 g/L et 11,3 g/L.

BN : ascension continue de 545% (coefficient multiplicateur de 6,5) de T0 à T3 (10180 à 65700 mg/L)

SPA : ascension continue de 893% (coefficient multiplicateur de 9,93) de T0 à T3 (9300 à 92377 mg/L).

Conclusions : Les suivis sont comparables et objectivent une ascension significative. Les concentrations extrêmes, supérieures à 50 000 mg/L, présente un coefficient multiplicateur moyen de 1,3 entre les deux méthodes (68400 vs 76498 ; 65700 vs 92377). La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est inférieure aux concentrations des CLL, dans un rapport respectivement de 1 à 6 et de 1 à 8 : pic 11,3 g/L < 65700 mg/L (néphélo) < 92377 mg/L (turbi).



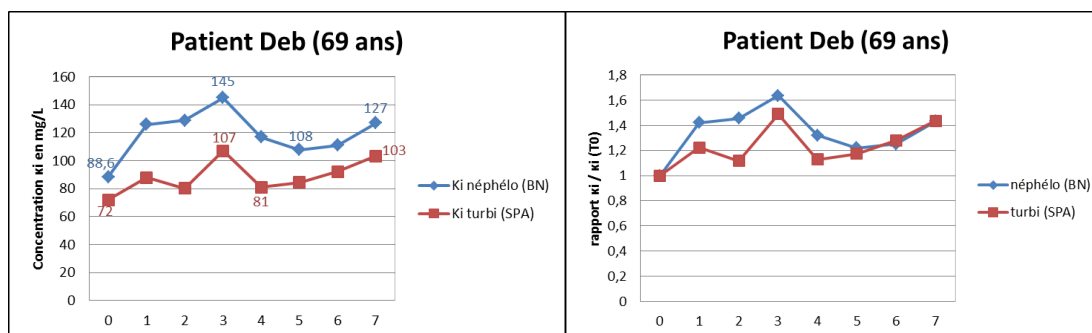
Patient 4 Per : Les suivis ont été réalisés sur une période de 5 mois. Le pic électrophorétique était de 5,2 g/L à T2.

BN : plateau avec des concentrations oscillant autour d'une valeur moyenne de 1280 mg/L

SPA : ascension continue significative de 228% (coefficient multiplicateur de 3,28) de T0 à T3 (7747 à 25377 mg/L).

Conclusions : Les suivis divergent en ce sens que l'un objective un plateau (BN) et l'autre une ascension continue. Les concentrations extrêmes supérieures à 17 000 mg/L présentent un coefficient multiplicateur moyen de 1,3 entre les deux méthodes (18700 vs 21806 ; 16680 vs 25377). La concentration du pic électrophorétique mesurée à T2 est inférieure aux concentrations des CLL, dans un rapport de 1 à 4 : pic 5,2 g/L < 18700 mg/L (néphélo) < 21806 mg/L (turbi).

Sans détection de pic à l'électrophorèse

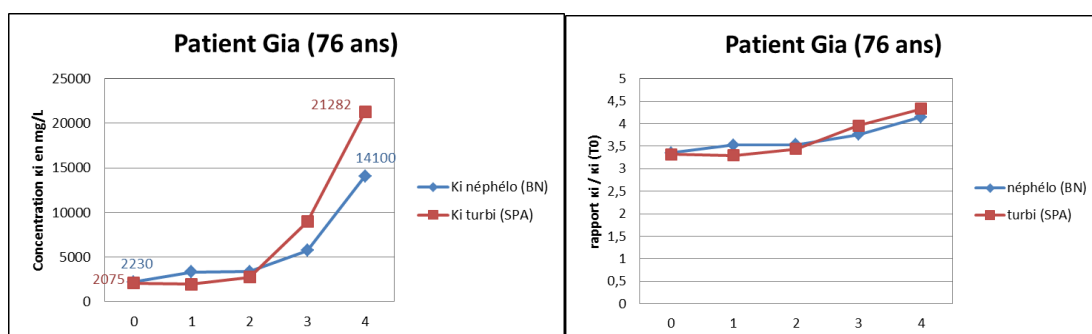


Patient 5 Deb : Les suivis ont été réalisés sur une période de 6 mois.

BN : ascension significative de 64% (coefficient multiplicateur de 1,64) de T0 à T3 (88,6 à 145 mg/L) puis un plateau avec des concentrations oscillant autour d'une valeur moyenne de 110 mg/L.

SPA : plateau avec oscillation des concentrations autour de 90 mg/L

Conclusions : Les suivis divergent en ce sens que l'un objective un plateau (SPA) et l'autre une ascension continue (BN). Un coefficient multiplicateur de 1,3 apparaît entre les concentrations des deux méthodes (145 vs 107).

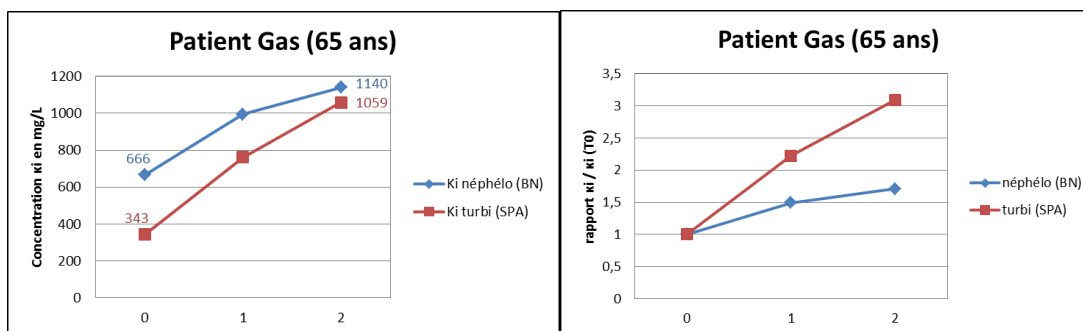


Patient 6 Gia : Les suivis ont été réalisés sur une période de 7 mois.

BN : ascension significative de 532% (coefficient multiplicateur de 6,3) de T0 à T4 (2230 à 14100 mg/L).

SPA : ascension significative de 926% (coefficient multiplicateur de 10,3) de T0 à T4 (2075 à 21282 mg/L).

Conclusions : Les suivis sont comparables et montrent une ascension significative. Les concentrations extrêmes, supérieures à 10 000 mg/L, présentent un coefficient multiplicateur de 1,5 entre les deux méthodes (14100 vs 21282).



Patient 7 Gas : Les suivis ont été réalisés sur une période de 5 mois.

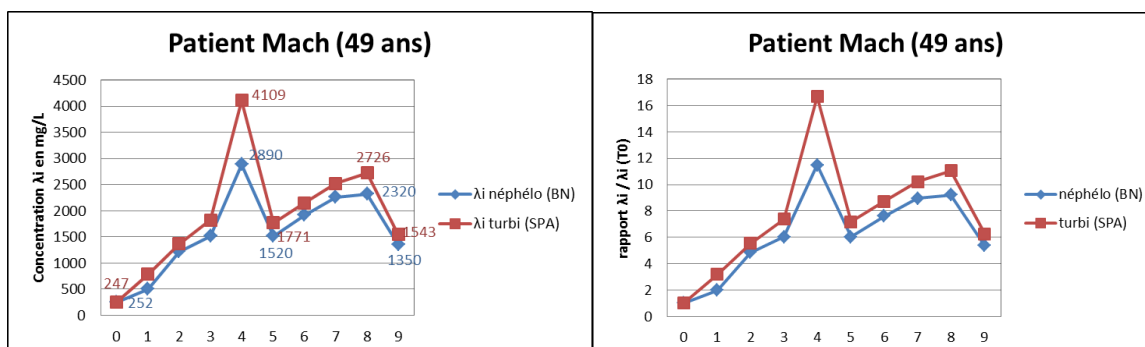
BN : modeste ascension continue de 71% de T0 à T2 (coefficient multiplicateur de 1,7).

SPA : ascension continue et plus marquée que précédemment de 208% de T0 à T2 (coefficient multiplicateur de 3,1).

Conclusions : Ascension parallèle des concentrations en CLL mais plus marquée avec la méthode turbidimétrique. Les concentrations obtenues avec la néphélométrie sont en moyenne 1,5 fois plus élevées que celle obtenues avec la turbidimétrie.

CLL impliquée de type λ

Sans détection de pic à l'électrophorèse

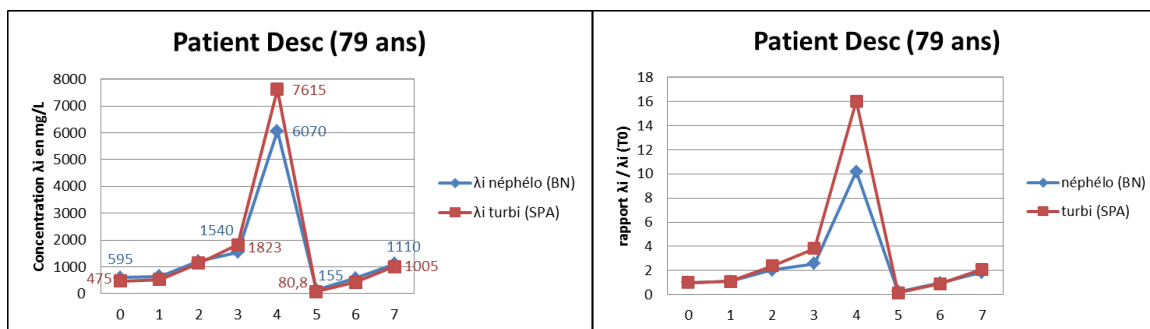


Patient 8 Mach : Les suivis ont été réalisés sur une période de 3 mois. Le pic électrophorétique était de 3,2 g/L à T4.

BN : ascension significative de 1047% (coefficient multiplicateur de 11,47) de T0 à T4 (252 à 2890 mg/L) puis plateau de T4 à T9 avec les concentrations oscillant autour d'une valeur moyenne de 1660 mg/L.

SPA : ascension significative de 1564% (coefficient multiplicateur de 16,64) de T0 à T4 (247 à 4109 mg/L) puis plateau avec des concentrations oscillant autour d'une valeur moyenne de 2450 mg/L.

Conclusions : Quelle que soit la méthode, l'évolution de la concentration des CLL est comparable. On note au maximum un coefficient multiplicateur de 1,4 entre les deux méthodes (2890 vs 4109). La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est du même ordre de grandeur que celles des CLL : 2890 mg/L (néphélo) < pic 3,2 g/L < 4109 mg/L (turbi).

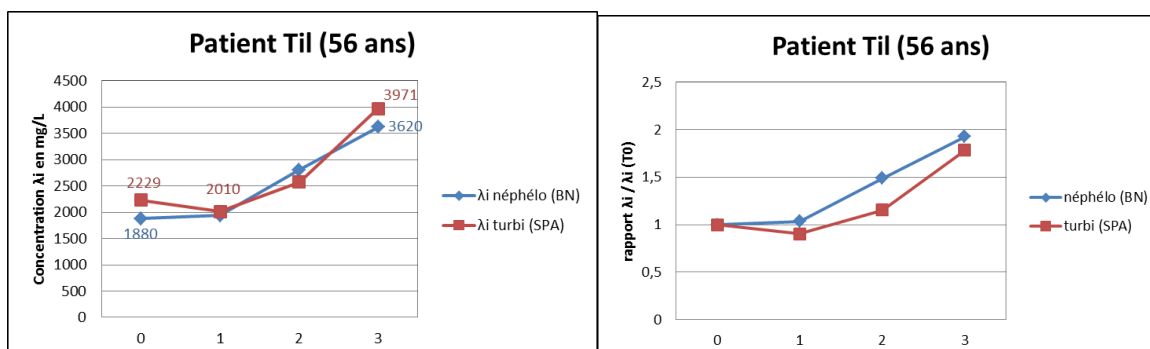


Patient 9 Desc : Les suivis ont été réalisés sur une période de 1 an. Le pic électrophorétique à T4 était de 1,7 g/L.

BN : après une ascension significative de 920% (coefficient multiplicateur de 10,2) de T0 à T4, survient une décroissance de 97% (coefficient multiplicateur de 0,025) de T4 à T5 (6070 à 155 mg/L) puis une nouvelle ascension de 616% (coefficient multiplicateur de 7,16) de T5 à T7 (155 mg/L vs 1110 mg/L).

SPA : après une ascension significative de 1503% (coefficient multiplicateur de 16) de T0 à T4, survient une décroissance significative de 99% (coefficient multiplicateur de 0,011) de T4 à T5 (7615 à 80,8 mg/L) puis une nouvelle ascension de 1144% (coefficient multiplicateur de 12,4).

Conclusions : suivis comparables en ce qui concerne les croissances et décroissances successives. Les concentrations obtenues sont du même ordre avec les deux méthodes de dosage, bien que toujours supérieures en turbidimétrie. La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est très inférieure aux concentrations des CLL, dans un rapport de 1 à 4 : pic 1,7 g/L < 6070 mg/L (néphélo) < 7615 mg/L (turbi).



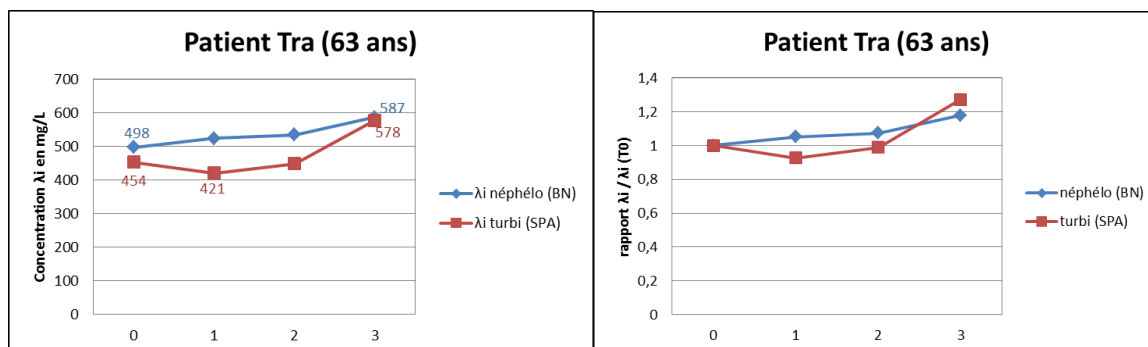
Patient 10 Til : Les suivis ont été réalisés sur une période de 6 mois. Le pic électrophorétique à T3 était de 0,63 g/L.

BN : Une ascension globale significative de 93% est observée (coefficient multiplicateur de 1,93) de T0 à T3 (1880 à 3620 mg/L).

SPA : Une ascension globale significative de 78% est observée (coefficient multiplicateur de 1,78) de T0 à T3 (2229 à 3971 mg/L).

Conclusions : les suivis sont comparables et montrent une croissance globale et modérée des concentrations avec les deux méthodes. Les concentrations obtenues sont du même ordre de grandeur avec les deux méthodes de dosage. La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est très inférieure aux

concentrations des CLL, dans un rapport de 1 à 6 : pic 0,63 g/L < 3620 (néphélo) < 3971 (turbi).

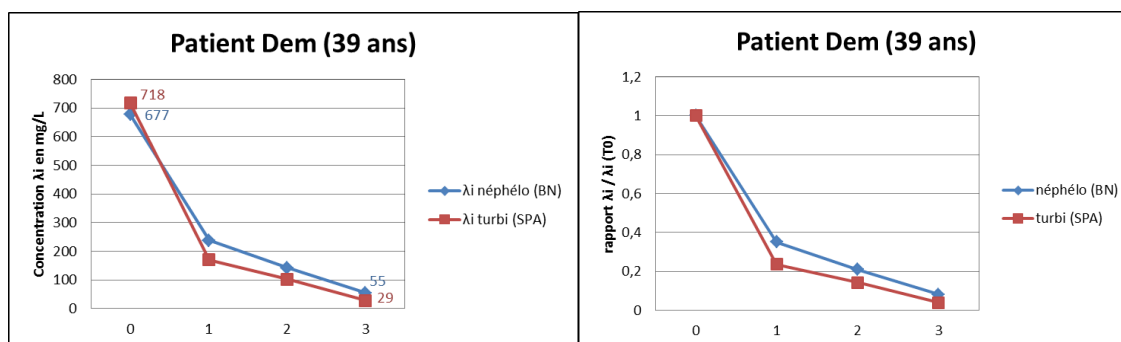


Patient 11 Tra : Les suivis ont été réalisés sur une période de 6 mois. Le pic électrophorétique à T3 était de 0,76 g/L.

BN : plateau de T0 à T3 avec des concentrations oscillant autour d'une concentration moyenne de 530 mg/L

SPA : plateau de T0 à T3 avec des concentrations oscillant autour d'une concentration moyenne de 475 mg/L

Conclusions : plateau dans les deux cas. Les concentrations obtenues sont du même ordre de grandeur avec les deux méthodes de dosage. La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est du même ordre de grandeur que les concentrations des CLL : 578 (turbi) < 587 (néphélo) < pic 0,76 g/L

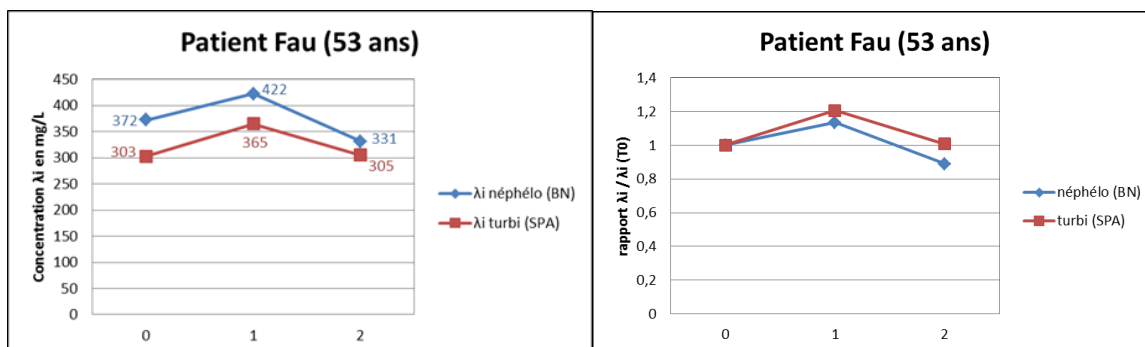


Patient 12 Dem : Les suivis ont été réalisés sur une période de 3 mois. Le pic électrophorétique à T0 et T1 était respectivement de 3,6 g/L et 2,8 g/L.

BN : Une décroissance significative de 92% est observé (coefficient multiplicateur de 0,08) de T0 à T3 (677 à 55 mg/L).

SPA : Une décroissance significative de 96% est observé (coefficient multiplicateur de 0,04) de T0 à T3 (718 à 29 mg/L).

Conclusions : les suivis sont comparables et montrent une décroissance globale des concentrations de même amplitude avec les deux méthodes et les concentrations observées sont du même ordre de grandeur. La concentration du pic électrophorétique mesurée au point maximum de l'évolution est très supérieure à celles des CLL : 677 mg/L (néphélo) < 718 mg/L (turbi) < pic 3,6 g/L.

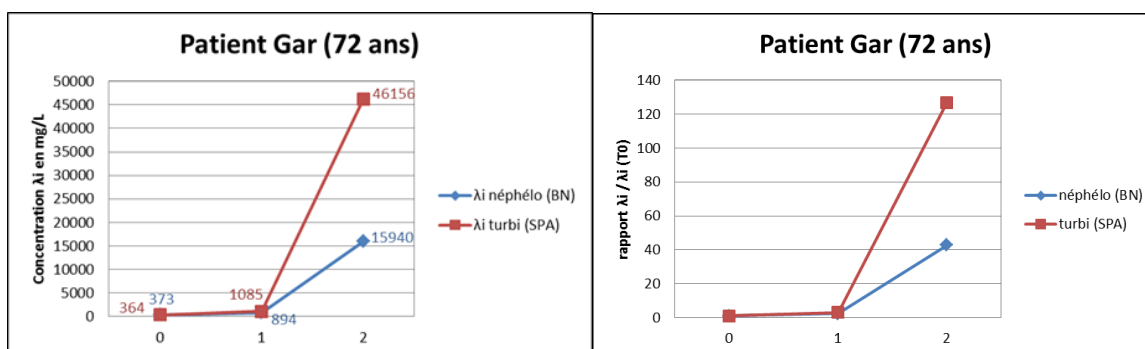


Patient 13 Fau : Les suivis ont été réalisés sur une période de 5 mois. Le pic électrophorétique à T1 était de 1,3 g/L.

BN : plateau avec concentrations oscillant autour d'une valeur moyenne de 400 mg/L en néphélométrie et de 320 mg/L en turbidimétrie.

TBS : plateau avec concentrations oscillant autour d'une valeur moyenne de 320 mg/L.

Conclusions : Profils strictement parallèles. Surestimation du pic électrophorétique mesuré à 1,3 g/L en raison d'un fond polyclonal important par rapport au pic.



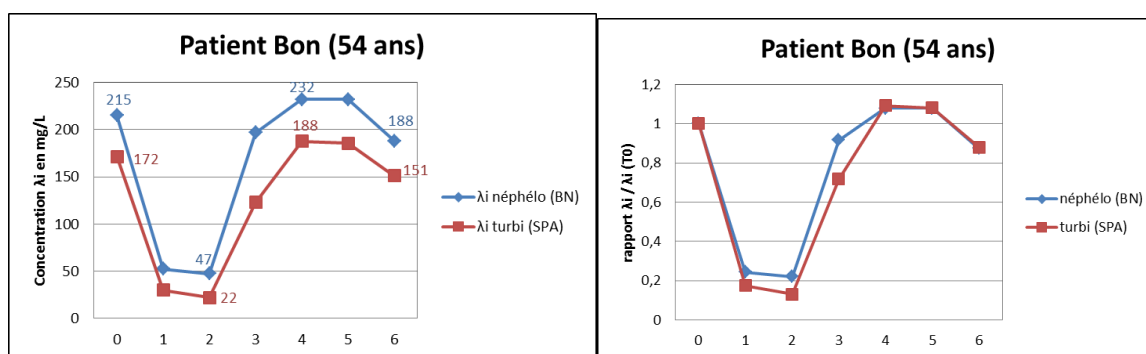
Patient 14 Gar: Les suivis ont été réalisés sur une période de 5 mois. Le pic électrophorétique était de 1,2 g/L à T0 et de 7,7 g/L à T2.

Néphélométrie : Ascension continue de 4173% (facteur multiplicateur de 43) de la concentration en CLL de T0 à T2 (373 à 15940 mg/L).

Turbidimétrie : Ascension continue de 12580% (facteur multiplicateur de 127) de la concentration en CLL de T0 à T2 (364 à 46156 mg/L).

Conclusions : quelle que soit la méthode utilisée, l'évolution des concentrations au cours du temps est strictement parallèle mais amplifiée en turbidimétrie (4173% en néphélométrie vs 12500% en turbidimétrie). Aux temps T0 et T1, les concentrations sont très proches, en revanche au temps T3 entre la néphélométrie et la turbidimétrie il existe un facteur multiplicateur de 3 en faveur de la turbidimétrie. Apparemment surestimée à T0 (1,2 g/L), la concentration du pic électrophorétique diffère à T2 d'un facteur multiplicateur de 0,5 et 0,17 par rapport aux concentrations mesurées respectivement en néphélométrie et turbidimétrie : pic 7700 mg/L < 15940 mg/L (néphélo) < 46156 mg/L (turb).

Sans détection de pic à l'électrophorèse

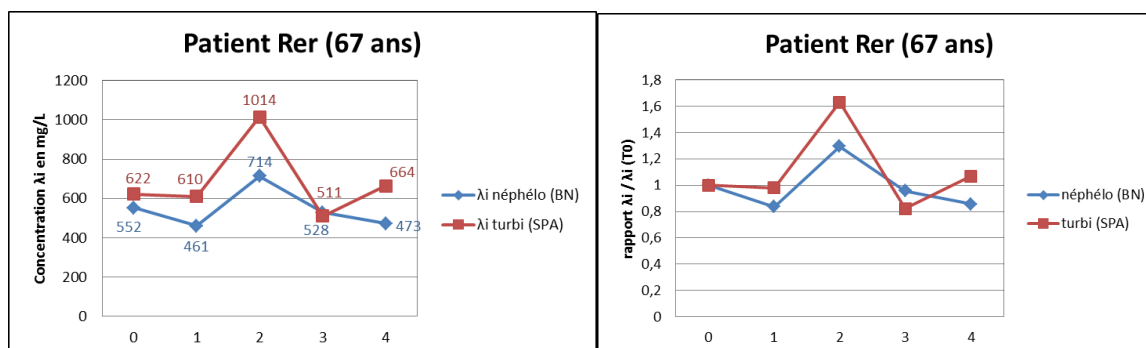


Patient 15 Bon : Les suivis ont été réalisés sur une période de 3 mois.

BN : décroissance significative de 78% (coefficient multiplicateur de 1,8) de T0 à T2 (215 à 47 mg/L), puis ascension significative de 394% (coefficient multiplicateur de 4,9) de T2 à T4 (47 à 232 mg/L) et enfin plateau avec des concentrations oscillant autour d'une valeur moyenne de 230 mg/L de T4 à T6.

SPA : décroissance significative de 87% (coefficient multiplicateur de 0,13) de T0 à T2 (172 à 22 mg/L), puis ascension significative de 755% (coefficient multiplicateur de 8,55) de T2 à T4 (22 à 188 mg/L) et enfin un plateau avec des concentrations oscillant autour d'une valeur moyenne de 180 mg/L de T4 à T6.

Conclusions : suivis strictement parallèles pour les deux méthodes. Les concentrations sont légèrement plus élevées en néphélométrie qu'en turbidimétrie, mais ne diffèrent pas en moyenne d'un facteur multiplicateur de plus de 1,4.

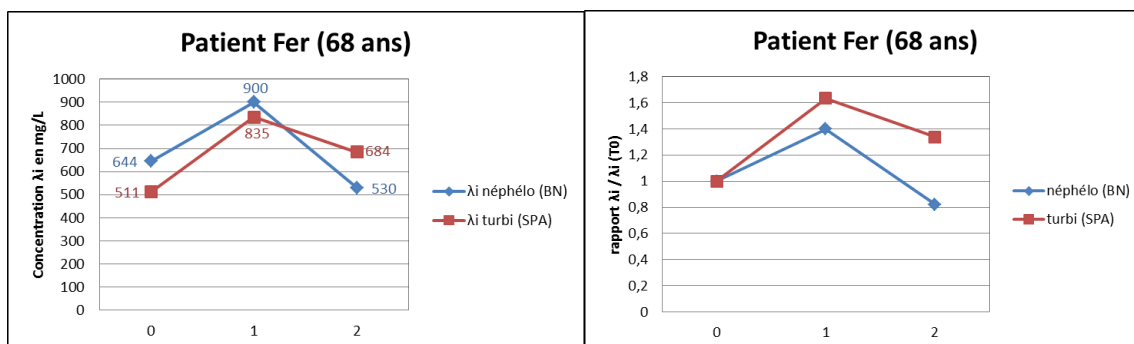


Patient 16 Rer: Les suivis ont été réalisés sur une période de 6 mois.

BN : plateau de T0 à T4 où les concentrations oscillent autour d'une valeur moyenne de 545 mg/L.

SPA : plateau de T0 à T4 où les concentrations oscillent autour d'une valeur moyenne de 684 mg/L.

Conclusions : suivis comparables pour les deux méthodes de dosage des CLL. Les concentrations sont légèrement plus élevées en turbidimétrie qu'en néphélométrie, mais ne diffèrent pas en moyenne d'un facteur multiplicateur de plus de 1,2.



Patient 17 Fer : Les suivis ont été réalisés sur une période de 8 mois.

BN : Plateau de T0 à T1 au cours duquel les concentrations mesurées en néphélométrie oscillent autour d'une valeur moyenne de 690 mg/L

SPA : Plateau de T0 à T1 au cours duquel les concentrations mesurées en néphélométrie oscillent autour d'une valeur moyenne de 625 mg/L

Conclusions : L'évolution des concentrations est similaire pour les deux méthodes. Les concentrations obtenues par les deux méthodes de dosage sont comparables.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Bence Jones H. On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium. Philosophical transactions of the Royal society of London. 1848; 138 : 55-62
- (2) Hugounenq L. L'albumosurie de Bence-Jones et les urines albumosiques. Lyon médical. 1901. XCVII : 83-91
- (3) Dechaume F-L. Recherches chimiques sur un cas d'albuminurie thermolytique ou albumosurie de Bence-Jones. Thèse de doctorat : pharmacie : Lyon ; 1903
- (4) Korngold L, Lipari R. Multiple–myeloma proteins. III The antigenic relationship of Bence Jones proteins to normal gammaglobulins and multiple-myeloma serum proteins. Cancer 1956; 9:262-7
- (5) Edelman GM, Gally JA. The nature of Bence-Jones proteins : chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal γ -globulins. J Exp Med 1962; 116:207-27
- (6) Lefranc MP, Lefranc G. Génétique Moléculaire des Immunoglobulines. <http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/index.php?article=IGandBcells&chapter=Genetics&lang=FR&nbr=article> (consulté le 25 août 2015)
- (7) Solomon A. Light chains of human immunoglobulins. Methods enzymol. 1985 ; 116 : 101-121
- (8) 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. Clin Invest. 1972 ; 51 (8) : 2162–2174
- (9) Berggard I, Peterson PA. Polymeric forms of free normal κ and λ chains of human immunoglobulin. J Biol Chem 1969 ; 244 (16) :4299-307
- (10) Söiling K. Polymeric forms of free light chains in serum from normal individuals and from patients with renal disease. Scan J Clin Lab Invest 1976 ; 36 : 447-52
- (11) Söiling K. Free light chains of immunoglobulins. Scand J Clin Lab Invest 1981 ; 4 (157) : 1-84
- (12) Kaplan B, Golderman S, Aizenbud B, Esev K, Kukuy O, Leiba M et al. Immunoglobulin-free light chain monomer-dimer patterns help to distinguish

- malignant from premalignant monoclonal gammopathies : a pilot study. *Am J Hematol* 2014; 89 (9) : 882-888
- (13) Karlsson FA, Peterson PA, Berggard I. Properties of halves of immunoglobulin light chains. *Proc NAS*. 1969 ; 64 (4) :1257-63
 - (14) Solomon A, Weiss DT. Serologically defined V region subgroups of human lambda light chains. *J Immunol*. 1987 ; 139 (3) : 824-30
 - (15) Levinson SS, Keren DF. Free light chains of immunoglobulins: clinical laboratory analysis. *Clinical Chemistry*. 1994 ; 40 (10) : 1869-78
 - (16) Laurell CB. Complexes formed in vivo between immunoglobulin light chain kappa, prealbumin and-or alpha-1-antitrypsin in myeloma sera. *Immunochemistry*. 1970 ; 7 (5) : 461–465
 - (17) Foray V, Chapuis-Cellier C. Apport du dosage des chaînes légères libres d'immunoglobulines dans le diagnostic et le suivi des gammopathies monoclonales à chaînes légères. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. 2005 ; 20 : 385-393
 - (18) Chapuis-Cellier C, Lombard C. Chaînes légères libres : structure, pathogénicité, méthodes d'étude. *EMC biologie médicale*. 2015 ; [90-30-0161-A]
 - (19) Kosaka M, Iishi Y, Okagawa K, Saito S, Sugihara J, Muto Y Tetramer Bence Jones protein in the immunoproliferative diseases. Angioimmunoblastic lymphadenopathy, primary amyloidosis, and multiple myeloma. *Am J Clin Pathol*. 1989 ; 91 (6) : 639-46
 - (20) Abraham GN, Waterhouse C. Evidence for defective immunoglobulin metabolism in severe renal insufficiency. *Am J Med Sci*. 1974 ; 268 (4) : 227-33
 - (21) Wochner RD, Strober W, Waldmann TA. The role of the kidney in the catabolism of Bence Jones proteins and immunoglobulin fragments. *J Exp Med*. 1967 ; 126 (2) : 207-21
 - (22) Maack T, Johnson V, Kau ST, Figueiredo J, Sigulem D. Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins : A review. *Kidney International*. 1979 ;16 : 251–270
 - (23) Sanders PW, Booker BB, Bishop JB, Cheung HC. Mechanisms of intranephronal proteinaceous cast formation by low molecular weight proteins. *J Clin Invest*. 1990; 85 (2) : 570-6

- (24) Sanders PW, Booker BB. Pathobiology of cast nephropathy from human Bence Jones proteins. *J Clin Invest.* 1992 ; 89 (2) : 630–639
- (25) Leung N, Bridoux F, Hutchison CA, Nasr SH, Cockwell P, Femand JP et al. Monoclonal gammopathy of renal significance : when MGUS is no longer undetermined or insignificant. *Blood.* 2012 ; 120 (22) : 4292-5
- (26) Gibbs SDJ, Hawkins PN. Biochemical basis of the amyloid diseases. *Br J Hosp Med.* 2010 ; 71 : 70–5
- (27) Baden EM, Sikkink LA, Ramirez-Alvarado M. Light chain amyloidosis – current findings and future prospects. *Current Protein and Peptide Science.* 2009 ; 10 : 500–8
- (28) HAS Haute autorité de santé. Dosage des chaînes légères libres. HAS - Service évaluation des actes professionnels. 2006
- (29) Le Carrer D, Bach-Ngohou K. L'électrophorèse capillaire automatisée en biologie clinique. *Spectra Biologie.* 2005 ; 146 : 47-52
- (30) Nguyen TKT, Troncy J, Chapuis Cellier C. Ability of capillary zone electrophoresis in detecting monoclonal light chains. *Haematologica.* 2007 : 92 ; 123-123
- (31) Jenner E. Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. *Clinica Chimica Acta.* 2014 ; 427:15-20
- (32) Kaplan JS, Horowitz GL. Twenty-four-hour Bence-Jones protein determinations: can we ensure accuracy? *Arch Pathol Lab Med.* 2011 ; 135 (8) : 1048-51
- (33) Graziani M, Merlini G, Petrini C, IFCC Committee on Plasma Proteins, SIBioC Study Group on Proteins. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. *Clin Chem Lab Med.* 2003 ; 41 (3) : 338-46
- (34) Harrison HH. The "ladder light chain" or "pseudo-oligoclonal" pattern in urinary immunofixation electrophoresis (IFE) studies: a distinctive IFE pattern and an explanatory hypothesis relating it to free polyclonal light chains. *Clin Chem.* 1991 ; 37 (9) : 1559-64
- (35) Nowrousian MR, Brandhorst D, Sammet C et al. Serum free light chain analysis and urine immunofixation electrophoresis in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2005 ; 11 (24) : 8706-14

- (36) Söiling K. Free light chains of immunoglobulins in normal serum and urine determined by radioimmunoassay. *Scand J Clin Lab Invest.* 1975 ; 35 (5) : 407-12
- (37) Katzmman JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, Kyle RA. 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 (9) : 1437-44
- (38) Pattenden RJ, Rogers SY, Wenham PR. Serum free light chains; the need to establish local reference intervals. *Ann Clin Biochem.* 2007 ; 44 (6) : 512-5
- (39) Braga F, Infusino I, Dolci A, Panteghini M. Biological variation of free light chains in serum. *Clin Chim Acta.* 2013 ; 415 : 10-1
- (40) Wang L, Chan PC. Measurement uncertainty for serum free light chain assays: estimation and implication on result interpretation. *Clin Biochem.* 2013 ; 46 (4-5) : 381-4
- (41) Katzmman JA, Snyder MR, Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, Benson JT, Dispenzieri A. Long-term biological variation of serum protein electrophoresis M-spike, urine M-spike, and monoclonal serum free light chain quantification: implications for monitoring monoclonal gammopathies. *Clin Chem.* 2011 ; 57 (12) : 1687-92
- (42) Briand PY, 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
- (43) Tate JR, Gill D, Cobcroft R, Hickman PE. Practical considerations for the measurement of free light chains in serum. *Clin Chem.* 2003 ; 49 (8) : 1252-7
- (44) 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.* 2011 ; 412 (19-20) : 1798-804
- (45) Tate JR, Gill D, Cobcroft R, Hickman PE. Practical considerations for the measurement of free light chains in serum. *Clin Chem.* 2003 ; 49 (8) : 1252-7
- (46) Altinier S, Seguso M, Zaninotto M, Varagnolo M, Adami F, Angeli P, Plebani M. Serum free light chain reference values: a critical approach. *Clin Biochem.* 2013 ; 46 (7-8) : 691-3

- (47) Dispenzieri A, Zhang L, Katzmman JA, Snyder M et al. Appraisal of immunoglobulin free light chain as a marker of response. *Blood*. 2008 ; 111 (10) : 4908-15
- (48) Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncology*. 2014 ; 15 (12) : 538-48
- (49) Te Velthuis H, Knop I, Stam P, van den Broek M, Bos HK et al. N Latex FLC - new monoclonal high-performance assays for the determination of free light chain kappa and lambda. *Clin Chem Lab Med*. 2011; 49 (8) : 1323-32
- (50) Pretorius CJ, Klingberg S, Tate J, Wilgen U, Ungerer JP. Evaluation of the N Latex FLC free light chain assay on the Siemens BN analyser: precision, agreement, linearity and variation between reagent lots. *Ann Clin Biochem*. 2012 ; 49 (5) : 450-5
- (51) Lock RJ, Saleem R, Roberts EG, Wallage MJ et al. A multicentre study comparing two methods for serum free light chain analysis. *Ann Clin Biochem*. 2013 ; 50 (3) : 255-61
- (52) Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol*. 2006 ; 134 : 573-89.
- (53) HAS. ALD n°30 - Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique – Myélome multiple. Déc 2010
- (54) Drayson M, Begum G, Basu S, Makkuni S, Dunn J, Barth N, Child JA. Effects of paraprotein heavy and light chain types and free light chain load on survival in myeloma: an analysis of patients receiving conventional-dose chemotherapy in Medical Research Council UK multiple myeloma trials. *Blood*. 2006 ; 108 : 2013-9
- (55) Bocquet J. Suivi comparatifs de gammopathies monoclonales par le dosage des chaînes légères libres et de l'immunoglobuline entière : analyse de 203 cas. Thèse de doctorat : pharmacie : Lyon 1 ; 2007
- (56) Drayson M, Begum G, Basu S, Makkuni S, Dunn J, Barth N, Child JA. Effects of paraprotein heavy and light chain types and free light chain load on survival in myeloma: an analysis of patients receiving conventional-dose chemotherapy in Medical Research Council UK multiple myeloma trials. *Blood*. 2006 ; 108 : 2013-9

- (57) Drayson M, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith H, Bradwell AR. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood*. 2001; 97 (9) : 2900-2
- (58) Dispenzieri A, Kyle R , Merlini G , Miguel JS , Ludwig H , R Hajek R et al. International Myeloma Working Group²⁷International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009 ; 23 : 215–224
- (59) Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncology*. 2014 ; 15 (12) : 538-48
- (60) Matsuda M, Yamada T, Gono T, Shimojima Y, Ishii W, Fushimi T, Sakashita K, Koike K, Ikeda S. Serum levels of free light chain before and after chemotherapy in primary systemic AL amyloidosis. *Internal Medicine*. 2005 ; 44 (5): 428-33
- (61) Lachmann HJ, Gallimore R, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB, Hawkins PN. Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *Br J Haematol*. 2003 ; 122 (1) :78-84
- (62) Gertz MA, Comenzo R, Falk RH , Fermand JP et al. Definition of organ involvement and treatment response in Immunoglobulin light chain amyloidosis (AL) : a consensus opinion from the 10th international symposium on amyloid and amyloidosis. *American Journal of Hematology*. 2005 ; 79 : 319–328
- (63) Nasr SH, Valeri AM, Cornell LD, Fidler ME, Sethi S, D'Agati VD, Leung N. Renal monoclonal immunoglobulin deposition disease: a report of 64 patients from a single institution. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 ; 7 (2) : 231-9
- (64) Agarwal A, Ghobrial IM. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: a review of the current understanding of epidemiology, biology, risk stratification, and management of myeloma precursor disease. *Clinical Cancer Research*. 2013 ; 19 (5) : 985-94
- (65) Kyle RA, Therneau MT, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med*. 2002 ; 346 : 564-569
- (66) Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, Melton LJ 3rd, Bradwell AR, Clark RJ, Larson DR, Plevak MF, Dispenzieri A, Katzmann JA. Serum free light chain

- ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2005 ; 106 (3) :812-7
- (67) Hoffman U, Opperman M, Kuchler S, Ventur Y, Teuber W, Michels H, Welcker, Landenberg PV, Helmke K. Free immunoglobulin light chains in patients with rheumatic diseases. *Z Rheumatol* 2003; 62, Suppl 1 : 1051
- (68) Hopper JE, Golbus J, Meyer C, Ferrer GA. Urine free light chains in SLE: clonal markers of B-cell activity and potential link to in vivo secreted Ig. *J Clin Immunol*. 2000 ; 20 (2) : 123-37
- (69) Berthod A, Randon J. Analytique chimie.
<http://www.universalis.fr/encyclopedie/chimie-analytique/> (consulté le 10 avril 2015)
- (70) Borderie D. Néphélométrie-turbidimétrie. *EMC – Biologie médicale*. 2004; 1-0 [article 90-60-0245
- (71) The Binding Site. Freelite®. <http://www.bindingsite.fr/freelite> (consulté le 10 avril 2015)
- (72) Hutchison CA, Harding S, Hewins P, Mead GP, Townsend J, Bradwell AR, Cockwell P. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 ; 3 (6): 1684-90
- (73) Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*. 1983 ; 21 (11) : 709-20
- (74) Le service de consultation en biostatistique du CRCHUM. Faire et analyser un graphique de Bland-Altman – CRCHUM. 2011 ; 1-9
- (75) Bland JM, Altman DG. Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2003 ; 22 : 85-93
- (76) Journois D. Concordance de deux variables : l'approche graphique. *Revue des Maladies Respiratoires* 2004 ; 21 : 127-130

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

CORDONNIER Anne

Étude comparative de deux techniques et de deux méthodes de dosage des chaînes légères libres des immunoglobulines.

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2015, 162 p.

RESUME

La protéine dite de Bence Jones a été le premier marqueur tumoral identifié en pathologie humaine et sa recherche dans les urines est restée longtemps le seul moyen de mettre en évidence la présence de chaînes légères libres monoclonales dans l'organisme. Grâce à l'introduction sur le marché de réactifs à base d'anticorps polyclonaux en 2001 et monoclonaux en 2011, il est devenu possible de doser en routine les chaînes légères libres circulantes.

Tout utilisateur d'une méthode ou d'une technique de quantification d'un analyte donné est amené à se poser la question du maintien ou non de sa façon de procéder lors de l'apparition sur le marché d'un nouvel automate ou de nouveaux réactifs. C'est pour y répondre que ce travail de comparaison a été entrepris.

Une première partie de ce travail a été consacrée aux caractéristiques structurales, physiologiques et métaboliques des chaînes légères libres circulantes polyclonales et monoclonales. Après un rappel des difficultés rencontrées pour leur mise en évidence par les techniques conventionnelles d'électrophorèse, l'intérêt de leur quantification a été développé, en particulier pour le diagnostic et le suivi des dyscrasies plasmocytaires malignes (myélome multiple), ou pour le suivi des pathologies liées à des particularités structurales des chaînes légères libres (amyloses AL, maladies de dépôts de chaînes légères libres).

Une deuxième partie concerne les résultats de la comparaison entre les concentrations de chaînes légères libres obtenues en néphélométrie avec des anticorps polyclonaux versus des anticorps monoclonaux, puis ceux obtenus avec des anticorps polyclonaux mais avec deux méthodes différentes, néphélométrie et turbidimétrie. Ce travail a ainsi porté sur une population initiale de 432 échantillons issus de 250 patients. Il en ressort que les deux techniques et les deux méthodes sont fortement corrélées mais qu'il existe une différence systématique et proportionnelle entre elles, les anticorps polyclonaux reconnaissant mieux les chaînes légères libres dimériques que les anticorps monoclonaux. Ainsi, la complexité structurale des chaînes légères libres monoclonales, permet d'expliquer en partie les différences existant entre les niveaux de réponse de ces deux réactifs. De plus, les différences observées entre la turbidimétrie et la néphélométrie peuvent être expliquées par les caractéristiques des automates en matière de capteurs optiques et de traitement du signal.

Ce travail permet donc de disposer de quelques éléments de réponse en regard de la question initialement posée. En présence d'un recrutement élevé de patients atteints de dyscrasies plasmocytaires malignes ou de maladies de dépôts, pathologies où l'hétérogénéité structurale des chaînes légères libres est de règle, le recours à des anticorps polyclonaux pour leur quantification apparaît comme un choix raisonnable.

MOTS CLES

Chaînes légères libres
Turbidimétrie
Néphélométrie
Gammopathie monoclonale
Protéine de Bence Jones

JURY

M. BIENVENU Jacques, Professeur
M. COHEN Richard, Professeur
Mme CHAPUIS-CELLIER Colette, Docteur
Mme KOLOPP-SARDA Marie-Nathalie, Docteur

DATE DE SOUTENANCE

Jeudi 29 octobre 2015

ADRESSE DE L'AUTEUR

31 rue du professeur Florence 69003 Lyon