

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

Année : 2020

N° 2020-85

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

DES de Biologie Médicale

par

Charles GUIDET

Né le 24 septembre 1990 à Paris

Présentée et soutenue publiquement le 15 septembre 2020

**Évaluation de la réponse immunochimique dans le myélome multiple par
technologie MALDI-TOF, une étude rétrospective sur les patients de
l'étude IMAJEM.**

Président : Monsieur le Professeur Philippe MOREAU

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Thomas DEJOIE

Membres du Jury : Monsieur le Professeur Damien MASSON
Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Philippe MOREAU, pour me faire l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver ici ma profonde et respectueuse reconnaissance.

À Monsieur le Docteur Thomas DEJOIE, pour avoir dirigé ce travail. Je te remercie pour ta disponibilité, tes conseils et ton enseignement au cours de ces années d'internat.

À Monsieur le Professeur Damien MASSON, pour me faire l'honneur de juger ce travail et pour ton enseignement. Je te remercie sincèrement.

À Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD, pour me faire l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements et mon profond respect.

À Madame le Docteur Hélène CAILLON, pour sa bienveillance et ses précieux conseils. Merci de m'avoir fait apprécier la Biochimie.

À mes parents, pour m'avoir toujours soutenu pendant ces longues années d'études.

À mes sœurs, pour tous les bons moments passés ensemble, et pour tous ceux à venir.

À tous les membres de l'amicale du 22 juillet sarthois, passés, présents et futurs. Que les 15 prochaines années soient du même acabit que les 15 précédentes. Et pourvu que ça dure.

À tous mes co-internes, que j'ai côtoyés pendant ces 4 années, en RCP ou ailleurs.

À Gwenaëlle, qui attend impatiemment que je la rejoigne au sein du club des Docteurs. Merci d'avoir perturbé ma vie.

TABLE DES MATIERES

1	Introduction.....	6
1.1	Myélome.....	6
1.1.1	Définition	6
1.1.2	Diagnostic.....	6
1.1.3	Prise en charge	8
1.1.4	Suivi	10
1.1.5	Evaluation de la MRD.....	13
1.1.6	PET-scan	13
1.1.7	La MRD sanguine	14
1.2	Aspects analytiques	14
1.2.1	L'analyte : Le composant monoclonal	14
1.2.2	L'outil spectrométrie de masse.....	17
1.3	Objectif.....	21
2	Matériel et méthode	22
2.1	Sélection des échantillons : l'étude IMAJEM.....	22
2.2	Analyse des échantillons	23
3	Résultats.....	27
3.1	Présentation des différents profils	28
3.1.1	Profil normal	29

3.1.2	Profil présentant un pic monoclonal.....	30
3.1.3	Profil oligoclonal.....	32
3.2	Suivi d'un patient.....	33
3.2.1	Screening.....	33
3.2.2	Pré-RVD4.....	34
3.2.3	Pré-maintenance.....	35
3.2.4	D1M3.....	36
3.2.5	Post-maintenance.....	37
3.3	Analyse du rapport m/z.....	38
3.4	Comparaison immunofixation et MALDI-TOF.....	40
3.5	Comparaison Dosage des Chaines Légères et MALDI-TOF.....	41
3.6	Analyse de survie.....	42
4	Discussion.....	43

Abréviations

B2M	Béta 2 microglobuline
CHCA	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
CLL	Chaines Légères Libres
CLLi	Chaines Légères Libres impliquées
CLLni	Chaines Légères Libres non impliquées
dCLL	Différence des CLL impliquées et CLL non impliquées
GMSI	Gammopathie Monoclonale de Signification Indéterminée
IFM	Intergroupe Francophone du Myélome
IMWG	International Myeloma Working Group
LDH	Lactate Déshydrogénase
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight
miRAMM	Monoclonal Immunoglobulin Rapid Accurate Mass Measurement
MRD	Minimal Residual Disease
PFS	Progression Free Survival
R-ISS	Revised International Staging System
TCEP	Tris-2-carboxyethyl phosphine hydrochloride

1 INTRODUCTION

1.1 MYELOME

1.1.1 Définition

Le myélome se définit par la prolifération maligne de plasmocytes monoclonaux dans la moelle osseuse, et sécrétant une immunoglobuline, complète ou non. On dénombre actuellement 5 nouveaux cas / 100 000 habitants par an. Il s'agit d'une maladie de l'adulte avec 95% des cas ayant plus de 40 ans et un âge médian au diagnostic de 65 ans (1). Il fait partie de la famille des gammopathies monoclonales comprenant les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (GMSI), le myélome multiple indolent et le myélome multiple symptomatique. Il existe une continuité entre ces pathologies et tout myélome multiple est précédé d'une GMSI (2).

1.1.2 Diagnostic

Le diagnostic du myélome se base sur des critères cliniques, biologiques, et radiologiques, tels que définis par l'International Myeloma Working Group (IMWG) en 2014 (3). En fonction de ces critères, les patients sont classés en différentes catégories.

Le myélome multiple symptomatique : deux critères doivent être présents

-plasmocytose médullaire clonale ≥ 10 % ou plasmocytome osseux ou extra médullaire prouvé à la biopsie

-atteinte d'organes selon les critères CRAB :

-hypercalcémie > 2.75 mmol/L, ou > 0.25 mmol/L par rapport aux valeurs normales

-insuffisance rénale : créatininémie > 173 mmol/L ou clairance de la créatinine < 40 mL/min

-anémie : hémoglobine < 10 g/dL ou -2 g/dL par rapport à l'Hb de base

-lésion osseuse ostéolytique à l'imagerie

Le myélome multiple asymptomatique ou indolent : deux critères doivent être présents

-absence de signes cliniques (pas d'atteinte d'organe selon les critères CRAB et pas d'atteinte radiologique)

-associé à au moins un des critères suivants :

- Plasmocytose médullaire entre 10 et 60 %

- Pic d'immunoglobuline monoclonale sérique ≥ 30 g/L

- Composant monoclonale urinaire ≥ 500 mg/24h

Les marqueurs de malignité suivants classent en myélome indolent à haut risque évolutif :

-plasmocytose médullaire clonale ≥ 60 %

- >1 lésion focale à l'IRM de diamètre > 5 mm

-rapport des chaînes légères libres (CLL) impliquées / non impliquées ≥ 100 , avec CLL > 100 mg/L

Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (GMSI) : 3 critères doivent être présents

- Absence de signes cliniques (pas d'atteinte d'organe selon les critères CRAB et pas d'atteinte radiologique)
- Pic d'immunoglobuline monoclonale sérique ≤ 30 g/L
- Plasmocytose médullaire < 10 %

1.1.3 Prise en charge

Au diagnostic, les patients sont classés selon un score pronostic, le revised International Staging System (r-ISS) (4), prenant en compte la beta 2 microglobuline (B2M) sérique, l'albumine sérique, le taux de lactate déshydrogénase (LDH) et la cytogénétique (Tableau 1).

Tableau 1 : score r-ISS

Facteur pronostic	Critères
Stade ISS	
I	B2M < 3.5 mg/L et albumine > 35 g/L
II	Ni ISS I ni ISS III
III	B2M > 5.5 mg/L
Anomalies chromosomiques	
Risque standard	Absence d'anomalie chromosomique à haut risque
Haut risque	Présence de del(17p) ou t(4;14) ou t(14;16)
Stade r-ISS	
I	ISS I et risque standard cytogénétique et LDH dans les limites de la normale
II	Ni r-ISS I ni r-ISS III
III	ISS III et soit anomalies chromosomiques à haut risque soit LDH supérieure aux valeurs limites de la normale

Actuellement, les deux entités requérant la mise en route d'un traitement sont le myélome multiple symptomatique et le myélome indolent à haut risque évolutif. Le choix thérapeutique repose sur l'âge du patient, son état général et la présence de facteurs de mauvais pronostic. Ainsi, les patients en bon état général et âgés de moins de 65 ans se voient proposer, après une chimiothérapie d'induction, un traitement intensif à base de melphalan suivi d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. L'arsenal thérapeutique a considérablement évolué au cours des 20 dernières années depuis l'avènement du thalidomide. Actuellement la chimiothérapie repose sur une bi ou trithérapie combinant différentes classes thérapeutiques (5). Les principales classes utilisées sont les agents alkylants (melphalan, cyclophosphamide, bendamustine), les glucocorticoïdes (prednisone et dexaméthasone), les immunomodulateurs (thalidomide, lénalidomide, pomalidomide), les inhibiteurs du protéasome (carfilzomib, bortezomib, ixazomib) et plus récemment les anticorps monoclonaux (daratumumab, isatuximab). Enfin les recherches sur les immunothérapies et notamment les CAR-T cells

pourraient à l'avenir modifier la prise en charge des patients atteints de myélome multiple (6). Cependant, malgré une amélioration très significative de l'espérance de vie attribuable aux progrès thérapeutiques, le myélome reste une maladie incurable. Les patients rechutent tous à plus ou moins long terme et les durées de réponse aux lignes thérapeutiques successives raccourcissent inexorablement jusqu'à l'absence de solution thérapeutique.

1.1.4 Suivi

Afin d'évaluer la réponse au traitement, l'IMWG a défini des critères de maladie mesurable au diagnostic en se basant sur la valeur initiale du composant monoclonal afin de pouvoir réaliser un suivi quantitatif de la réponse (7). La maladie mesurable est donc définie lorsqu'au moins un des trois critères suivants est présent :

-composant monoclonal sérique ≥ 10 g/L

-composant monoclonal urinaire ≥ 200 mg/24h

-CLL sériques ≥ 100 mg/L (à condition que le rapport CLL kappa / CLL lambda soit anormal)

En fonction de ces critères au diagnostic, on définit les examens biochimiques nécessaire au suivi du patient (Tableau 2).

Tableau 2: maladie mesurable

Maladie mesurable	Examens biochimiques
Sérique et urinaire	Electrophorèse sérique et urinaire
Sérique seule	Electrophorèse sérique
Urinaire seule	Electrophorèse urinaire
Maladie non mesurable	Dosage CLL + électrophorèse sérique

Pour l'analyse sérique, l'électrophorèse réalisée est généralement une électrophorèse capillaire. Elle présente une fiabilité similaire à l'électrophorèse sur gel d'agarose mais est plus facilement automatisable, et plus simple d'utilisation en routine (8). Les protéines migrent à travers un tube en silice auquel un courant électrique est appliqué, selon leur charge. Pour l'analyse urinaire, l'électrophorèse sur gel d'agarose est privilégiée. Enfin pour l'immunofixation que ce soit sérique ou urinaire, il s'agit d'une électrophorèse sur gel d'agarose couplée à des antisérums afin de déterminer l'isotype. Le dosage des chaînes légères libres sériques s'effectue par immunonéphélométrie, généralement avec le coffret Freelite de The Binding Site.

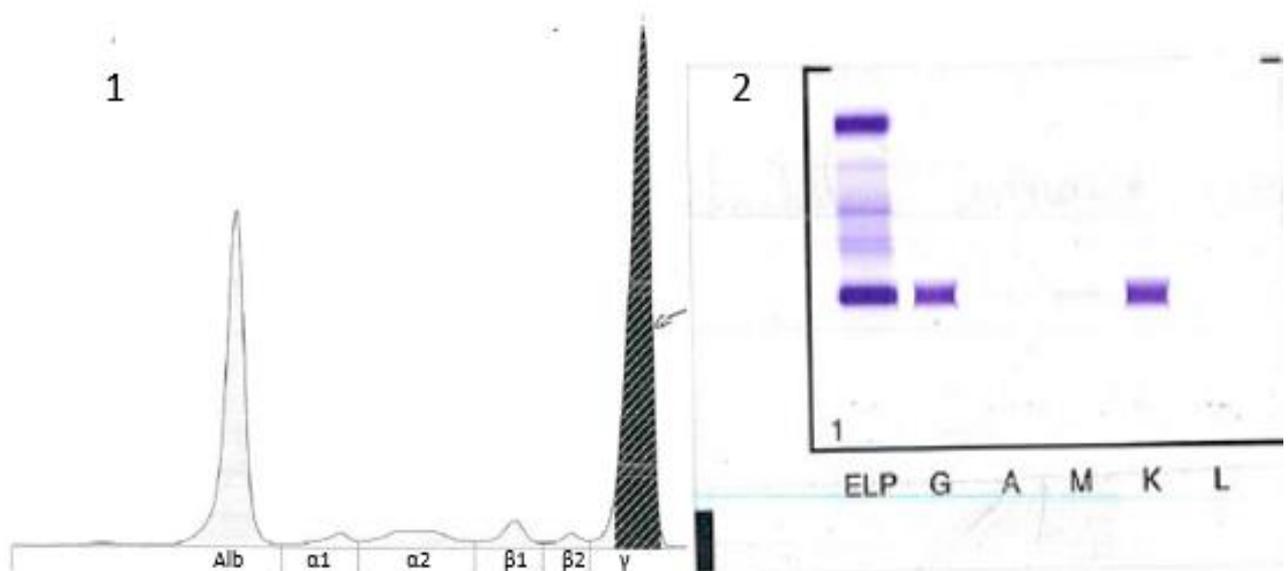


Figure 1 : électrophorèse sérique (1) présentant un pic monoclonal en zone gamma ; immunofixation sérique (2) montrant une IgG kappa monoclonale.

Ces examens permettent une classification du niveau de réponse au traitement en fonction de l'évolution quantitative du composant monoclonal dans le sérum et/ou l'urine des patients (9).

Tableau 3 : critères de réponse au traitement

Réponse partielle (RP)
Réduction d'au moins 50 % du composant monoclonal sérique et réduction du composant monoclonal urinaire d'au moins 90 % ou < 20 mg/24h Si le composant monoclonal n'est pas mesurable dans le sang ou dans les urines : diminution d'au moins 50 % de la dCLL Si le composant monoclonal n'est pas mesurable dans le sang ou dans les urines et que les CLL ne sont pas mesurables : diminution d'au moins 50 % de la plasmocytose médullaire (à condition d'un pourcentage initial de plasmocyte d'au moins 30 %)
Très bonne réponse partielle (TBRP)
Composant monoclonal détectable dans le sang ou dans les urines à l'immunofixation mais pas à l'électrophorèse Ou réduction d'au moins 90 % du composant monoclonal sérique et composant monoclonal urinaire < 10 mg/24h En cas de maladie mesurable uniquement sur les CLL : réduction d'au moins 90 % de la dCLL
Réponse complète (RC)
Immunofixation sérique et immunofixation urinaire négatives ET disparition des plasmocytomes ET plasmocytose médullaire < 5 % En cas de maladie mesurable uniquement sur les CLL : ratio CLL kappa / CLL lambda normal et complément des critères précédents
Réponse complète stringente (RCs)
Réponse complète telle que définie ci-dessus ET ratio CLL kappa / CLL lambda normal ET absence de cellules clonales dans la moelle osseuse en cytométrie en flux
Maladie stable (MS)
Absence de critères de MP, RP, TBRP, RC ou RCs
Maladie progressive (MP)
<ul style="list-style-type: none"> ● Augmentation de 25% par rapport à la valeur la plus basse atteinte d'au moins un des marqueurs suivants (des critères d'augmentation en valeur absolue sont également requis) : <ul style="list-style-type: none"> -composant monoclonal sérique (augmentation d'au moins 5 g/L) -composant monoclonal urinaire (augmentation d'au moins 200 mg/24h) -plasmocytose médullaire (le pourcentage doit être au moins de 10%) -pour les patients n'ayant pas une maladie mesurable, augmentation de la dCLL d'au moins 100 mg/L ● et/ou apparition de lésions osseuses ou de plasmocytomes ou augmentation de taille des lésions osseuses ou plasmocytomes existants ● et/ou apparition d'une hypercalcémie (> 2.65 mmol/L) liée au myélome

1.1.5 Evaluation de la MRD

Avec l'évolution de la prise en charge des patients et l'apparition de nouveaux traitements, de plus en plus de patients atteignent le stade de RC et les techniques immunochimiques ne sont plus suffisamment sensibles pour détecter la présence ou non du composant monoclonal. De nouvelles méthodes ont donc été développées afin de détecter et mesurer la maladie résiduelle minimum (MRD = Minimal Residual Disease). Ces méthodes sont la cytométrie en flux (CMF) et le NGS (Next Generation Sequencing) (10,11). Selon les recommandations de l'IMWG, ces méthodes permettent une sensibilité minimum de 10^{-5} , c'est-à-dire qu'elles sont capables de détecter un plasmocyte monoclonal parmi 100 000 leucocytes. La fiabilité et la sensibilité de ces méthodes ont déjà été validées à de nombreuses reprises et elles ont maintenant leur place en routine dans le suivi des patients atteints de myélome. La MRD pourrait être utilisée dans les prochaines années comme critère principal pour les essais cliniques évaluant l'efficacité des nouvelles thérapeutiques (12,13). Il reste cependant un inconvénient majeur commun à toutes ces techniques, l'analyse doit être effectuée sur un prélèvement de moelle osseuse. La fiabilité de l'examen est donc fortement corrélée à la qualité du prélèvement, qui n'est pas toujours évident à réaliser. De plus la présence des plasmocytes clonaux tumoraux n'est pas homogène dans la moelle, ce qui peut induire des résultats faussement négatifs. Enfin la ponction de moelle osseuse est un acte invasif pour le patient, ce qui peut avoir un impact sur la qualité de vie ainsi que sur la régularité du suivi.

1.1.6 PET-scan

La Tomographie par Emission de Positrons (TEP) est un examen radiologique consistant à injecter au patient un isotope radioactif, généralement le 18-fluorodesoxyglucose, qui va se

fixer préférentiellement sur les cellules du corps dont le métabolisme est le plus important. La TEP est généralement couplée à un scanner, permettant ainsi d'obtenir une évaluation fonctionnelle et morphologique par imagerie. Les cellules tumorales ayant une forte activité métabolique, le PET-scan est un examen très utilisé en pratique courante en oncologie. En 2017, l'IMWG a publié ses recommandations concernant l'utilisation du PET-scan dans la prise en charge du myélome (14). Le PET-scan est ainsi indiqué dans le myélome multiple symptomatique, le myélome indolent et le plasmocytome. Il permet en effet une bonne évaluation de la maladie extra-médullaire.

1.1.7 La MRD sanguine

L'utilisation de techniques très sensibles pour détecter la présence de très faibles concentrations de composants monoclonaux est actuellement en évaluation. Les techniques de détection d'ADN circulant ou encore de cellules tumorales circulantes, bien que prometteuses, ne semblent pas pour l'heure capable de jouer ce rôle de MRD sanguine (15,16). Les techniques de spectrométrie de masse, largement utilisées dans les laboratoires de diagnostic, sont des outils de choix. Cependant la stratégie analytique est très dépendante de l'analyte concerné, et l'analyte « composant monoclonal » a pour principale caractéristique d'être unique, ce qui est à la fois un avantage et un inconvénient.

1.2 ASPECTS ANALYTIQUES

1.2.1 L'analyte : Le composant monoclonal

Les lymphocytes B jouent un rôle central dans l'immunité adaptative du fait de leur production d'immunoglobulines. Les immunoglobulines sécrétées protègent l'organisme

contre les pathogènes étrangers (bactéries ou virus par exemple) en se liant aux antigènes et en recrutant d'autres cellules immunitaires ou en neutralisant elles-mêmes l'antigène (17). Les immunoglobulines sont des protéines homodimériques composées de deux chaînes lourdes (HC pour heavy chain) et de deux chaînes légères identiques (LC pour light chain). Chaque chaîne légère s'apparie avec une chaîne lourde, et les 2 chaînes lourdes s'apparient entre elles via des ponts disulfures [figure 2]. Une chaîne lourde a un poids moléculaire moyen de 50 kDa, une chaîne légère de 20-25 kDa. Les chaînes légères et les chaînes lourdes possèdent chacune deux régions distinctes appelées domaine constant et domaine variable. Le domaine constant de chaque chaîne est situé au niveau de la partie C-terminale et contient un épitope qui définit l'isotype de la chaîne. Il existe 5 isotypes différents pour les chaînes lourdes : IgA, IgM, IgG, IgD ou IgE ; et deux pour les chaînes légères : kappa ou lambda. Le domaine variable des chaînes lourdes et légères est situé au niveau de la région N-terminale et contient la séquence peptidique qui reconnaît et fixe l'antigène. Les cellules B vont créer des chaînes lourdes et légères en réarrangeant aléatoirement différents segments de gènes spécifiques aux immunoglobulines. Lorsque ces réarrangements génèrent des séquences protéiques fonctionnelles pour les deux types de chaînes, l'immunoglobuline spécifique est créée et exprimée à la surface de la cellule. Lorsque ce processus est effectué, la cellule subit une exclusion allélique afin que chaque cellule B n'exprime qu'une seule immunoglobuline (18). Ainsi, chaque cellule B est définie par un réarrangement génétique particulier qui code pour une immunoglobuline spécifique. Il existe jusqu'à 10^{12} séquences de réarrangement possibles, chacune codant pour une immunoglobuline unique et constituant le répertoire polyclonal normal des immunoglobulines (19).

Dans le cas du myélome il s'agit d'une expansion monoclonale de cellule B. Toutes les cellules descendent du même clone et en conséquence, produisent la même immunoglobuline.

L'immunoglobuline monoclonale ainsi produite possède toujours les mêmes caractéristiques, du point de vue de la charge, dépendante de la séquence d'acides aminés, et de son poids moléculaire.

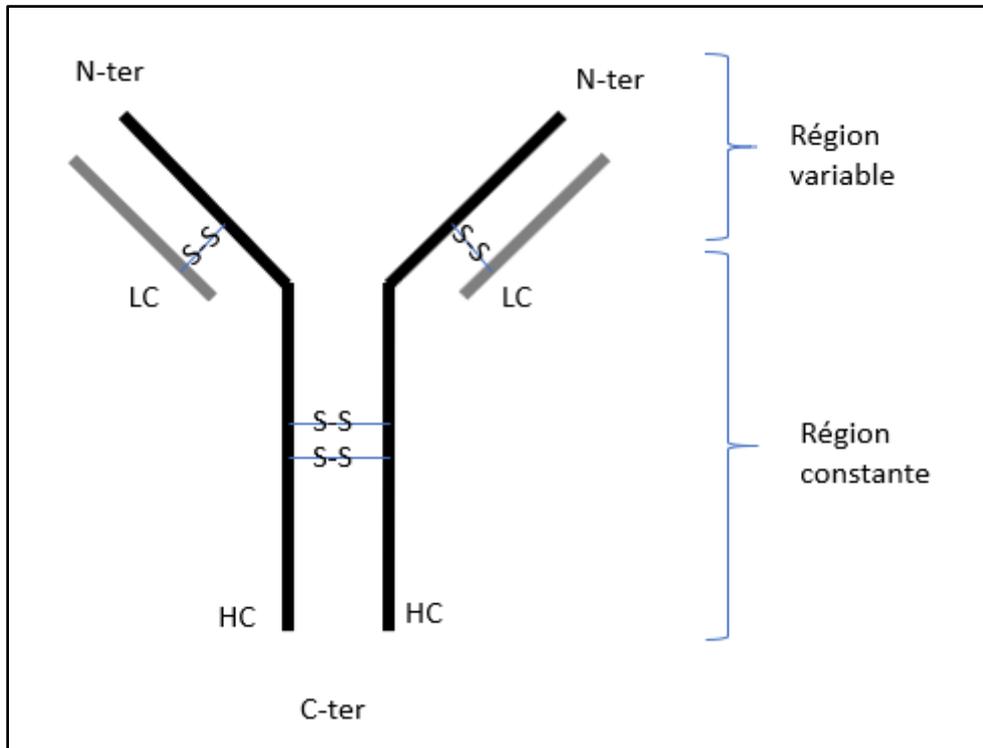


Figure 2: schéma d'une immunoglobuline

En électrophorèse, c'est la charge native de la protéine qui confère sa mobilité à l'immunoglobuline monoclonale mais cette spécificité est parfois insuffisante pour affirmer la présence ou non du composant monoclonal initial. Les techniques de spectrométrie de masse utilisant le poids moléculaire pour séparer les molécules entre elles semblent pouvoir apporter une meilleure spécificité.

1.2.2 L'outil spectrométrie de masse

1.2.2.1 Principe

La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge après ionisation (rapport m/z). Il existe de nombreuses applications de la spectrométrie de masse en biologie clinique, que ce soit en biochimie pour l'analyse des stéroïdes, en pharmacologie pour le dosage des médicaments, en toxicologie pour la recherche de drogues ou encore en microbiologie pour l'identification de pathogènes (20,21).

Il existe plusieurs méthodes de détection par spectrométrie de masse sur lesquelles nous ne nous attarderons pas en détails, mais toutes suivent les mêmes grands principes :

- extraction de l'échantillon
- ionisation des molécules d'intérêt
- séparation suivant le rapport m/z
- amplification et détection du signal

La technique de spectrométrie de masse utilisée pour ce travail est appelée MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight).

1.2.2.2 L'ionisation MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation)

La désorption et l'ionisation laser assistées par matrice (MALDI pour Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) a été décrite en 1988 par Karas et Hillenkamp (22). Cette technique permet d'ioniser une large gamme de molécules de haut poids moléculaire, comme les

protéines, avec une préparation et une mise en œuvre rapides et simples. Dans un premier temps, la substance à analyser est mélangée à une solution de molécules organiques de petite taille, appelée matrice, et possédant une forte capacité d'absorption à la longueur d'onde du laser. Cette solution est déposée à la surface d'une plaque métallique appelée cible MALDI. Après évaporation du solvant, il en résulte un dépôt cristallisé de matrice et d'analyte, dans lequel les molécules de matrice sont en large excès vis-à-vis des molécules d'analyte. La deuxième étape a lieu sous vide au sein de la source du spectromètre de masse. Le dépôt cristallisé est alors irradié par le faisceau laser via des impulsions intenses et de courte durée. L'énergie ainsi transmise est absorbée par la matrice. Cet apport d'énergie très localisé induit la sublimation des cristaux de la matrice et provoque l'expansion de la matrice en phase gazeuse entraînant avec elle l'analyte intact (23). Lors de cette expansion il existe un échange de protons entre la matrice et l'analyte permettant la réaction d'ionisation. Les ions ainsi formés sont alors accélérés par un champ électrostatique en direction de l'analyseur TOF (Time Of Flight) [figure 3]. Cette technique d'ionisation permet une meilleure sensibilité. D'une part l'excès de matrice permet une meilleure séparation des molécules d'analyte qui sont isolées les unes des autres, facilitant l'ionisation. D'autre part la matrice absorbe la majeure partie de l'énergie du laser pour ensuite la redistribuer aux molécules d'analyte. Cela permet d'utiliser une haute intensité pour les énergies d'ionisation sans risque d'endommager les molécules d'analyte. Enfin puisque le processus est indépendant des propriétés d'absorption et de la taille de l'analyte, l'ionisation MALDI permet de traiter des molécules de très haut poids moléculaire, pouvant atteindre plusieurs centaines de kDa (24). Cette méthode est donc la plus utilisée pour l'ionisation des peptides, protéines et autres biopolymères, ainsi que pour les anticorps monoclonaux (25).

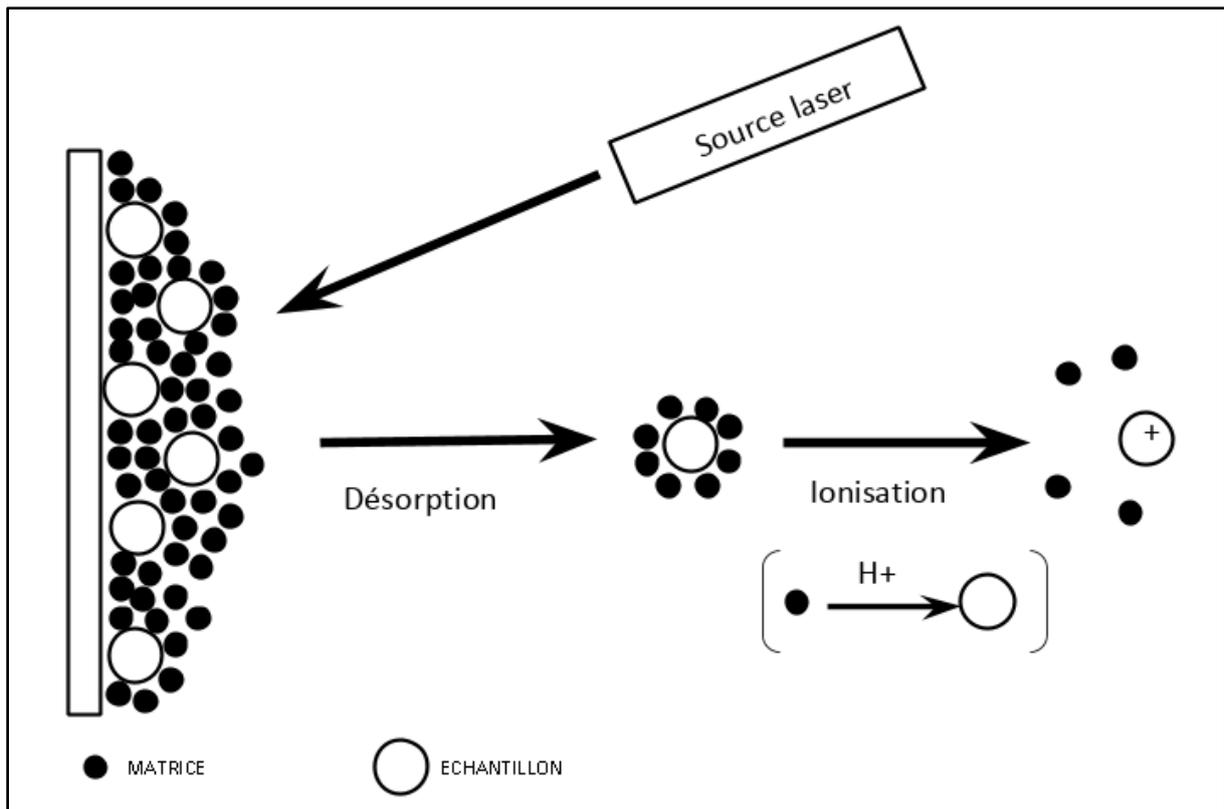


Figure 3 : MALDI TOF

1.2.2.3 L'analyseur TOF (Time Of Flight)

Les premières descriptions des analyseurs à temps de vol (Time Of Flight) datent des années 40 (26) et leur commercialisation et utilisation en recherche datent des années 50 (27). Le principe de cet analyseur est simple : séparer les ions en fonction de leur vitesse lorsqu'ils se déplacent au sein d'une zone sous vide et libre de champ magnétique appelée tube de vol. Les ions sont expulsés par paquet ce qui permet un couplage optimal avec la technique d'ionisation MALDI qui produit des ions par intermittence. Ils sont ensuite accélérés vers le tube de vol grâce à une différence de potentiel appliquée entre deux électrodes au sein de cette zone d'accélération. Tous les ions acquièrent la même énergie cinétique et donc seule leur différence de masse sera à l'origine de leur différence de vitesse. Les ions sont ensuite

expulsés au sein du tube de vol où ils sont séparés en fonction de leur vitesse avant d'atteindre un détecteur situé à l'extrémité du tube de vol. Les rapports m/z sont ensuite déterminés en mesurant le temps nécessaire à chaque ion pour atteindre le détecteur : plus l'ion possède un rapport m/z faible, plus sa vitesse sera élevée et donc plus le temps nécessaire pour atteindre le détecteur sera court.

Cette relation est modélisée par la formule suivante, où t est le temps de vol, L la distance de vol, e la charge élémentaire d'un proton et V le potentiel appliqué aux électrodes :

$$t^2 = \frac{m}{z} \times \left(\frac{L^2}{2eV} \right)$$

1.2.2.4 Quantification en spectrométrie de masse

Par nature la spectrométrie de masse est une méthode de détection et d'identification plutôt que de quantification. En effet, afin d'obtenir une quantification fiable des composés détectés en spectrométrie de masse, plusieurs pré-requis sont nécessaires. Le plus important d'entre eux, et celui qui pose le plus de difficulté pour la quantification des immunoglobulines monoclonales, est l'utilisation d'un standard interne spécifique. L'étape pré-analytique de préparation des échantillons étant une composante importante de l'analyse en spectrométrie de masse, il convient de s'assurer que celle-ci n'engendre pas de perte de la molécule à doser, ou, dans le cas contraire, que cette perte soit quantifiable. C'est le rôle du standard interne, qui est une molécule rajoutée à l'échantillon, en concentration connue, facilement détectable, et ayant les mêmes propriétés physico-chimiques que la molécule d'intérêt à doser, mais

n'interférant pas avec celle-ci. Le standard interne généralement utilisé est une version deutérée de la molécule à doser, dans laquelle un ou plusieurs atomes d'hydrogène ont été remplacés par un atome de deutérium. Le standard interne deutéré possède donc les mêmes propriétés physico chimiques que la molécule d'intérêt, mais il possède un rapport m/z différent, lui évitant toute interférence. Ainsi l'intensité du signal détecté pour le standard interne sert de référence pour la quantification de la molécule d'intérêt. La difficulté de la quantification des immunoglobulines monoclonales réside donc dans le fait que chaque patient devrait être évalué avec un standard interne personnalisé, dépendant de la protéine monoclonale sécrétée. C'est pourquoi dans ce travail de thèse, aucune quantification n'a été effectuée, les résultats se basent uniquement sur la présence ou non de la protéine monoclonale.

1.3 OBJECTIF

Comme nous l'avons vu précédemment, l'évaluation de la réponse au traitement dans le myélome nécessite un suivi complexe, mettant un œuvre de nombreuses méthodes, présentant toutes des inconvénients. Les techniques immunochimiques peuvent être réalisées sur un simple prélèvement de sang mais manquent de sensibilité. A l'inverse les méthodes d'évaluation de la MRD présentent une bonne sensibilité mais ne peuvent être réalisées que sur un échantillon de moelle osseuse. Les recommandations de l'IMWG préconisent donc le développement de nouvelles méthodes ayant une sensibilité similaire à la MRD mais pouvant être effectuées sur prélèvement sanguin (12). Le développement, et la généralisation en routine dans de nombreux domaines de la biologie, de la spectrométrie de masse semble prometteur et adapté à cette situation. Nous avons donc cherché à évaluer une technique de

spectrométrie de masse pour la détection des composants monoclonaux du myélome, en la comparant avec les analyses effectuées actuellement en routine au laboratoire.

2 MATERIEL ET METHODE

2.1 SELECTION DES ECHANTILLONS : L'ETUDE IMAJEM

Les échantillons ont été sélectionnés au sein de la sérothèque de l'étude IMAJEM. Cette étude ancillaire du projet IFM/DFCI 2009 visait à évaluer l'utilisation de l'IRM et du PET-scan chez des patients atteints de myélome multiple (28). L'étude IFM 2009 avait pour objectif d'évaluer la combinaison de 8 cycles de lénalidomide-bortezomid-déxaméthasone (RVD) seuls versus RVD associée à une autogreffe de moelle osseuse (29). L'étude IMAJEM évaluait l'utilisation de l'IRM et du PET-scan à l'inclusion, après 3 cycles de RVD (pré-RVD4) et en pré-maintenance. Ces patients étaient suivis à différents points de leur traitement, notamment par analyse immunochimique du sérum. Pour ce travail de thèse, nous avons sélectionné, au sein de la sérothèque IMAJEM, 5 points de suivi des patients : screening, pré-RVD4, pré-maintenance, D1M3 de maintenance, et post-maintenance [figure 4].

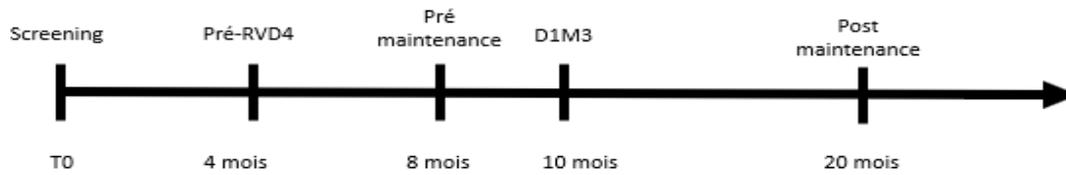


Figure 4 : chronologie de l'étude IMAJEM

2.2 ANALYSE DES ECHANTILLONS

L'analyse par spectrométrie de masse des échantillons a été réalisée par la société Binding Site (Birmingham, Royaume-Uni) sur un MALDI-TOF Shimadzu 8020. Dans un premier temps, les échantillons ont été purifiés afin de ne conserver que les immunoglobulines et d'éliminer les autres protéines sériques. Pour cela, les sérums ont été incubés avec des billes marquées par des anticorps de mouton anti-immunoglobulines humaines. Cinq antisérums polyclonaux spécifiques sont utilisés : anti IgG, anti IgA, anti IgM, anti chaînes légères kappa totales, et anti chaînes légères lambda totales. Ce traitement permet donc pour chaque



Préparateur automatisé TECAN (1) ; spectromètre de masse MALDI-TOF Shimadzu 8020 (2)

échantillon d'obtenir 5 purifications contenant respectivement les IgG totales, les IgA totales, les IgM totales, les chaînes légères kappa libres et liées, et les chaînes légères lambda libres et liées. Vient ensuite l'étape de réduction des échantillons afin de séparer les chaînes légères des chaînes lourdes, grâce à une solution de TCEP (Tris-2-carboxyethyl phosphine hydrochloride) et acide acétique. Une fois réduits, les échantillons sont ensuite mélangés volume à volume avec la matrice CHCA (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique) puis 1 μ L de ce mélange est déposé sur la plaque d'analyse [figure 5]. Chaque échantillon patient est donc traité et déposé 5 fois sur la cible MALDI, correspondant aux 5 antisérums testés. Toutes ces étapes de préparation des échantillons sont effectuées automatiquement par un préparateur TECAN. A noter qu'un deuxième passage des échantillons est nécessaire, avec cette fois-ci, l'utilisation de 2 antisérums supplémentaires : anti chaînes légères libres kappa, et anti chaînes légères libres lambda pour compléter le panel d'analyse.

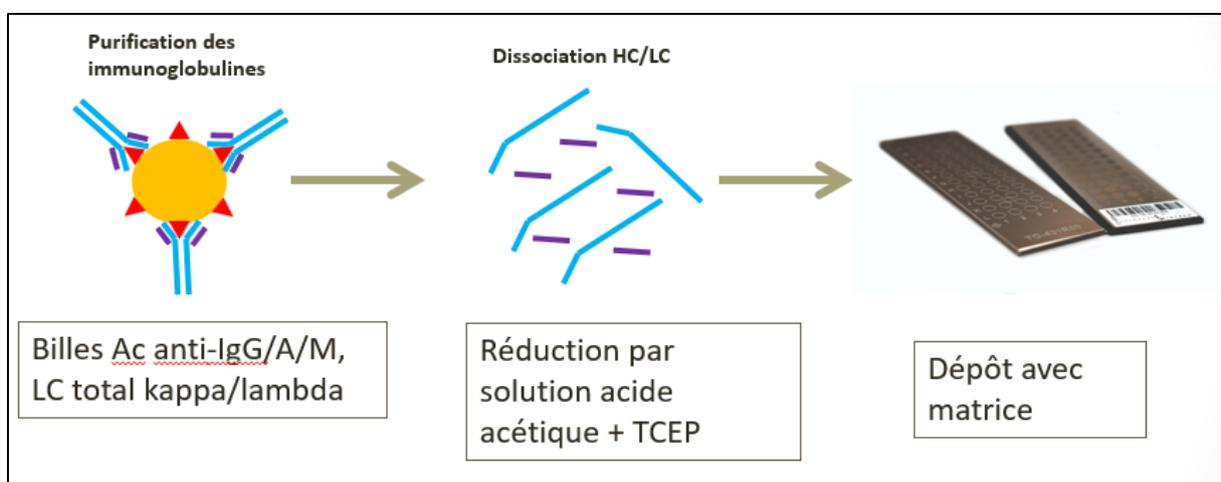


Figure 5 : Préparation des échantillons

Concomitamment aux échantillons patients, des contrôles de qualités sont analysés afin de s'assurer du fonctionnement correct des automates. Trois types de contrôles sont ainsi analysés :

- Mass Calibrator : un mélange de 3 peptides connus : cytochrome C de cheval (12360 Da), myoglobine de cheval (16951 Da) et trypsinogène (23980 Da), déposé sur la cible MALDI de la même manière qu'un échantillon patient. Permet au spectromètre de masse de s'étalonner en fonction de ces peptides dont le m/z est connu et constant [figure 6].
- Spotting Control : un peptide connu (aprotinine) ajouté à chaque échantillon et permettant de s'assurer du bon déroulement de la phase de préparation des échantillons ainsi que de la désorption laser. Ce peptide de m/z connu doit être identifiable sur le spectre de masse obtenu.
- High and Low Protein Control : un mélange d'immunoglobulines polyclonales en concentration connue, analysé de la même manière qu'un échantillon patient et permettant au spectromètre de masse de s'étalonner en fonction de l'intensité obtenue pour ces échantillons de concentrations connues.

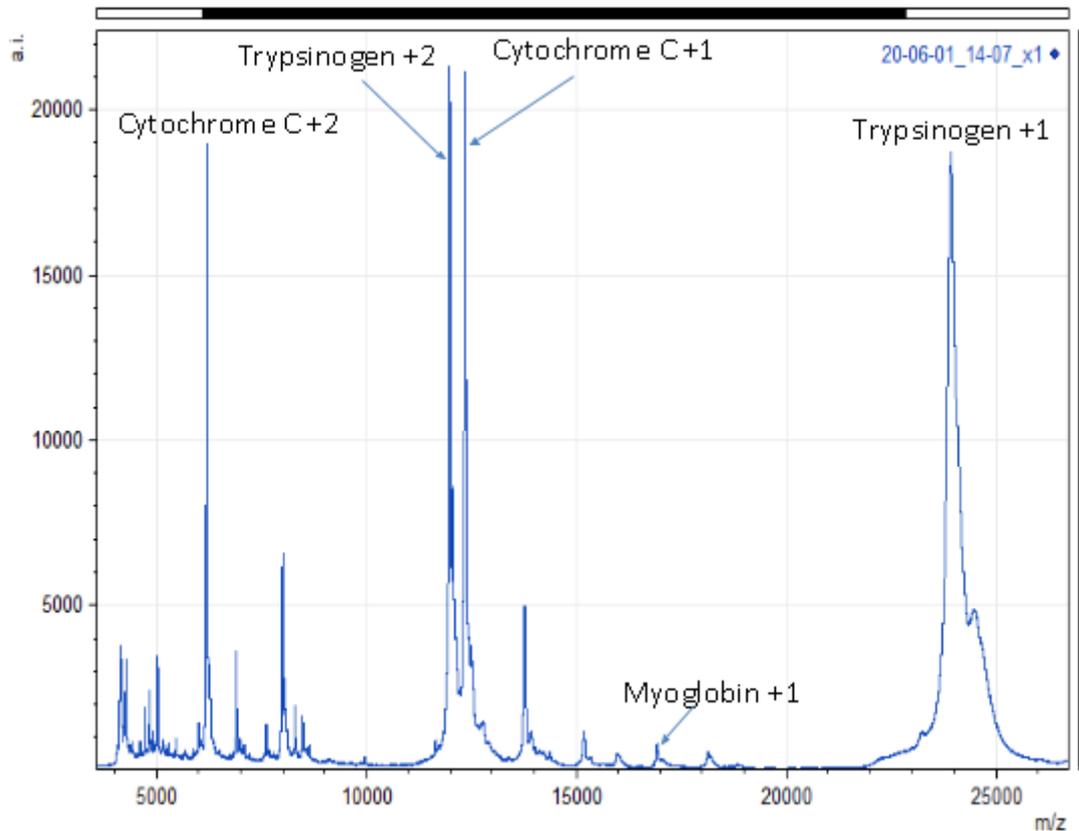


Figure 6 : exemple de passage du mass calibrator

Lors de l'analyse des résultats, seules les chaînes légères sont analysées, sur une étendue de m/z allant de 10.000 à 14.000. En effet lors de l'étape d'ionisation, les chaînes légères se chargent 1+ ou 2+, mais la charge 2+ donne une meilleure sensibilité, c'est donc celle qui est retenue, donnant ainsi un m/z aux alentours de 11-12k, leur poids moléculaire étant de 20-25 kDa.

Les données patients de l'étude IMAJEM ont été obtenues grâce au logiciel DxLab. L'analyse des données ainsi que les statistiques ont été effectuées sur les logiciels Excel et GMRC.

3 RESULTATS

Au total, 564 échantillons provenant de 133 patients ont pu être récupérés de la sérothèque et analysés en spectrométrie de masse. Nous avons pu analyser les échantillons des 5 points de visites prévus (screening, pré-RVD4, pré-maintenance, D1M3, post maintenance) pour 75 patients sur les 133. 38 patients ont eu 4 points analysés, 8 patients ont eu 3 points analysés, 1 patients a eu 2 points analysés, et 11 patients n'avaient que l'échantillon de screening disponible.

Tous les échantillons ont eu une électrophorèse sérique par technique capillaire. Une immunofixation avait été réalisée lors de l'étude IMAJEM sur 318 des 564 échantillons, le dosage des chaînes légères libres par la méthode Freelite® a été effectué sur 385 échantillons. Des résultats de MRD (CMF 4 couleurs avec une sensibilité à 10^{-4}) concomitante sont disponibles pour 126 échantillons. Pour 98 patients nous avons un sérum de la visite de pré-maintenance, visite lors de laquelle les patients bénéficiaient d'un PET-scan dans l'étude IMAJEM. Ces données, ainsi que la répartition des isotypes, sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4 : détails des échantillons analysés

	Nombre d'échantillons
MALDI-TOF	564
Electrophorèse sérique	564
Immunofixation	318
Dosage des chaines légères	385
PET-scan	98
MRD	126
	Isotypes
IgG	60%
IgA	19%
IgM	0%
IgD	2%
IgE	1%
CLL kappa	13%
CLL lambda	5%

3.1 PRESENTATION DES DIFFERENTS PROFILS

Chaque échantillon est testé 7 fois, pour chacun des 7 anticorps utilisés (anti IgG, anti IgA, anti IgM, anti chaines légères kappa totales, anti chaines légères lambda totales, anti chaines légères kappa libres et anti chaines légères lambda libres). Nous allons maintenant présenter les profils typiques les plus fréquents : normal, pic monoclonal, profil oligoclonal.

3.1.1 Profil normal

Un profil normal ne présente aucun pic monoclonal sur chacun des 7 spectres représentés [figure 7]. La première courbe représente la répartition polyclonale gaussienne de la totalité des chaînes légères liées aux IgG. Sur la deuxième courbe, se trouvent les chaînes légères liées aux IgA, sur la troisième les chaînes légères liées aux IgM. Les 4^e et 5^e courbes représentent respectivement les chaînes légères kappa totales et les chaînes légères lambda totales. Sur les 6^e et 7^e courbes sont représentées les chaînes légères libres kappa et les chaînes légères libres lambda respectivement, qui ne sont pas présentes sur ce profil normal.

Le rapport m/z se trouve en abscisse et l'intensité du signal en ordonnée de chacune des courbes. Les chiffres soulignés correspondent au m/z maximum repéré par l'opérateur. La zone entre les deux traits verticaux bleus correspond à la zone de m/z des chaînes légères lambda, et celle entre les deux traits rouges, à la zone des chaînes légères kappa.

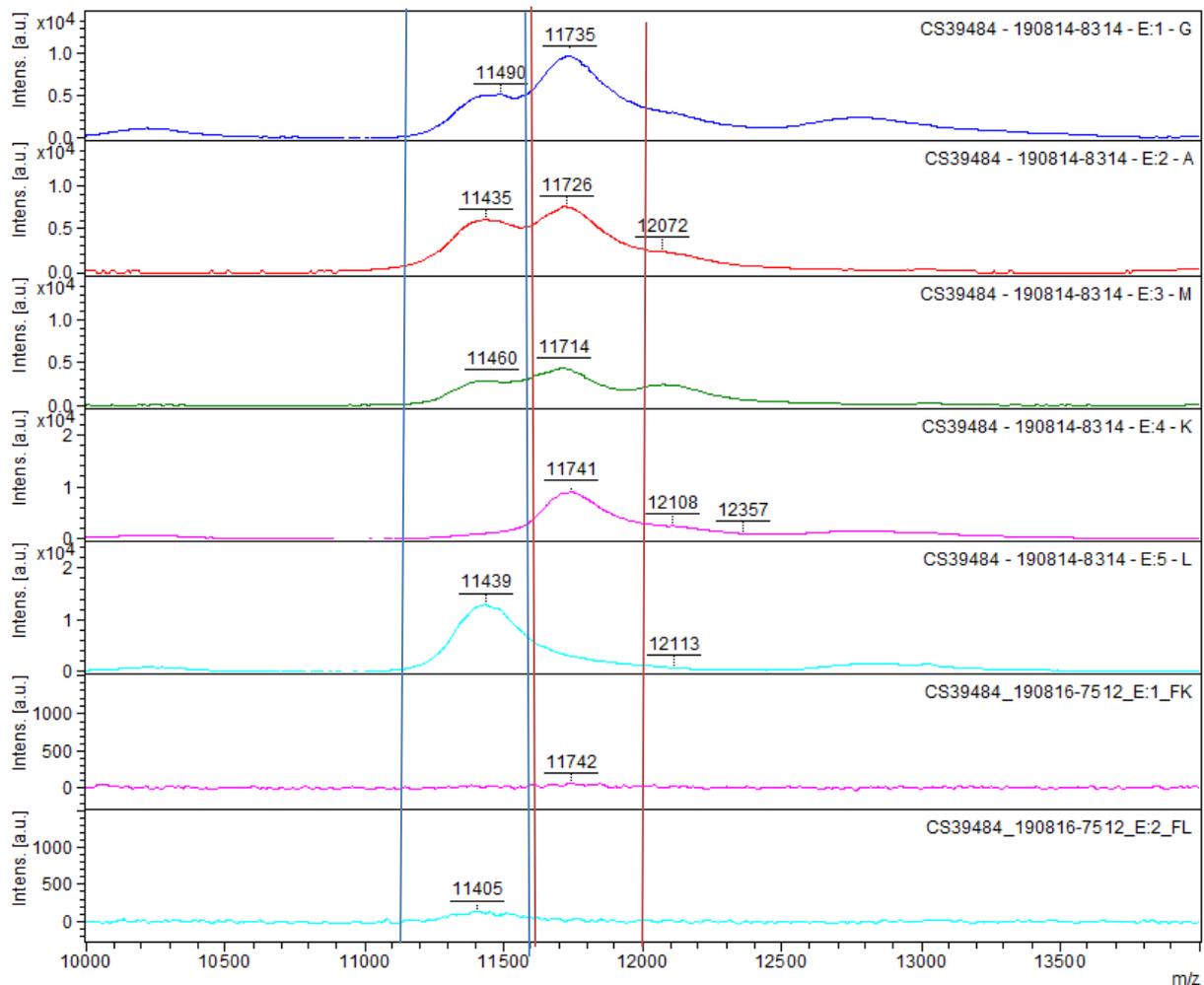


Figure 7 : Profil normal

3.1.2 Profil présentant un pic monoclonal

La figure 8 montre un profil de pic monoclonal, représenté par les flèches noires. Ce pic est présent au niveau des IgG ($m/z = 11889$) et représente les chaînes légères liées à l'IgG monoclonale, des chaînes légères kappa totales ($m/z = 11894$) et des chaînes légères libres kappa ($m/z = 11890$).

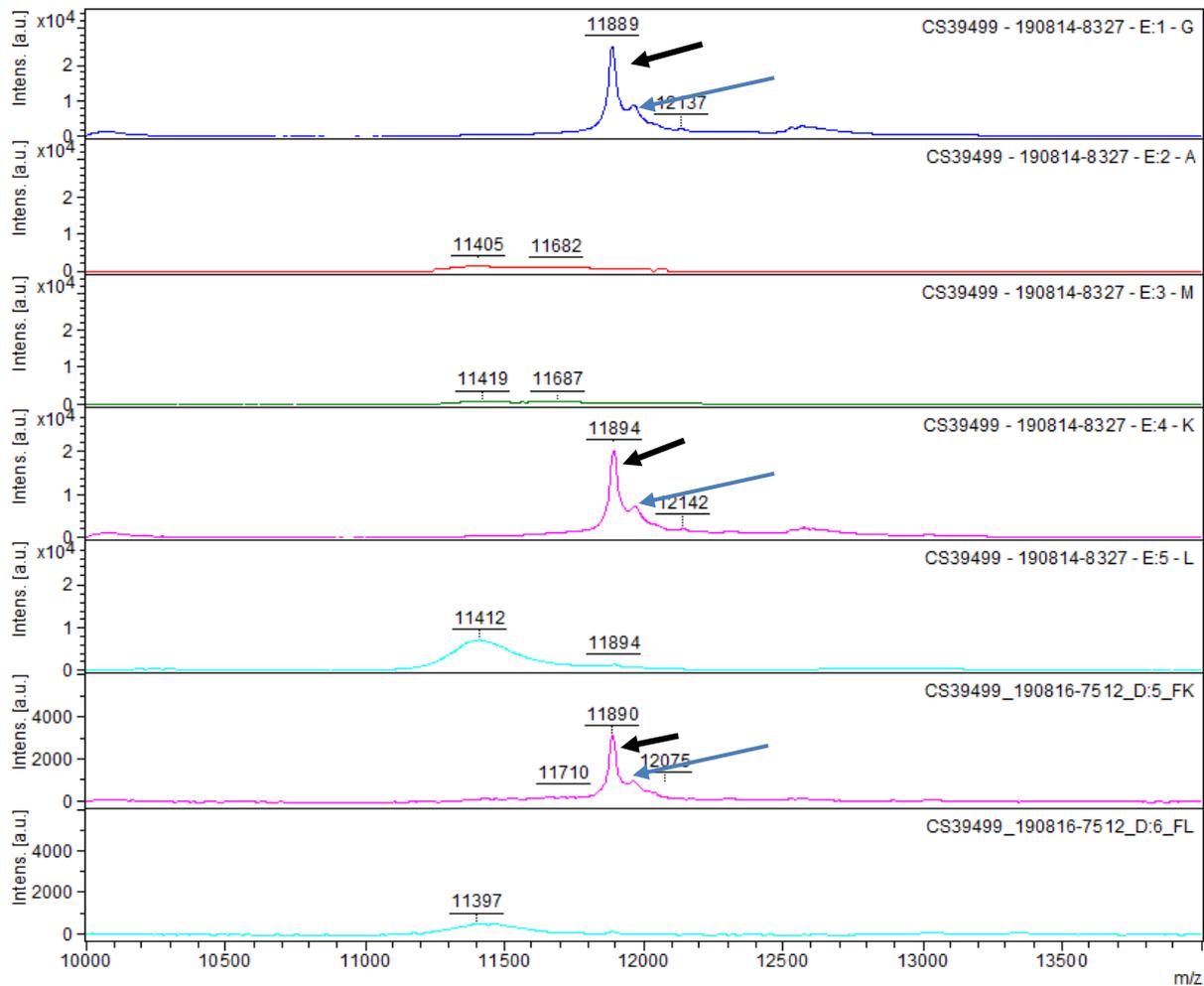


Figure 8 : IgG kappa monoclonale + chaines légères libres kappa monoclonales

A noter que sur chacun de ces 3 pics, on remarque un deuxième pic (flèches bleues), de plus faible intensité, situé à un m/z de +73 par rapport au pic principal. Ce pic secondaire correspond à la présence d'un adduit. Lors de l'ionisation, une molécule de matrice peut se lier à une molécule d'analyte, donnant ainsi une nouvelle molécule de m/z différent appelé adduit. La différence de m/z correspond à celui de la molécule de matrice. On retrouve des adduits dans toutes les techniques de spectrométrie de masse.

3.1.3 Profil oligoclonal

La figure 9 montre l'exemple d'un profil oligoclonal en MALDI-TOF. On note un fond polyclonal sur chacune des 7 courbes, associé à plusieurs pics monoclonaux, non individualisés et de faible intensité par rapport au fond polyclonal. Ce genre de profil immunitaire oligoclonal se retrouve en cas de syndrome inflammatoire ou lors de la reconstitution immunitaire après traitement par chimiothérapie.

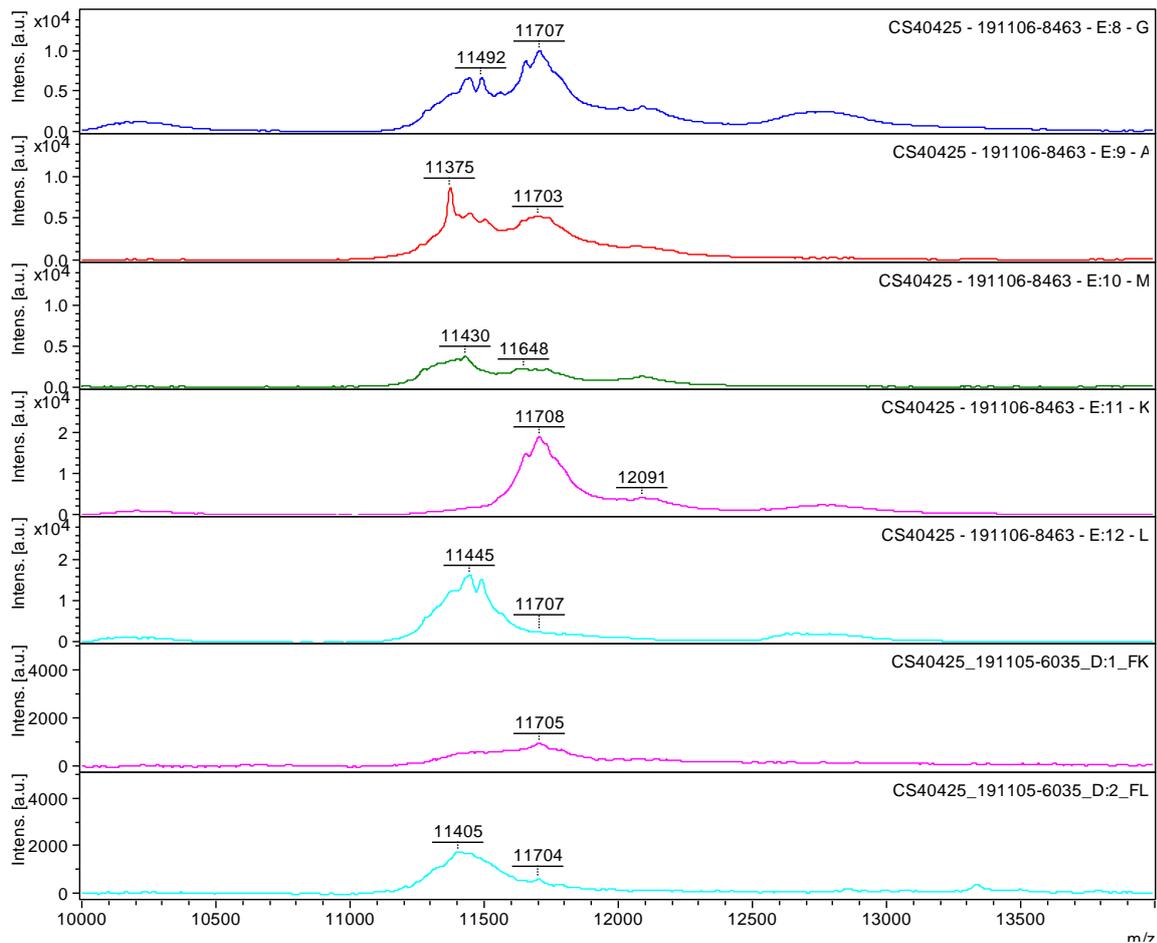


Figure 9 : Profil oligoclonal

3.2 SUIVI D'UN PATIENT

Le fait de posséder plusieurs échantillons par patient au cours du suivi nous a permis d'étudier l'évolution de leurs profils en spectrométrie de masse. Les figures 10 à 14 présentent les différents profils d'un même patient au cours des 5 points de suivi. Les données sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 5 : suivi d'un patient

Visite	Pic (g/L)	Intensité (UA)	Immunofixation	m/z
Screening	65	3.10^4	Positive	11889
Pre-RVD4	5.4	1.10^4	NR	11890
Pre-maintenance	3	6.10^3	NR	11887
D1M3	Absence	5.10^3	Positive	11892
Post-maintenance	Absence	NA	Négative	NA

3.2.1 Screening

On note une IgG kappa monoclonale (m/z 11889) et des chaînes légères libres kappa monoclonales (11890). Sur l'électrophorèse sérique, le pic est estimé à 65 g/L, le dosage des chaînes légères retrouve des chaînes légères libres kappa à 920 mg/L.

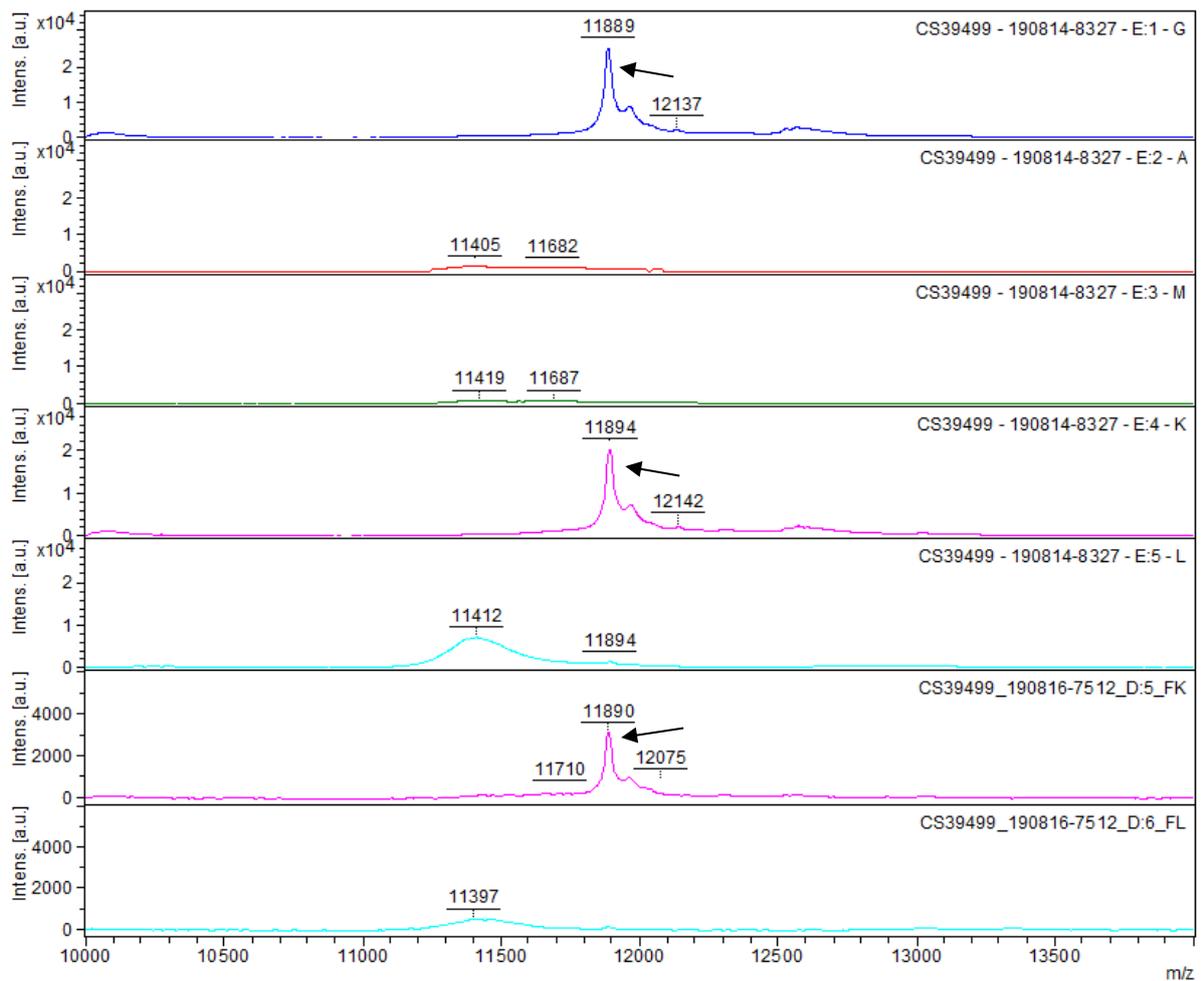


Figure 10 : screening

3.2.2 Pré-RVD4

L'IgG kappa monoclonale (m/z 11890) est toujours présente, mais l'intensité du signal a diminué. En revanche les chaînes légères libres kappa monoclonales ne sont pas retrouvées. Sur l'électrophorèse sérique, le pic est estimé à 5.4 g/L, le ratio des chaînes légères est normal.

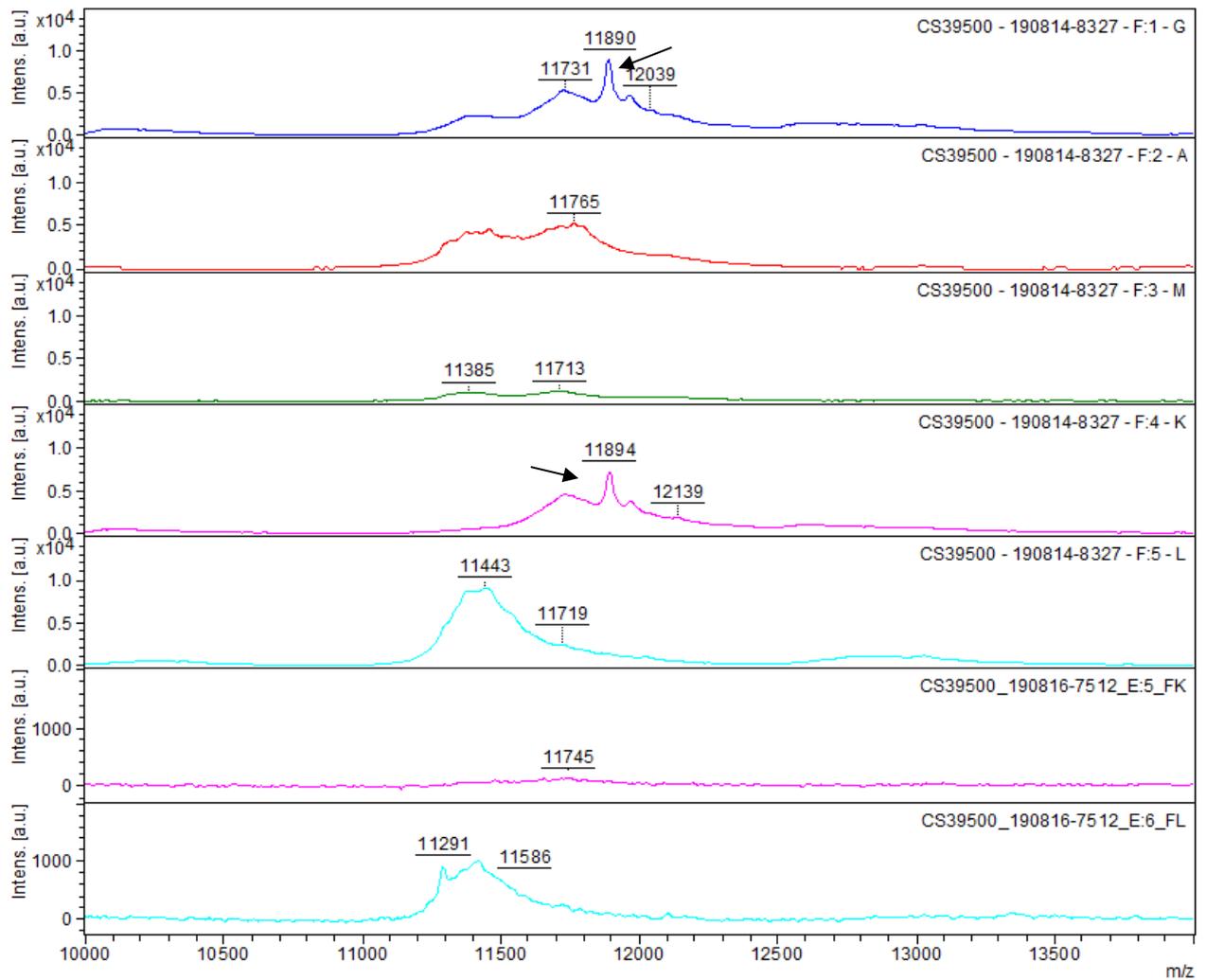


Figure 11 : Pré-RVD4

3.2.3 Pré-maintenance

Persistance de l'IgG kappa monoclonale (m/z 11887) ; l'intensité du signal diminue encore par rapport à la visite précédente. Sur l'électrophorèse sérique, le pic est estimé à 3 g/L.

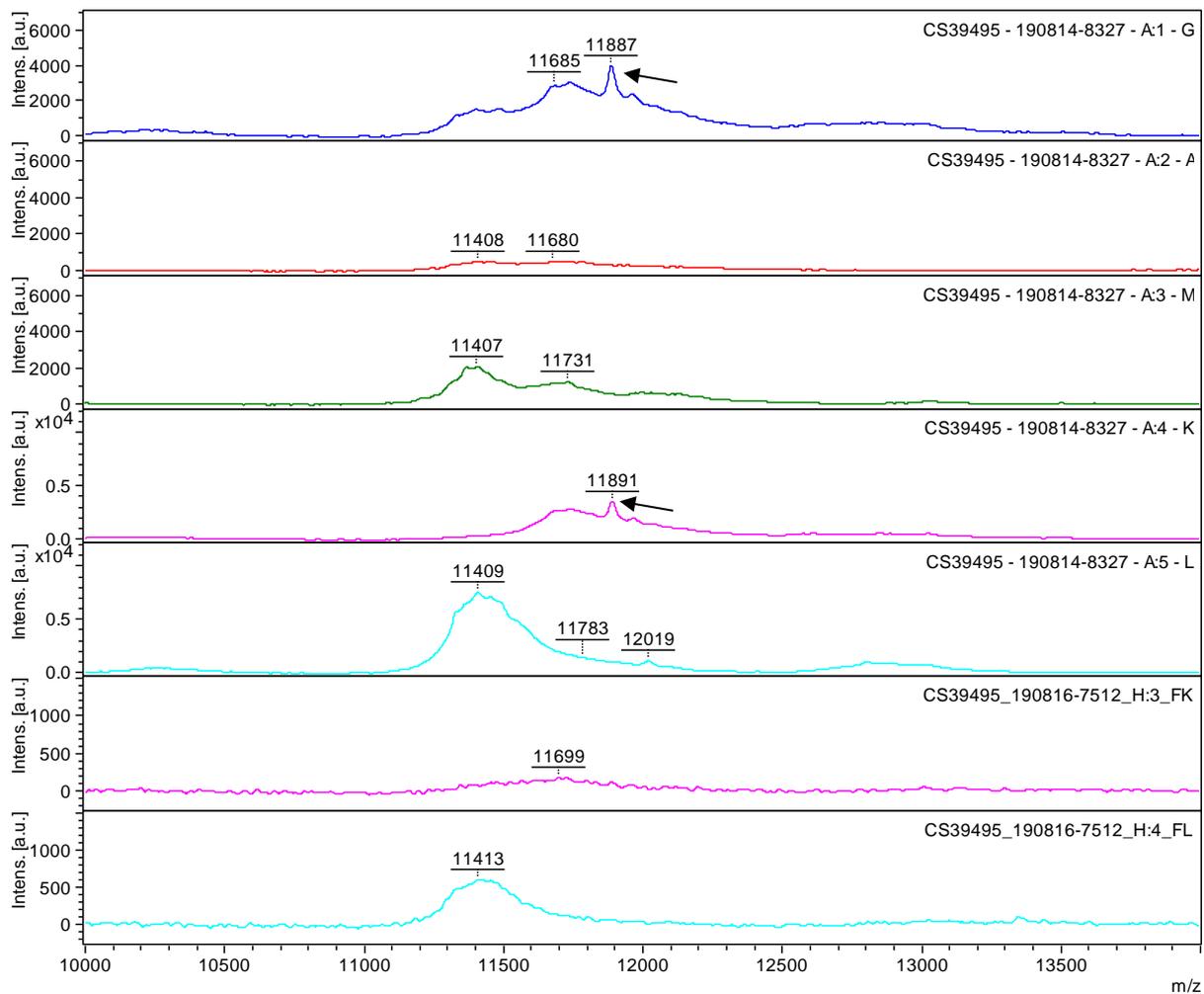


Figure 12 : Pré-maintenance

3.2.4 D1M3

Persistence de l'IgG kappa monoclonale (m/z 11892), dont l'intensité continue de diminuer.
 Reconstitution progressive des immunoglobulines polyclonales G, A et M. Sur l'électrophorèse sérique, le pic n'est plus quantifiable.

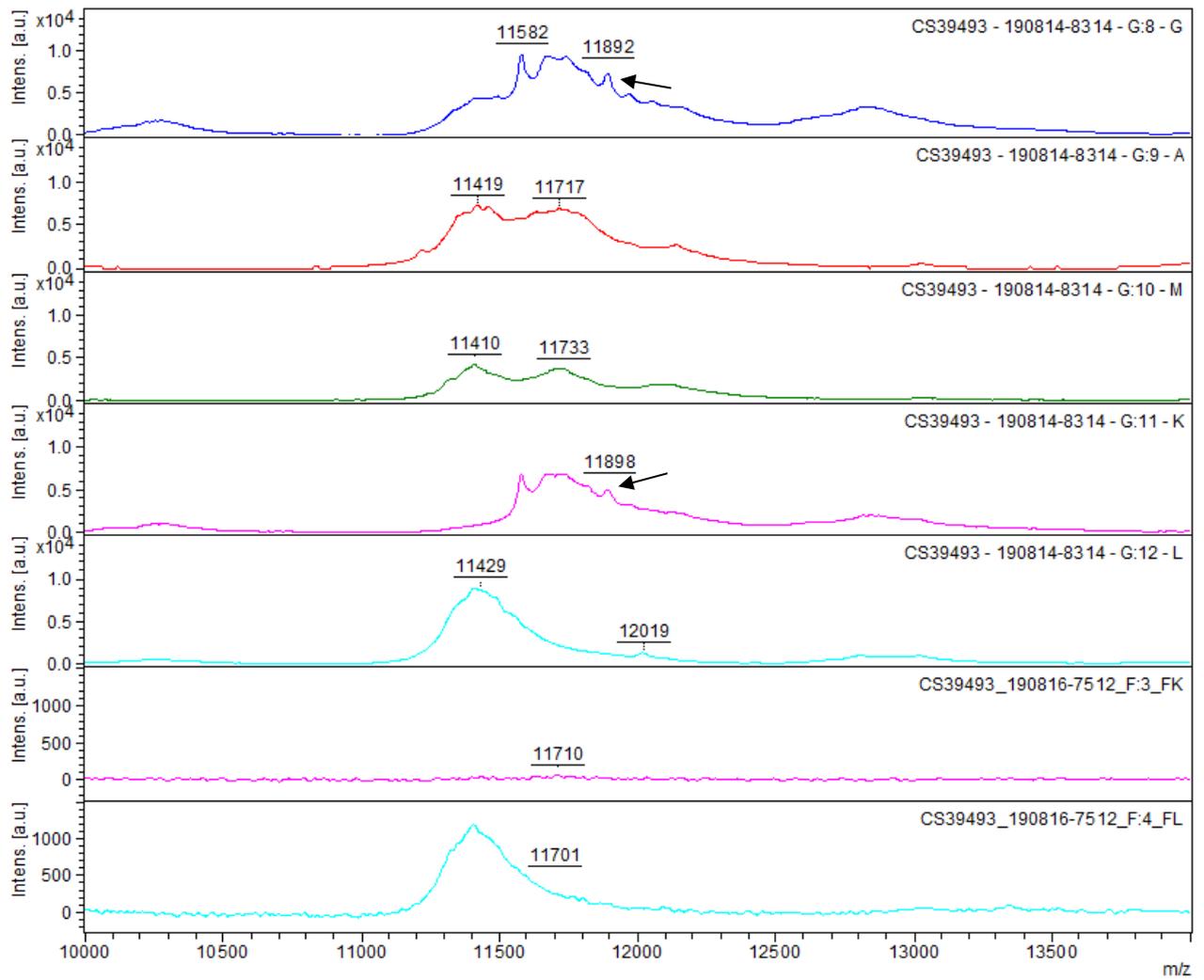


Figure 13 : DIM3

3.2.5 Post-maintenance

L'IgG kappa monoclonale du diagnostic n'est plus détectable (cercle noir). Fond polyclonal des immunoglobulines prédominant.

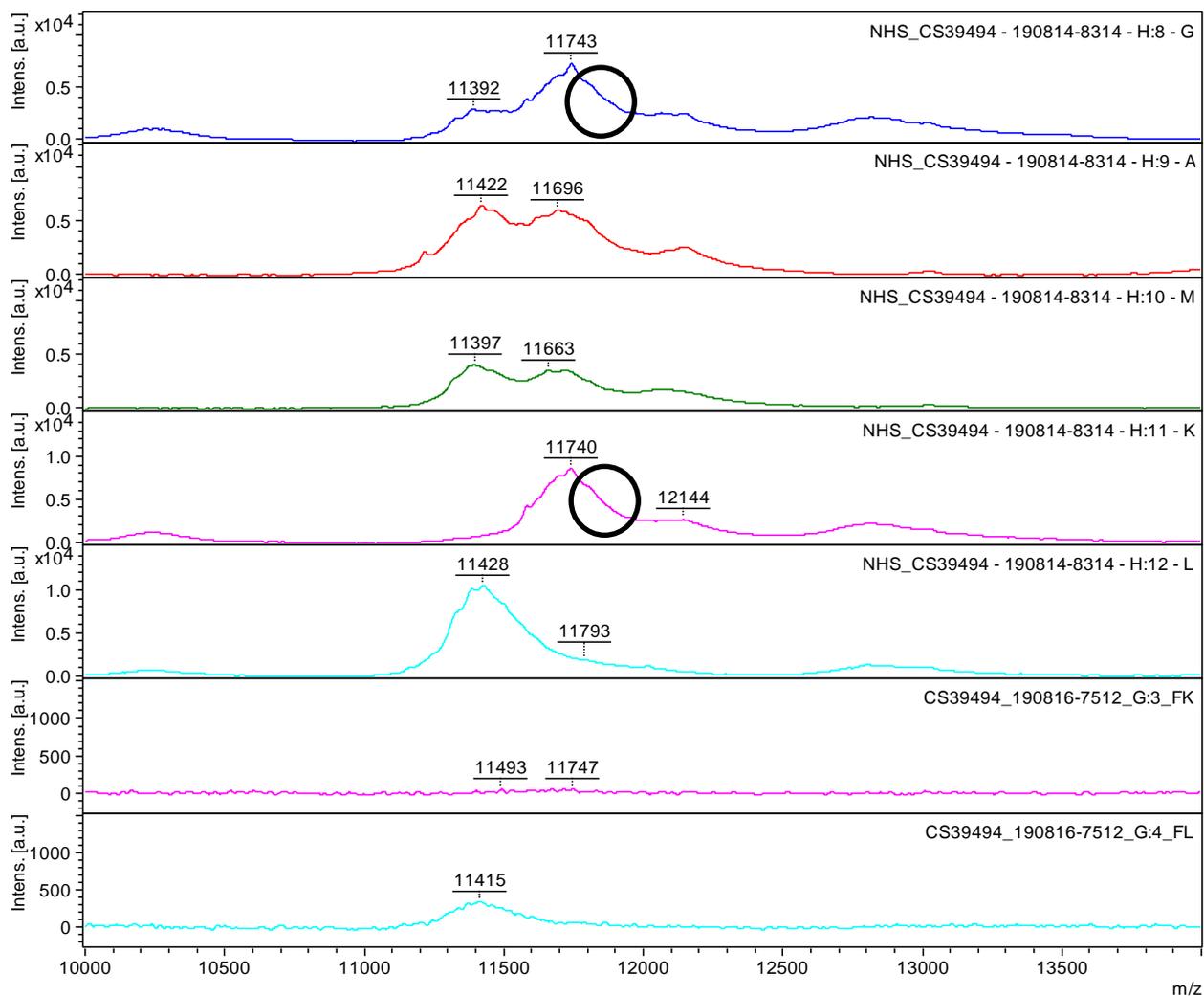


Figure 14 : Post-maintenance

3.3 ANALYSE DU RAPPORT M/Z

En fonction des différentes visites le m/z du composant monoclonal peut varier quelque peu. Ces variations ont été étudiées afin d'évaluer la stabilité de ce rapport m/z pour un composant donné et d'essayer de déterminer un seuil au-delà duquel un pic n'est plus considéré comme appartenant au même composant monoclonal. Pour cela, nous avons répertorié la différence de m/z entre le pic monoclonal du screening et le pic des différentes visites de suivi. Les

résultats sont représentés sur la figure 15. 97% des échantillons ont une différence de m/z inférieure à 10, ce qui nous confirme la bonne répétabilité de la méthode.

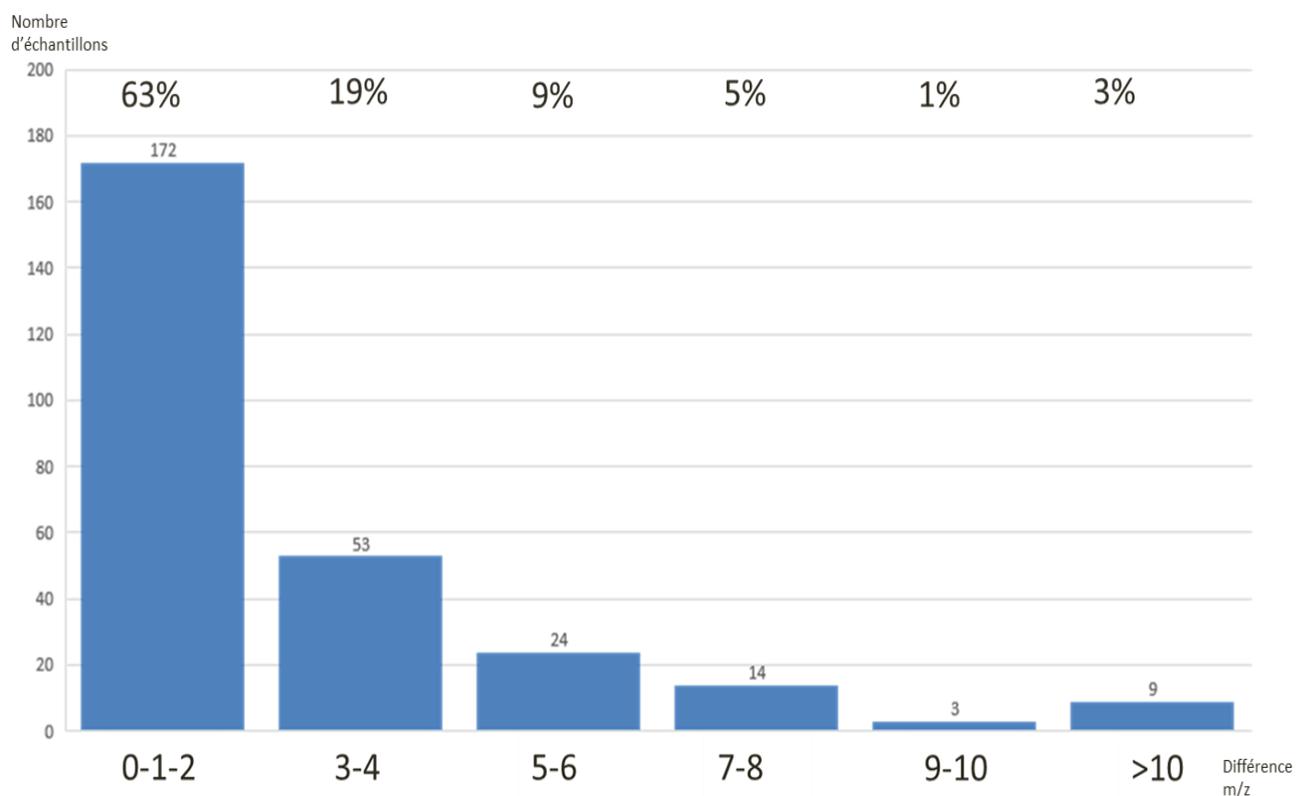


Figure 15 : variabilité du rapport m/z

Devant ces résultats, et en accord avec le laboratoire Binding Site, nous avons décidé de fixer la limite de m/z pour un même composant monoclonal à ± 15 .

Au sein d'un même échantillon il peut y avoir des variations entre le m/z du composant monoclonal au niveau de la courbe des chaînes lourdes et celui de la courbe des chaînes légères. Ces variations étant faibles et systématiquement inférieures à 15, nous avons décidé de ne pas en tenir compte.

3.4 COMPARAISON IMMUNOFIXATION ET MALDI-TOF

Sur les 318 échantillons ayant eu à la fois une analyse MALDI-TOF et une immunofixation, nous obtenons une concordance de 85% : 57 échantillons étaient négatifs dans les deux techniques, 212 échantillons positifs dans les deux techniques, 2 échantillons douteux dans les deux techniques et 47 échantillons discordants. Un échantillon est considéré comme douteux lorsque le fond polyclonal ou oligoclonal des immunoglobulines ne permet pas de trancher quant à la présence ou non du composant monoclonal. Concernant les échantillons discordants, 28 étaient positifs en MALDI-TOF mais négatifs en immunofixation et 19 étaient douteux en immunofixation mais positifs (9 échantillons) ou négatifs (10 échantillons) en spectrométrie de masse. Aucun échantillon n'était positif en immunofixation et négatif en MALDI-TOF. Ces données sont résumées dans le tableau 6. A noter que 46% des échantillons positifs en MALDI-TOF et négatifs en immunofixation étaient des myélomes à chaînes légères, alors qu'ils ne représentent que 18% des échantillons totaux.

Tableau 6 : Comparaison MALDI-TOF et immunofixation

		MALDI-TOF		
		Négatif	Positif	Douteux
Immunofixation	Négatif	57	28	0
	Positif	0	212	0
	Douteux	10	9	2

3.5 COMPARAISON DOSAGE DES CHAINES LEGERES ET MALDI-TOF

Notre étude comportait 24 patients ayant un myélome à chaînes légères, représentant 95 échantillons. 56 échantillons étaient positifs en analyse MALDI-TOF. Nous avons comparé ces résultats aux résultats de dosage des chaînes légères (figure 16). Parmi les échantillons négatifs en MALDI-TOF, deux avaient un ratio CLLi/CLLni supérieur à 2. Inversement, 5 échantillons positifs en MALDI-TOF avaient un ratio normal. Les 88 autres échantillons présentaient un résultat concordant entre les deux techniques.

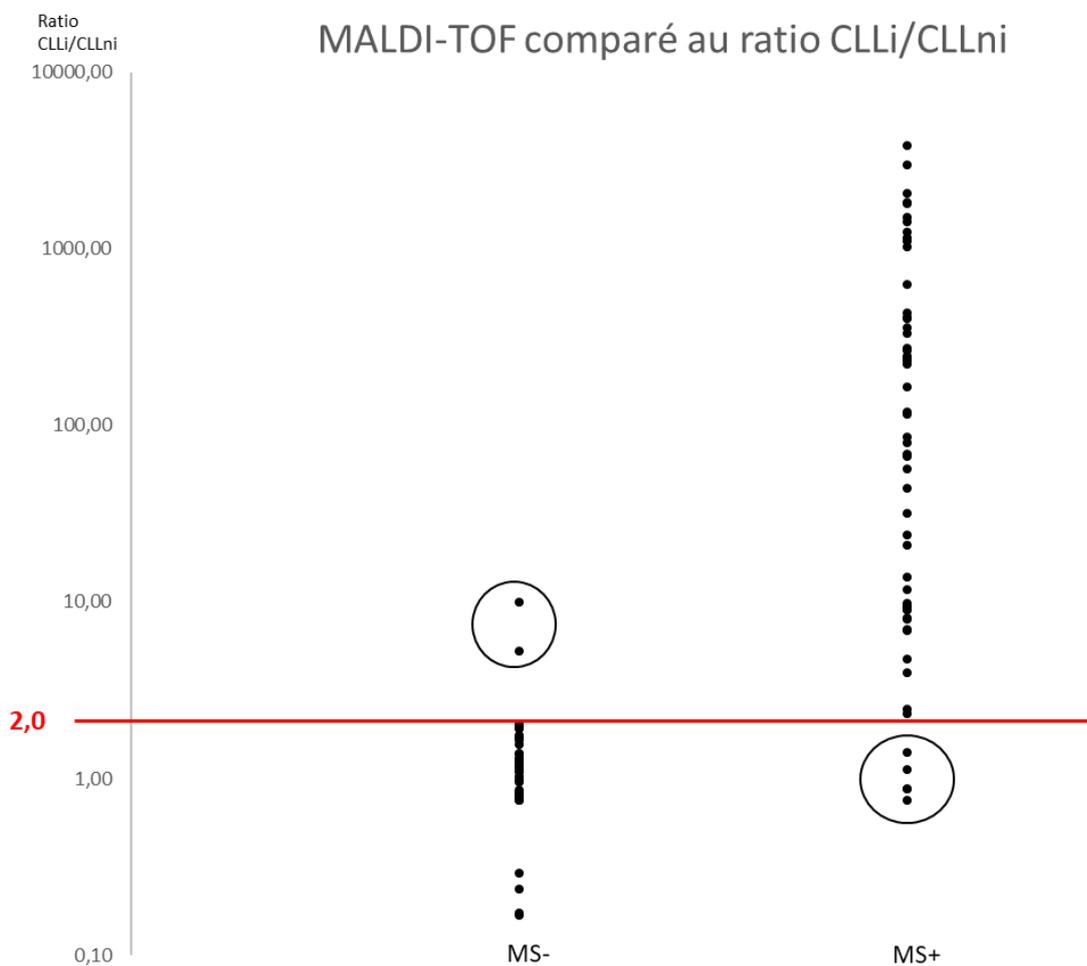


Figure 16 : Comparaison ratio CLLi/CLLni et MALDI-TOF

3.6 ANALYSE DE SURVIE

L'analyse globale sur les 76 patients avec un échantillon en post-maintenance montre une survie sans progression (PFS) significativement meilleure pour les patients négatifs en spectrométrie de masse (36 patients) par rapport à ceux positifs (40 patients) : PFS médiane 1828 jours versus 1057 jours ($p=0.012$) (figure 17).

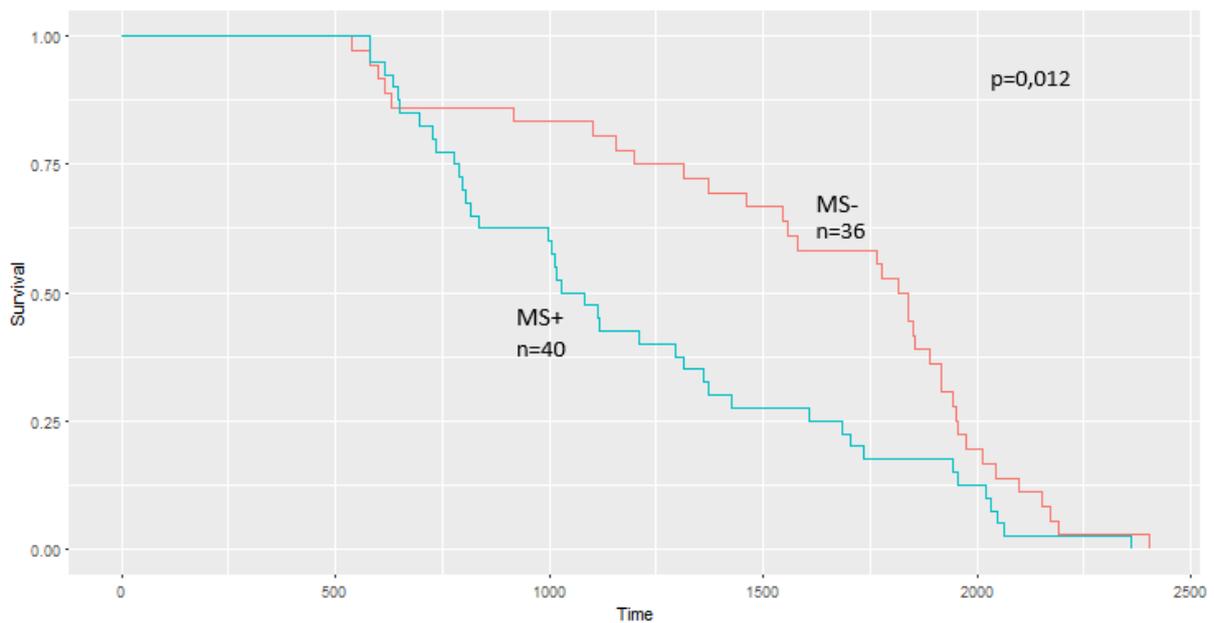


Figure 17 : Survie sans progression (jours), résultats sur tous les patients ayant un échantillon en post-maintenance

En réalisant un focus sur les patients avec une immunofixation négative en post-maintenance (39 patients), la négativité de l'analyse en MALDI-TOF est également associée à une meilleure PFS : 1838 jours (31 patients) versus 1065 jours (8 patients) ($p=0.010$) respectivement. La courbe de survie correspondante n'est pas représentée ici, les effectifs étant trop faibles.

En revanche, parmi les patients dont le ratio de chaînes légères est normalisé, la survie médiane sans progression entre les patients négatifs en MALDI-TOF et ceux positifs n'est pas

significativement différente (1841 jours vs 1252 jours, $p=0.134$). Il en est de même parmi les patients négatifs en MRD en post-maintenance (1868 jours vs 1409 jours, $p=0.791$). Ces résultats sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Survie médiane sans progression (jours)

	MALDI-TOF négatif (Nombre de patients)	MALDI-TOF positif (Nombre de patients)	
	Post-maintenance		
Tous les patients	1828 jours (36)	1057 jours (40)	$p=0,012$
IF négative en post-maintenance	1838 jours (31)	1065 jours (8)	$p=0,010$
Ratio chaînes légères normal en post maintenance	1841 jours (29)	1252 jours (24)	$p=0,134$
MRD 10-4 négative en post maintenance	1868 jours (20)	1409 jours (8)	$p=0,791$
	Pré-maintenance		
PET-scan négatif en pré-maintenance	1334 jours (16)	1351 jours (54)	

4 DISCUSSION

L'utilisation des traitements de première ligne actuels permet aujourd'hui à plus de la moitié des patients d'atteindre le stade de Réponse Complète (12,30). Cependant la majorité d'entre eux finira par rechuter, ce qui laisse supposer la persistance d'une maladie résiduelle non détectée par les méthodes d'évaluation actuelles. Ainsi de nouvelles méthodes d'évaluation

des patients atteints de myélome multiple semblent nécessaires (12). La spectrométrie de masse, utilisée en routine dans de nombreux laboratoires pour le dosage de médicaments, de toxiques ou encore de stéroïdes, est une approche prometteuse pour cette problématique. Ce travail de thèse visait à évaluer une technique de MALDI-TOF, développée par la société The Binding Site, dans le cadre du suivi des patients atteints de myélome multiple. Les analyses ayant été effectuées à Birmingham (Angleterre), au siège de la société The Binding Site, ce travail de thèse avait également pour but de se familiariser avec cette nouvelle technologie avant son implantation au laboratoire de Biochimie Spécialisée du CHU de Nantes à la fin de l'année 2020.

D'un point de vue analytique, les performances de cette technique MALDI-TOF sont satisfaisantes. On note en effet une bonne répétabilité entre les échantillons d'un même patient, avec un rapport m/z du composant monoclonal variant assez peu entre les différentes visites (<10 pour 97% des échantillons testés). Cela nous permet d'affirmer la fiabilité de cette analyse pour le suivi des patients au cours du temps, et nous a permis de déterminer un seuil de variation du rapport m/z au-delà duquel un pic ne peut plus être considéré comme correspondant au composant monoclonal initial : ± 15 m/z. Cependant, il convient de noter que dans le cadre de cette étude rétrospective, tous les échantillons d'un même patient étaient analysés le même jour, au sein de la même série. Ceci ne sera bien évidemment pas le cas lors du suivi des patients, et il conviendra alors de s'assurer cette fois-ci que la reproductibilité du rapport m/z reste satisfaisante avec des échantillons analysés à plusieurs mois d'intervalle. L'analyse comparative entre immunofixation et MALDI-TOF montre également des résultats satisfaisants et un gain de sensibilité et spécificité. 28 échantillons sur les 318 testés étaient positifs en analyse MALDI-TOF et négatifs en immunofixation, nous indiquant une meilleure sensibilité et un seuil de détection plus bas pour le MALDI-TOF. Cette augmentation de

sensibilité se retrouve particulièrement pour les myélomes à chaînes légères. En effet, alors que ceux-ci ne représentaient que 18% du total des échantillons analysés, ils représentent 46% des échantillons pour lesquels le MALDI-TOF était positif et l'immunofixation négative. La technique MALDI-TOF semble donc apporter un gain conséquent en sensibilité au niveau de la détection des chaînes légères. Le dosage des chaînes légères étant la méthode de référence et la plus sensible pour le suivi des myélomes à chaînes légères, nous avons donc comparé le MALDI-TOF et la méthode de dosage Freelite® via le ratio $CLLi/CLLni$ [figure 16]. Nous avons observé une concordance pour 93% des 95 échantillons de patients atteints de myélome à chaînes légères analysés entre les deux méthodes. Parmi les échantillons discordants, on observe tout d'abord 2 échantillons négatifs en MALDI-TOF mais avec un ratio $CLLi/CLLni$ anormal. Ces deux échantillons proviennent du même patient, présentant un myélome à chaînes légères kappa, aux visites pré-RVD4 et pré-maintenance. Une particularité que l'on peut noter ici est que les chaînes légères lambda sont effondrées chez ce patient sur le dosage Freelite® (CLL lambda <1.47 mg/L et CLL kappa = 20.80 mg/ L) alors que sur l'analyse MALDI-TOF elles apparaissent en quantité plus importante que les chaînes légères kappa. En effet même si le MALDI-TOF ne permet pas la quantification, on peut se baser sur l'intensité du signal pour évaluer les concentrations relatives des chaînes légères [figure 18].

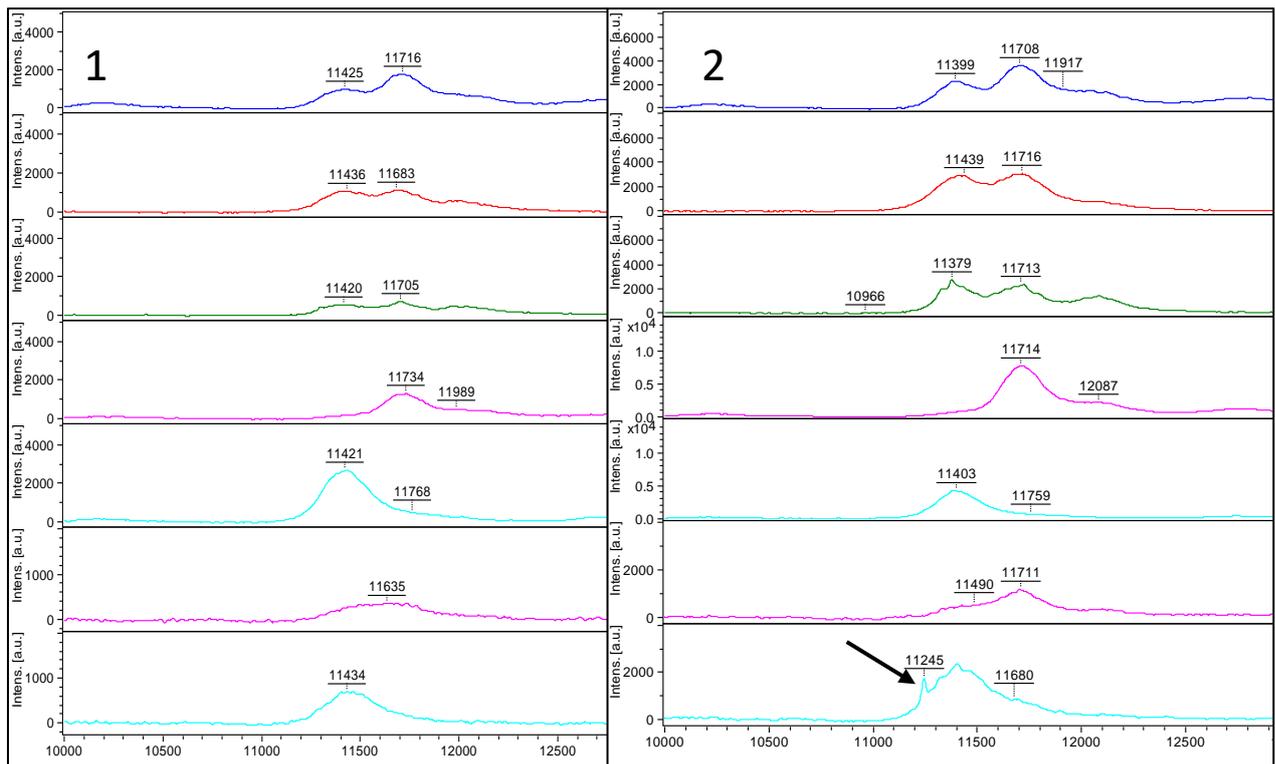


Figure 18 : 1) échantillon discordant, négatif en MALDI-TOF (CLL kappa monoclonale au screening avec un m/z à 11604, non retrouvé sur cette visite) et ratio CCLi/CLLni anormal. Visite Pré-RVD4. On note que les CLL lambda semblent en quantité plus importante que les CLL kappa. 2) échantillon discordant, positif en MALDI-TOF (flèche noire : CLL lambda, m/z 11245) et ratio CCLi/CLLni normal.

Les cinq autres échantillons discordants étaient positifs en MALDI-TOF mais présentaient un ratio CCLi/CLLni normal. Il s'agissait tous d'échantillons provenant de patients atteints d'un myélome à chaînes légères lambda. C'est le cas de l'échantillon 2 présenté sur la figure 18 où le pic monoclonal CLL lambda est indiscutable, avec un rapport m/z à 11245, alors que le dosage des chaînes légères retrouve des CLL kappa à 9.76 mg/L et des CLL lambda à 11 mg/L (ratio normal à 1.13). Concernant la spécificité des antisérums, il ne semble pas y avoir de différence majeure entre les antisérums chaînes légères totales et les antisérums chaînes légères libres. Cependant il arrive que certains échantillons ne soient positifs que sur la piste de l'antisérum chaînes légères totales et d'autres que sur la piste de l'antisérum chaînes légères libres. Il nous semble donc important pour le moment de conserver ces deux types

d'antisérums. Quant au gain de spécificité de l'analyse MALDI-TOF, on le retrouve pour les échantillons douteux en immunofixation. Il n'est en effet pas rare que l'immunofixation soit prise en défaut et ne permette pas de conclure quant à la présence ou non de l'immunoglobuline monoclonale. Cela se produit généralement en cas de profil oligoclonal, ou lorsqu'un fond polyclonal prédomine, ou bien encore à cause de la présence d'un anticorps monoclonal, même si ce n'était pas le cas dans cette étude. Ainsi sur les 21 échantillons testés pour lesquels l'immunofixation a été rendue douteuse, le MALDI-TOF a permis de trancher dans 90% des cas (19/21). Cela constitue un gain de spécificité conséquent, mais néanmoins la spectrométrie de masse n'est pas infaillible : 2 échantillons restaient douteux en MALDI-TOF. La lecture des profils présente les mêmes difficultés, bien qu'atténuées, que l'immunofixation, ainsi il est parfois difficile de conclure au sein d'un profil oligoclonal et l'interprétation de certains profils nécessite un œil exercé et un biologiste expérimenté, comme pour la lecture de l'immunofixation. Par ailleurs, la spécificité du MALDI-TOF est parfois mise en défaut, et plus particulièrement celle des anticorps utilisés pour déterminer l'isotype. Il arrive parfois que chez certains patients présentant un pic monoclonal très important, la spécificité des anticorps soit prise en défaut et qu'une liaison non spécifique se produise. C'est par exemple le cas du profil présenté en figure 19. Ce patient présente une IgG kappa monoclonale associée à des chaînes légères libres kappa monoclonales. Cependant on distingue un pic au niveau des chaînes légères libres lambda (flèche noire) qui est non spécifique, confirmé par l'immunofixation (négative sur la piste lambda) et le dosage des chaînes légères (1.93 mg/L pour les CLL lambda). Ce genre de réaction, bien que rare parmi nos échantillons testés, peut nous induire en erreur sur la nature du composant monoclonal impliqué et doit donc être surveillé.

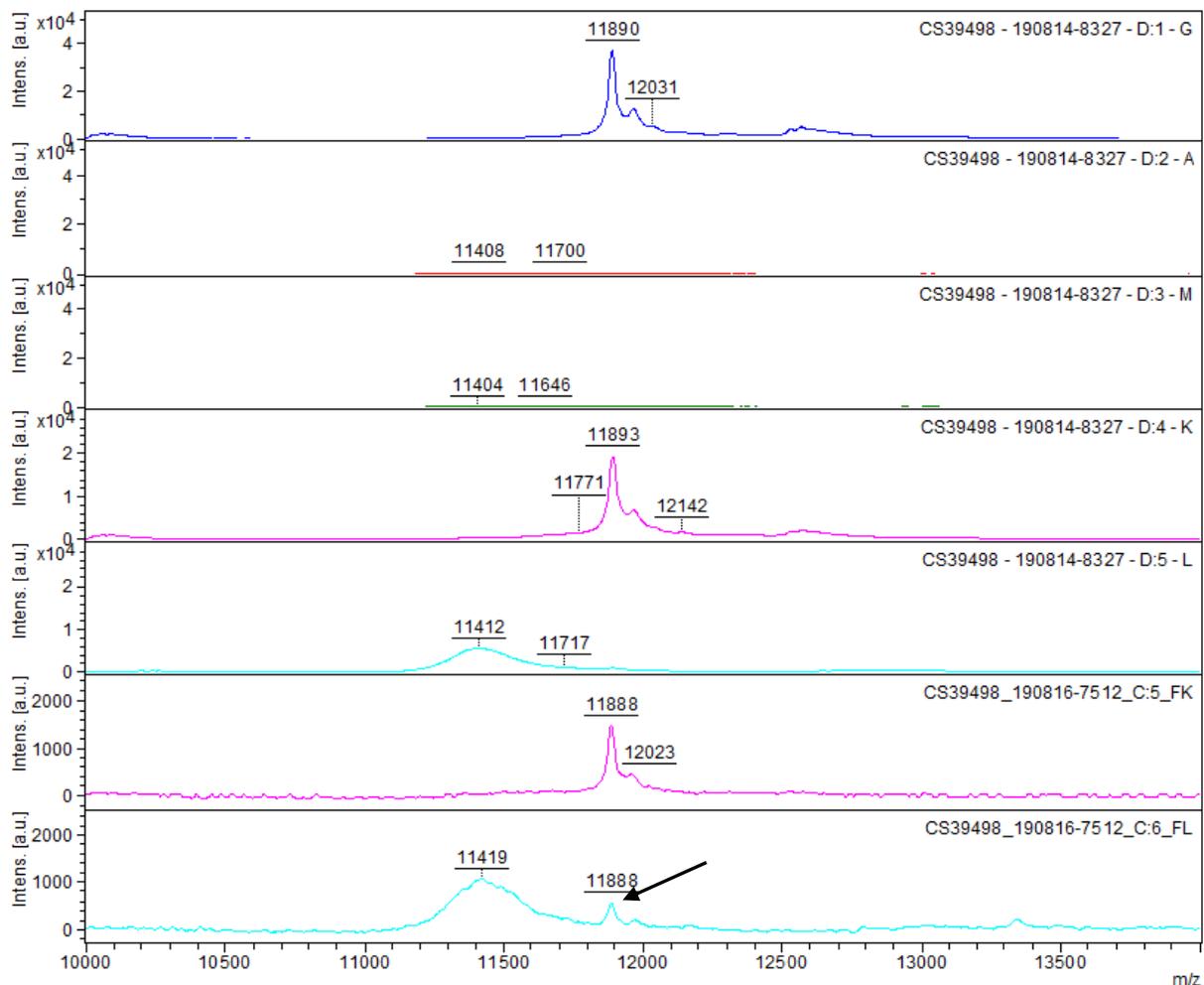


Figure 19 : Défaut de spécificité des anticorps, patient présentant une IgG kappa associée à des CLL kappa. Réaction non spécifique des anticorps anti CLL lambda.

Concernant l'analyse de survie, bien que l'étude n'ait pas été conçue en ce sens, elle nous apporte néanmoins certaines données intéressantes. D'une manière générale, la négativité du MALDI-TOF est en faveur d'une meilleure PFS (1828 jours vs 1057, $p=0.012$). Par ailleurs, la négativité du MALDI-TOF est plus en faveur d'une meilleure PFS que la négativité de l'immunofixation. En effet, parmi les patients dont l'immunofixation était négative, ceux également négatifs en MALDI-TOF obtenaient une meilleure PFS que ceux positifs (1838 jours vs 1065, $p=0.010$). En revanche, bien qu'une tendance en faveur du MALDI-TOF

semble exister, il n'existe pas de gain significatif de PFS quand on le compare à la MRD 10-4. Cela est peut-être dû au faible nombre de patients par groupe. Une étude prospective visant à évaluer le gain ou non en termes de survie du MALDI-TOF par rapport aux autres techniques est nécessaire pour conclure. Enfin, une limite importante de cette étude est la réalisation des analyses par la société The Binding Site en Angleterre, sur laquelle nous n'avons eu aucune visibilité. Seules des captures d'écrans des résultats nous ont été transmises, rendant leur analyse plus compliquée. Encore une fois, l'installation de cette technologie au CHU de Nantes permettra de s'affranchir de cette limite pour des études ultérieures.

De nombreuses autres études rapportent des résultats prometteurs sur l'utilisation de la spectrométrie de masse pour l'identification de la protéine monoclonale, le suivi et l'évaluation de la maladie résiduelle (31). En 2014, Barnidge et al. ont publié le principe de leur technique miRAMM (monoclonal immunoglobulin rapid accurate mass measurement) (32). La technologie utilisée ici était une chromatographie liquide couplée à un analyseur quadrupole TOF. Avec une étape préalable de dissociation des chaînes légères et des chaînes lourdes, cette approche permet d'isoler la protéine monoclonale du sérum du patient, et de suivre son évolution au cours de la prise en charge, en se basant sur le m/z unique de la protéine. Cette étude rapportait alors une sensibilité analytique équivalente aux dosages de chaînes légères et aux électrophorèses sur gel (33). Cette méthode s'est avérée également fiable sur des échantillons d'urine : une étude sur 200 patients retrouve une sensibilité équivalente entre la technique miRAMM et l'immunofixation urinaire, avec une concordance de 97.5% (34). Dans une autre cohorte en 2017, sur 30 patients ayant atteint le stade de réponse complète stringente après autogreffe de cellule souche, 81 % étaient toujours positifs en analyse miRAMM, démontrant ici une meilleure sensibilité que les techniques actuelles d'immunofixation et de dosage des chaînes légères (35). En revanche le statut miRAMM des

patients n'avait pas d'impact sur la durée de survie sans progression. Cette technique a également montré sa fiabilité pour la détection des chaînes légères libres et pour le suivi des patients atteints d'amylose ou de myélome à chaînes légères (36). Les techniques de chromatographie liquide couplée à un quadropole étant peu simples à utiliser en routine et coûteuses, les recherches se sont également portées sur la technique MALDI-TOF, plus facilement automatisable, plus rapide et plus simple d'utilisation en routine (37). En 2016, Kohlhagen et al. publient une étude sur plus de 500 patients montrant que la technologie MALDI-TOF présente des performances similaires à celles de l'immunofixation sérique pour la détection des immunoglobulines monoclonales (38). En revanche la technologie MALDI-TOF ne permet pas à elle seule de déterminer l'isotype de l'immunoglobuline monoclonale. Une étape pré-analytique de préparation et purification des échantillons est nécessaire, utilisant, de la même manière que dans ce travail de thèse, des anticorps dirigés contre les domaines constants des chaînes lourdes GAM et des chaînes légères kappa lambda. Ce couple MALDI-TOF/anticorps a été nommé MASS-FIX et montre des performances similaires à l'immunofixation en termes de détection et d'identification des immunoglobulines monoclonales, avec une corrélation de 98% dans le sérum et 95% dans l'urine (39,40). Cette technique MASS-FIX offre de bonnes performances analytiques, un coût acceptable, ainsi qu'une utilisation facilement adaptable à la routine d'un laboratoire. Elle a remplacé l'immunofixation en analyse de routine à la Mayo Clinic depuis 2018.

Nous avons évoqué précédemment l'impossibilité de réaliser une quantification de l'immunoglobuline monoclonale avec cette méthode. Il existe cependant d'autres méthodes de spectrométrie de masse, en cours d'évaluation actuellement, qui permettraient cette quantification. En utilisant l'approche clonotypique, c'est-à-dire en ne cherchant à analyser que des fragments des régions variables des immunoglobulines et non plus les chaînes

entières, de meilleures performances analytiques sont attendues (41,42). A partir de cette méthodologie, la quantification devient possible en utilisant des isotopes de peptides spécifiques aux patients (43,44). La mise en place de ces techniques est néanmoins encore trop lourde pour un laboratoire de routine et leur application est pour le moment limitée aux laboratoires de recherche.

L'apparition des anticorps monoclonaux dans le traitement du myélome multiple a profondément changé l'approche thérapeutique de cette maladie ces dernières années (45). Cette nouvelle approche thérapeutique s'est également accompagnée de nouveaux défis pour les biologistes, les anticorps monoclonaux interférant avec les techniques de suivi immunochimiques habituelles, notamment l'immunofixation (46,47). En effet, en cas de co-migration entre l'anticorps monoclonal et l'immunoglobuline monoclonale du patient, il n'est pas possible de faire la distinction entre les deux avec une simple immunofixation. Ainsi la profondeur de la réponse ne peut être évaluée de manière précise chez ces patients. En revanche, la spectrométrie de masse permet aisément de faire la distinction entre les deux (48). Cet avantage de la spectrométrie de masse sur l'immunofixation peut s'avérer déterminant à l'heure où de plus en plus d'anticorps monoclonaux font leur apparition dans le traitement du myélome, engendrant ainsi une augmentation du nombre de patients dont la profondeur de la réponse ne pourra pas être évaluée par immunofixation.

En 2019 au congrès de l'American Society of Hematology, Puig et al. ont présenté les résultats de leur étude évaluant l'utilisation de la spectrométrie de masse chez les patients atteints d'un myélome indolent à haut risque (49). Les analyses ont été effectuées par la société The Binding Site, utilisant la même méthode que dans ce travail de thèse. Cette étude retrouve une meilleure sensibilité et spécificité du MALDI-TOF par rapport à

l'immunofixation. La comparaison avec la MRD-NGF à 10^{-5} retrouve une concordance de 70%. Vingt pour cent des patients étaient positifs en MALDI-TOF et négatifs en MRD, expliqués probablement par des faux négatifs de la MRD liés à la nature hétérogène de la maladie au sein de la moelle osseuse. A l'inverse 10% des patients étaient positifs en MRD et négatifs en MALDI-TOF, laissant supposer une meilleure sensibilité de la MRD. En 2020, Derman et al. ont comparé la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS) avec la MRD-NGS 10^{-6} et montrent que la négativité de la LC-MS a un meilleur pronostic sur la durée de PFS que la négativité de la MRD-NGS (50). Ce dernier résultat nous démontre que pour améliorer la sensibilité de la spectrométrie de masse, il est nécessaire de passer par une étape de fragmentation du composant monoclonal, préalablement séparé des autres immunoglobulines. Cette combinaison analytique sera nécessaire pour approcher les performances cliniques de la MRD médullaire et donc pouvoir parler d'une MRD sanguine ou MS-MRD (Mass Spectrometry MRD).

En conclusion, cette technologie MALDI-TOF semble prouver sa supériorité sur l'immunofixation dans le cadre du suivi des patients atteints de myélome multiple, que ce soit sur le plan analytique, en termes de spécificité et de sensibilité, ou sur le plan clinique, en terme de PFS. Cette amélioration est toutefois difficile à évaluer précisément et est à mettre en parallèle avec le coût de l'analyse. Le couple spectromètre de masse Shimadzu 8020 et préparateur automatisé Tecan coûte environ 500.000 € quand un automate Hydrasys pour réaliser les immunofixations ne coûte que 20.000 €. Le prix d'analyse d'un échantillon patient est estimé à 70 € en MALDI-TOF contre 15 € pour une immunofixation. La mise en place de cette technologie au laboratoire de Biochimie Spécialisée du CHU de Nantes devrait permettre une évaluation prospective de ses performances en routine afin de préciser la place de ce nouvel outil dans la prise en charge du myélome multiple.

BIBLIOGRAPHIE

1. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cité 16 janv 2019]. Disponible sur: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/62-enseignement-de-lhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/pathologie-lymphoide/128-myelome-multiple-et-gammopathies-monoclonales-idiopathiques>
2. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*. 28 mai 2009;113(22):5418-22.
3. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. nov 2014;15(12):e538-548.
4. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 sept 2015;33(26):2863-9.
5. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, Mateos MV, Zamagni E, Avet-Loiseau H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 1 juill 2017;28:iv52-61.
6. Brudno JN, Maric I, Hartman SD, Rose JJ, Wang M, Lam N, et al. T Cells Genetically Modified to Express an Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor Cause Remissions of Poor-Prognosis Relapsed Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 29 mai 2018;36(22):2267-80.
7. Durie BGM, Kyle RA, Belch A, Bensinger W, Blade J, Boccadoro M, et al. Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *Hematol J Off J Eur Haematol Assoc*. 2003;4(6):379-98.
8. McCudden CR, Mathews SP, Hainsworth SA, Chapman JF, Hammett-Stabler CA, Willis MS, et al. Performance Comparison of Capillary and Agarose Gel Electrophoresis for the Identification and Characterization of Monoclonal Immunoglobulins. *Am J Clin Pathol*. 1 mars 2008;129(3):451-8.
9. Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. sept 2006;20(9):1467-73.

10. Mailankody S, Korde N, Lesokhin AM, Lendvai N, Hassoun H, Stetler-Stevenson M, et al. Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Nat Rev Clin Oncol*. mai 2015;12(5):286-95.
11. Bai Y, Orfao A, Chim CS. Molecular detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2018;181(1):11-26.
12. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):e328-46.
13. Paiva B, van Dongen JJM, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood*. 14 mai 2015;125(20):3059-68.
14. Cavo M, Terpos E, Nanni C, Moreau P, Lentzsch S, Zweegman S, et al. Role of 18F-FDG PET/CT in the diagnosis and management of multiple myeloma and other plasma cell disorders: a consensus statement by the International Myeloma Working Group. *Lancet Oncol*. 2017;18(4):e206-17.
15. Pugh TJ. Circulating Tumour DNA for Detecting Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma. *Semin Hematol*. 2018;55(1):38-40.
16. Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Pérez-Andrés M, Puig N, Orfao A. Detection of Circulating Tumor Plasma Cells in Monoclonal Gammopathies: Methods, Pathogenic Role, and Clinical Implications. *Cancers*. 8 juin 2020;12(6).
17. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 27 juin 1996;381(6585):751-8.
18. Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 27 janv 2020]. Disponible sur: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=C.+Vettermann%2C+M.S.+Schlüssel%2C+Immunol.+Rev.+237+\(1\)+\(2010\)+22%E2%80%93342](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=C.+Vettermann%2C+M.S.+Schlüssel%2C+Immunol.+Rev.+237+(1)+(2010)+22%E2%80%93342).
19. IMGT, the International ImMunoGeneTics Information System. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 27 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21632786>
20. Marvin LF, Roberts MA, Fay LB. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta*. 2003;11.
21. D'aurizio F, Cantù M. Clinical endocrinology and hormones quantitation: the increasing role of mass spectrometry. *Minerva Endocrinol*. sept 2018;43(3):261-84.
22. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons | Analytical Chemistry [Internet]. [cité 12 févr 2020]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00171a028>

23. The Desorption Process in MALDI | Chemical Reviews [Internet]. [cité 12 févr 2020]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr010375i>
24. Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 100,000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 12 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2349994>
25. Moore LM, Cho S, Thoren KL. MALDI-TOF mass spectrometry distinguishes daratumumab from M-proteins. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* mai 2019;492:91-4.
26. Stephens W. A Pulsed Mass Spectrometer with Time Disaersion. *Phys Rev.* 1946;69:691.
27. Wiley W, McLaren IH. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. *Rev Sci Instrum.* 1955;26(12):1150-7.
28. Moreau P, Attal M, Caillot D, Macro M, Karlin L, Garderet L, et al. Prospective Evaluation of Magnetic Resonance Imaging and [18F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-Computed Tomography at Diagnosis and Before Maintenance Therapy in Symptomatic Patients With Multiple Myeloma Included in the IFM/DFCI 2009 Trial: Results of the IMAJEM Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 sept 2017;35(25):2911-8.
29. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, Leleu X, Caillot D, Escoffre M, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med.* 06 2017;376(14):1311-20.
30. Avet-Loiseau H. Minimal Residual Disease by Next-Generation Sequencing: Pros and Cons. *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Annu Meet.* 2016;35:e425-430.
31. Zajec M, Langerhorst P, VanDuijn MM, Gloerich J, Russcher H, van Gool AJ, et al. Mass Spectrometry for Identification, Monitoring, and Minimal Residual Disease Detection of M-Proteins. *Clin Chem.* 1 mars 2020;66(3):421-33.
32. Barnidge DR, Dasari S, Botz CM, Murray DH, Snyder MR, Katzmann JA, et al. Using mass spectrometry to monitor monoclonal immunoglobulins in patients with a monoclonal gammopathy. *J Proteome Res.* 7 mars 2014;13(3):1419-27.
33. Mills JR, Barnidge DR, Murray DL. Detecting monoclonal immunoglobulins in human serum using mass spectrometry. *Methods San Diego Calif.* 15 juin 2015;81:56-65.
34. Botz CM, Barnidge DR, Murray DL, Katzmann JA. Detecting monoclonal light chains in urine: microLC-ESI-Q-TOF mass spectrometry compared to immunofixation electrophoresis. *Br J Haematol.* nov 2014;167(3):437-8.
35. Mills JR, Barnidge DR, Dispenzieri A, Murray DL. High sensitivity blood-based M-protein detection in sCR patients with multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 25 2017;7(8):e590.

36. Barnidge DR, Dispenzieri A, Merlini G, Katzmann JA, Murray DL. Monitoring free light chains in serum using mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med.* 1 juin 2016;54(6):1073-83.
37. Barnidge DR, Krick TP, Griffin TJ, Murray DL. Using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to detect monoclonal immunoglobulin light chains in serum and urine. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* 15 nov 2015;29(21):2057-60.
38. Kohlhagen MC, Barnidge DR, Mills JR, Stoner J, Gurtner KM, Liptac AM, et al. Screening Method for M-Proteins in Serum Using Nanobody Enrichment Coupled to MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Clin Chem.* 2016;62(10):1345-52.
39. Milani P, Murray DL, Barnidge DR, Kohlhagen MC, Mills JR, Merlini G, et al. The utility of MASS-FIX to detect and monitor monoclonal proteins in the clinic. *Am J Hematol.* août 2017;92(8):772-9.
40. Mills JR, Kohlhagen MC, Dasari S, Vanderboom PM, Kyle RA, Katzmann JA, et al. Comprehensive Assessment of M-Proteins Using Nanobody Enrichment Coupled to MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Clin Chem.* 2016;62(10):1334-44.
41. Barnidge DR, Tschumper RC, Theis JD, Snyder MR, Jelinek DF, Katzmann JA, et al. Monitoring M-proteins in patients with multiple myeloma using heavy-chain variable region clonotypic peptides and LC-MS/MS. *J Proteome Res.* 4 avr 2014;13(4):1905-10.
42. Bergen HR, Dasari S, Dispenzieri A, Mills JR, Ramirez-Alvarado M, Tschumper RC, et al. Clonotypic Light Chain Peptides Identified for Monitoring Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma without Bone Marrow Aspiration. *Clin Chem.* janv 2016;62(1):243-51.
43. Zajec M, Jacobs JFM, de Kat Angelino CM, Dekker LJM, Stingl C, Luider TM, et al. Integrating Serum Protein Electrophoresis with Mass Spectrometry, A New Workflow for M-Protein Detection and Quantification. *J Proteome Res.* 2 juill 2020;19(7):2845-53.
44. Zajec M, Jacobs JFM, Groenen PJTA, de Kat Angelino CM, Stingl C, Luider TM, et al. Development of a Targeted Mass-Spectrometry Serum Assay To Quantify M-Protein in the Presence of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J Proteome Res.* 02 2018;17(3):1326-33.
45. Touzeau C, Moreau P, Dumontet C. Monoclonal antibody therapy in multiple myeloma. *Leukemia.* 2017;31(5):1039-47.
46. McCudden C, Axel AE, Slaets D, Dejoie T, Clemens PL, Frans S, et al. Monitoring multiple myeloma patients treated with daratumumab: teasing out monoclonal antibody interference. *Clin Chem Lab Med.* 1 juin 2016;54(6):1095-104.
47. van de Donk NWCJ, Otten HG, El Haddad O, Axel A, Sasser AK, Croockewit S, et al. Interference of daratumumab in monitoring multiple myeloma patients using serum

immunofixation electrophoresis can be abrogated using the daratumumab IFE reflex assay (DIRA). *Clin Chem Lab Med*. 1 juin 2016;54(6):1105-9.

48. Mills JR, Kohlhagen MC, Willrich MAV, Kourelis T, Dispenzieri A, Murray DL. A universal solution for eliminating false positives in myeloma due to therapeutic monoclonal antibody interference. *Blood*. 09 2018;132(6):670-2.
49. Puig N, Mateos M-V, Contreras T, Paiva B, Cedena M, Pérez J, et al. Qip-Mass Spectrometry in High Risk Smoldering Multiple Myeloma Patients Included in the GEM-CESAR Trial: Comparison with Conventional and Minimal Residual Disease IMWG Response Assessment. *Blood*. 13 nov 2019;134:581-581.
50. Derman B, Stefka A, McIver A, Jiang K, Kubicki T, Jasielec J, et al. Measurable residual disease (MRD) assessed by mass spectrometry (MS) in peripheral blood versus next generation sequencing (NGS) in bone marrow in multiple myeloma treated on phase II trial of KRd+ASCT. *J Clin Oncol*. 20 mai 2020;38:8513-8513.

Vu, le Président du Jury,

(tampon et signature)



Professeur Philippe MOREAU

Vu, le Directeur de Thèse,

(tampon et signature)



Docteur Thomas DEJOIE

Vu, le Doyen de la Faculté,



Professeur Pascale JOLLIET

NOM : GUIDET

PRENOM : Charles

Titre de Thèse : Evaluation de la réponse immunochimique dans le myélome multiple par technologie MALDI-TOF, une étude rétrospective sur les patients de l'étude IMAJEM.

RESUME

Les nouvelles approches thérapeutiques dans la prise en charge du myélome multiple ont permis à un nombre de plus en plus important de patient d'atteindre le stade de réponse complète, avec cependant des durées de rémission très variables, nécessitant de recourir à des méthodes de plus en plus sensibles pour détecter la maladie résiduelle. Dans ce contexte d'évaluation de maladie résiduelle dans le sang, la technologie MALDI-TOF étudiée ici de manière rétrospective sur 564 échantillons de sérum provenant de 133 patients semble être une approche prometteuse dans ce contexte. Elle présente un gain en sensibilité et en spécificité par rapport à l'immunofixation sérique. La négativité du MALDI-TOF est également prédictive d'une meilleure PFS que la négativité de l'immunofixation. Ces premiers résultats devront par la suite être confirmés par une analyse prospective.

MOTS-CLES

Spectrométrie de masse, MALDI-TOF, myélome multiple, réponse immunochimique, IMAJEM, immunoglobuline, chaînes légères, maladie résiduelle sanguine