

Biochimie spécialisée du LCR et étude des chaînes légères libres dans le LCR

Journée régionale CNBH

Nantes, 15 Novembre 2022

Dr Edith Bigot-Corbel



COLLÈGE NATIONAL DE BIOCHIMIE DES HÔPITAUX

Organisme de formation continue n°82 07 00551 07

www.cnbh.fr

Journée Régionale Région Ouest 2022 – 15/11/2022

**DECLARATION D'INTERET
DANS LE CADRE DE MISSIONS DE FORMATION
RÉALISÉES POUR LE CNBH**

Dr Edith Bigot-Corbel

Exerçant au Laboratoire de Biochimie HGRL du CHU de Nantes
déclare sur l'honneur

ne pas avoir d'intérêt, direct ou indirect (financier), avec les entreprises pharmaceutiques, du diagnostic ou d'édition de logiciels susceptible de modifier mon jugement ou mes propos, **concernant le sujet et les DMDIV présentés.**

Historique

- **XVII^{ème} siècle avt JC**: « Existence d'un liquide situé à l'intérieur de la tête »
- Confirmation par Hippocrate (400 avt JC) et Galien (200 ap JC)
- Léonard de Vinci à la **fin du XV^{ème} siècle** dessine le système ventriculaire
- Description en **1827 par Magendie** de la **production, la circulation et la résorption du LCS**
- **1891: Heinrich Quincke première Ponction Lombaire** = rachicentèse
- 1942: premières analyses électrophorétiques du LCS
- 1965 : première isofocalisation

Production et résorption

Formation

Plexus choroïde 2/3

Vitesse

0.52 mL/min

Renouvelé en 6 heures (3-4 fois/j)

Volume:

110-170 mL chez l'adulte

Le LCS occupe 2 espaces du SN

Compartiment central : ventricules cérébraux

Compartiment périphérique: espaces sous arachnoïdiens cérébraux et spinaux

Circulation

Libre entre les différents espaces

Liée aux systoles circulatoires, cardiaques
variations respiratoires, posture, rythme de
résorption

Résorption périphérique

Équilibre la formation

Espaces lepto-méningés

Analyses biochimiques

- Aspect macroscopique
- Dosages courants
- Analyse protéinologique
 - Quantitative
 - Qualitative
- Biomarqueurs Alzheimer
- Recherche de pigments

Analyse protéinologique du LCS

Contexte



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANTES
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE GENERALE
HOPITAL G. & R. LAENNEC - Tél. : (02401) 65 459 - 64 560

Préciser Nom Etablissement ou Laboratoire si extérieur au CHU :

Unité de Soins	IDENTITE Patient	Laboratoire
----------------	------------------	-------------

Nom et Prénom du Prescripteur :

Tél : (à 10 chiffres) :

Nom et Prénom du Préleveur :

Prélevé le : à h

ELECTROPHORESE et ISOELECTROFOCALISATION des IgG du LIQUIDE CEREBRO-SPINAL (L.C.S.) (LCSPROT)

RECHERCHE DE SYNTHESE INTRATHECALE D'IMMUNOGLOBULINES

LCS : 3 à 5 mL (Adultes) (ou 200 µL pour les Nouveaux-nés)
Tube L.C.S. en polypropylène (Sarstedt 5 mL ref 62.558.220)

+ Sang : 1 tube sec (Adultes) (ou 2 microtainers pour les Nouveaux-nés)

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES :

- SUSPICION DE S.E.P.
- POLYRADICULONEVRITE
- AUTRE NEUROPATHIE PERIPHERIQUE
- MENINGITE
- MENINGO-ENCEPHALITE : Virale Bactérienne
- SYPHILIS
- AUTRE AFFECTION INFLAMMATOIRE DU SN
- AFFECTION DEGENERATIVE DU SN
- AFFECTION VASCULAIRE DU SN
- MALADIE GENERALE
- DYSGLOBULINEMIE :
 - CHAINES LEGERES K IgM K L
 - CHAINES LEGERES L IgG K L
 - CHAINES LEGERES L IgA K L
- HEMOPATHIE
- MALADIE MALIGNE
- DIVERS

Méthodologie

Analyses quantitatives

Dosage des protéines totales

Dosages des protéines spécifiques:

Albumine, IgG, IgA, IgM, (Immuno-néphélémétrie/turbidimétrie)

Quotient albumine,

Quotient IgG

Index IgG

Analyses qualitatives

Electrophorèse

IEF

Analyse protéinologique du LCS

Contexte



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANTES
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE GENERALE
HOPITAL G. & R. LAENNEC - Tél. : (02401) 65 459 - 64 560

Préciser Nom Etablissement ou Laboratoire si extérieur au CHU :

Unité de Soins	IDENTITE Patient	Laboratoire
----------------	------------------	-------------

Nom et Prénom du Prescripteur :

Tél : (à 10 chiffres) :

Nom et Prénom du Préleveur :

Prélevé le : à h

**ELECTROPHORESE et ISOELECTROFOCALISATION
des IgG du LIQUIDE CEREBRO-SPINAL (L.C.S.) (LCSPROT)
RECHERCHE DE SYNTHESE INTRATHECALE D'IMMUNOGLOBULINES**

LCS : 3 à 5 mL (Adultes) (ou 200 µL pour les Nouveaux-nés)
Tube L.C.S. en polypropylène (Sarstedt 5 mL ref 62.558.220)

+ Sang : 1 tube sec (Adultes) (ou 2 microtainers pour les Nouveaux-nés)

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES :

- SUSPICION DE S.E.P.
- POLYRADICULONEVRITE
- AUTRE NEUROPATHIE PERIPHERIQUE
- MENINGITE
- MENINGO-ENCEPHALITE : Virale Bactérienne
- SYPHILIS
- AUTRE AFFECTION INFLAMMATOIRE DU SN
- AFFECTION DEGENERATIVE DU SN
- AFFECTION VASCULAIRE DU SN
- MALADIE GENERALE
- DYSGLOBULINEMIE :
 - CHAINES LEGERES K IgM K L
 - CHAINES LEGERES L IgG K L
 - CHAINES LEGERES L IgA K L
- HEMOPATHIE
- MALADIE MALIGNNE
- DIVERS

Méthodologie

Analyses quantitatives

Dosage des protéines totales

Dosages des protéines spécifiques

Albumine, IgG, IgA, IgM, **CLL Kappa** (Immuno-néphélométrie/turbidimétrie)

Quotient albumine,

Quotient IgG

Index IgG

Quotient Kappa

Index Kappa

Kappa IF

Analyses qualitatives

Electrophorèse

IEF

Dosages courants

Protéines

Méthode turbidimétrique

Faible concentration: **VN: 0,28-0,52g/L**

BHE intacte = concentration 200 fois plus faible que plasma

Augmentations :

Passage actif : des protéines plasmatiques au niveau des plexus choroïdes (**origine sérique**)

Synthèse :

- par le tissu nerveux (**locale**)

- **Lymphoplasmocytaire = immunitaire:** synthèse d'Ig issues de cellules immunocompétentes présentes en phase aiguë ou chronique d'une pathologie

Pour différencier une réaction locale d'une réaction systémique

→ il faut comparer sérum et LCS

Dosages des protéines spécifiques

Immuno-turbidimétrie ou immuno-néphélémétrie

Dosages LCR et sérum

Sur le même appareil et avec la même courbe de calibration

Albumine

La protéine quantitativement la plus importante du LCS 60%

Origine plasmatique (diffusion)

Excellent marqueur de l'état de la BHE

Quotient albumine = Albumine LCR/ Albumine sérum

Quotient albumine < 0,009

Marqueur de l'atteinte de la barrière hémato-encéphalique

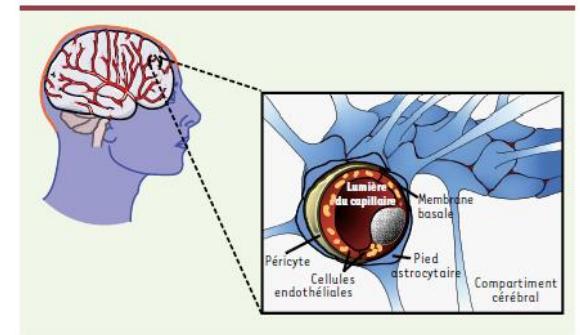


Figure 1. Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique (BHE) localisée au niveau des capillaires cérébraux. Cette barrière est constituée de cellules endothéliales cérébrales (CEC) aux propriétés particulières, de péricytes et de pieds astrocytaires.

m/s n° 11, vol. 27, novembre 2011

Altération BHE → Transsudation = **albuminorachie ↗ et QAlb ↗**

Atteinte faible QAlb < 0,02

Atteinte modérée 0,02 < QAlb < 0,05

Atteinte sévère QAlb > 0,05

Dosages des protéines spécifiques

Immunoglobulines

Support immunité humorale

Seules les Ig **GAM** sont dosées en routine dans le LCS

IgG \approx 40 mg/L \rightarrow 300 fois moins que sérum

QIgG = IgG LCR/IgG sérum - Normale $< 0,0035$

IgA \approx 2 mg/L \rightarrow 1000 fois moins que sérum

QIgA: IgA LCR/IgA sérum

IgM $< 0,5$ mg/L \rightarrow 2000 fois moins que sérum

QIgM: IgM LCR/IgM sérum

Pathologies neurologiques inflammatoires, lymphos B pénètrent dans le LCR

Marqueur d'activité lymphocytaire B \rightarrow Synthèse d'Ig au niveau des ventricules =
synthèse locale/intrathécale)

QIg = marqueur d'une synthèse intrathécale

Mais....

10

Dosages des protéines spécifiques

Si IgG d'origine sérique:

La concentration dans le LCR dépend du QAlb

La variabilité des concentrations dépend de la taille des molécules mais elle est constante

Dosages des protéines spécifiques

Si IgG d'origine sérique:

La concentration dans le LCR dépend du QAlb

La variabilité des concentrations dépend de la taille des molécules mais elle est constante

Si IgG originaires du cerveau

La concentration dans le LCR est indépendante du QAlb

$$\text{Index IgG} = \text{QIgG}/\text{Qalb}$$

> 0,7 synthèse locale intrathécale

Dosages des protéines spécifiques

Si IgG d'origine sérique:

La concentration dans le LCR dépend du Q_{Alb}

La variabilité des concentrations dépend de la taille des molécules mais elle est constante

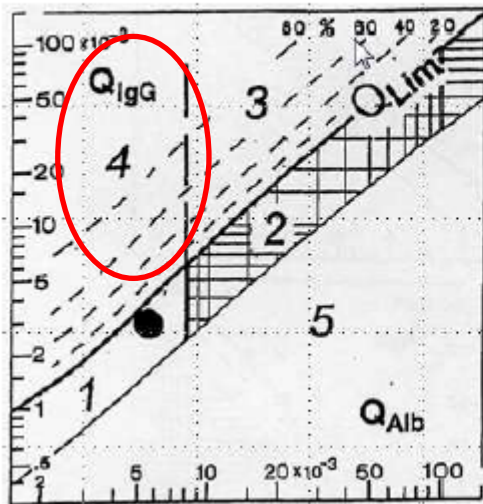
Si IgG originaires du cerveau

La concentration dans le LCR est indépendante du Q_{Alb}

$$\text{Index IgG} = Q_{IgG}/Q_{Alb}$$

> 0,7 synthèse locale intrathécale

Schéma de Reiber :



1 domaine normal

2 atteinte barrière hémato-méningée

3 atteinte barrière hémato-méningée +
synthèse IgG intrathécale

4 synthèse IgG intrathécale

5 erreur dosage

IgG IF

= Fraction intrathécale

des IgG

= % des IgG présentes

dans le LCS d'origine

locale

Dosages des protéines spécifiques

- Limites:

↗ IgG, QIgG et Index IgG sont Fréquentes

Processus infectieux

Processus inflammatoires divers

Ne permet pas de poser un diagnostic précis

De plus concentration en IgG normale et synthèse locale possible

→ **Analyse qualitative** = Profil immunitaire LCR

Analyse qualitative des Ig

– Electrophorèse HR

- Sur LCS concentrés
 - Hélène
 - Hydragel 15HR Sébia

Analyse qualitative des Ig

– Electrophorèse HR

- Sur LCS concentrés
 - Hélène
 - Hydragel 15HR Sébia

– Isoélectrofocalisatio (IEF) + immuno-révélation

- Sur LCS non concentrés
 - Technique manuelle (Volume variable, 40 ng IgG déposés sérum et LCS)
 - Hydragel CSF focusing Sébia (volume fixe, 10 μ L, 200 ng IgG déposés sérum et LCS)

Electrophorèse HR Héléna®

Sérum (1/3) + LCS concentré (X50-100)

Kit Helena SAS

pH = 8.6 (tampon tris barbital)

Gel d'agarose

Refroidissement (cooling)

Migration: 250 Volts, 23 min

Coloration: **bleu de Coomassie (sensible)**

Séchage

Interprétation

Electrophorèse HR Héléna®

Sérum (1/3) + LCS concentré (X50-100)

Kit Helena SAS

pH = 8.6 (tampon tris barbital)

Gel d'agarose

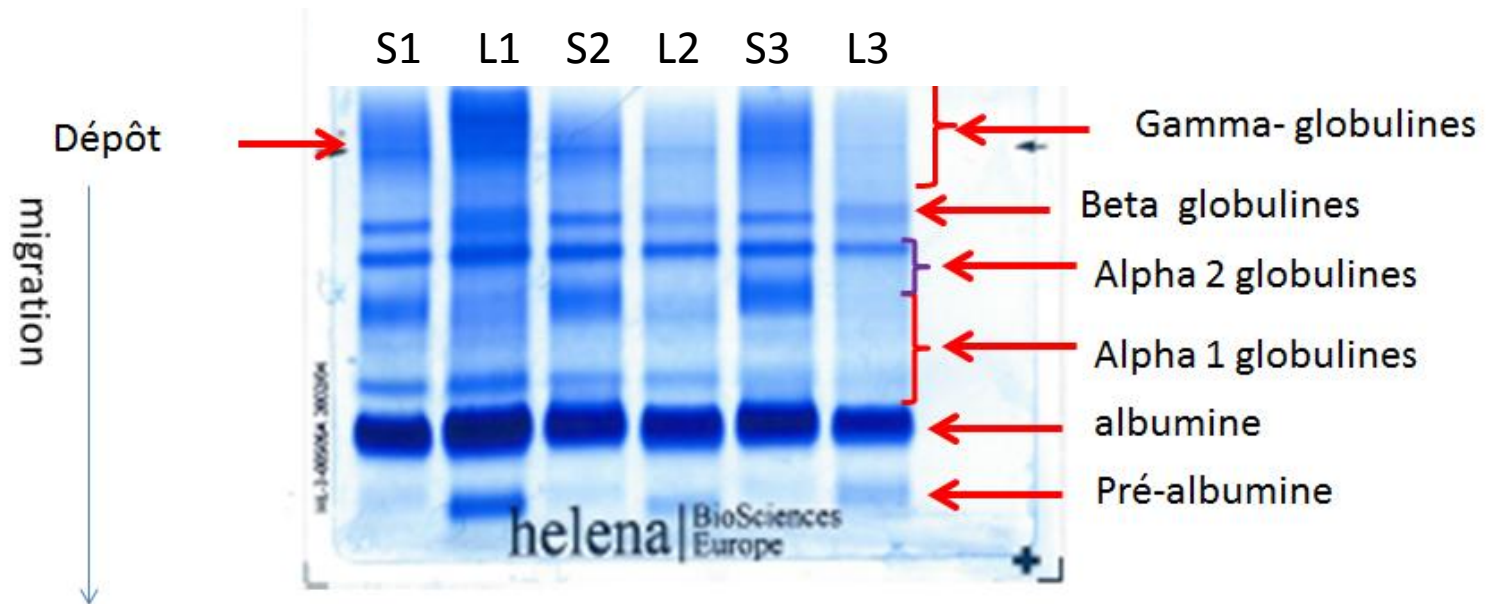
Refroidissement (cooling)

Migration: 250 Volts, 23 min

Coloration: **bleu de Coomassie (sensible)**

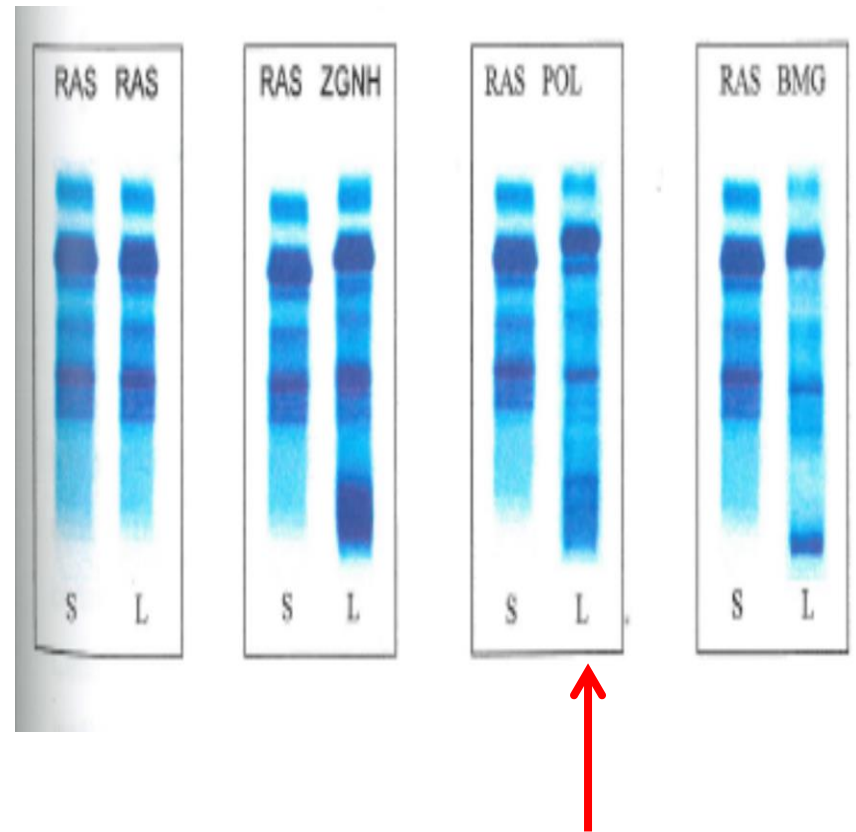
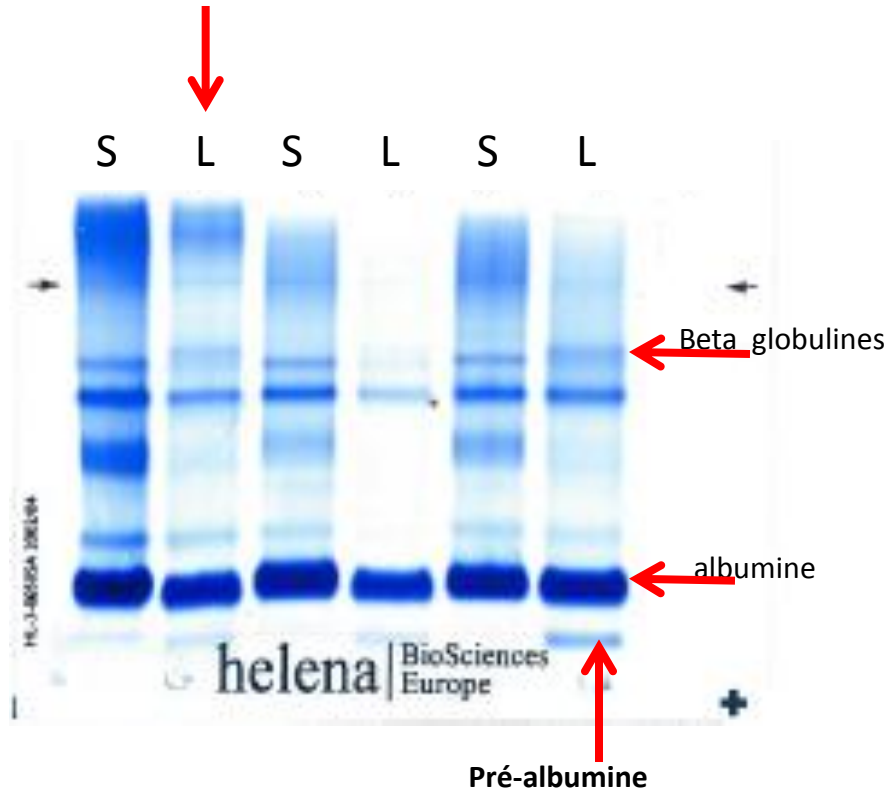
Séchage

Interprétation



Interprétation de l'Electrophorèse HR

Profil oligoclonal du LCS



Profil oligoclonal du LCS

Hydragel 15 HR Sébia®

Sérum (1/3) + LCS concentré (X50-100)

Kit Hydragel 15HR

pH = 8,6 (tampon tris barbital)

Gel d'agarose

Refroidissement (cooling)

Migration: 250 Volts, 23 min

Coloration: Violet Acide

Séchage

Interprétation

Hydrigel 15 HR Sébia®

Sérum (1/3) + LCS concentré (X50-100)

Kit Hydrigel 15HR

pH = 8,6 (tampon tris barbital)

Gel d'agarose

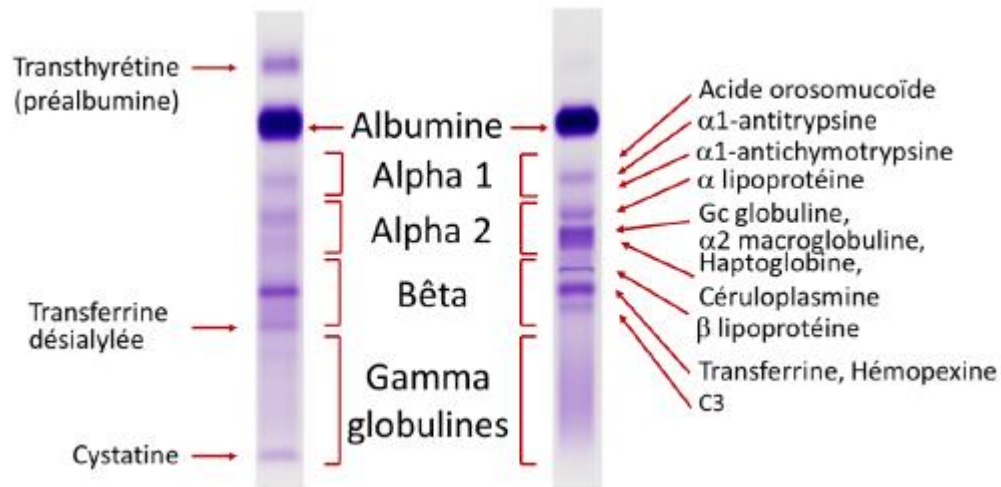
Refroidissement (cooling)

Migration: 250 Volts, 23 min

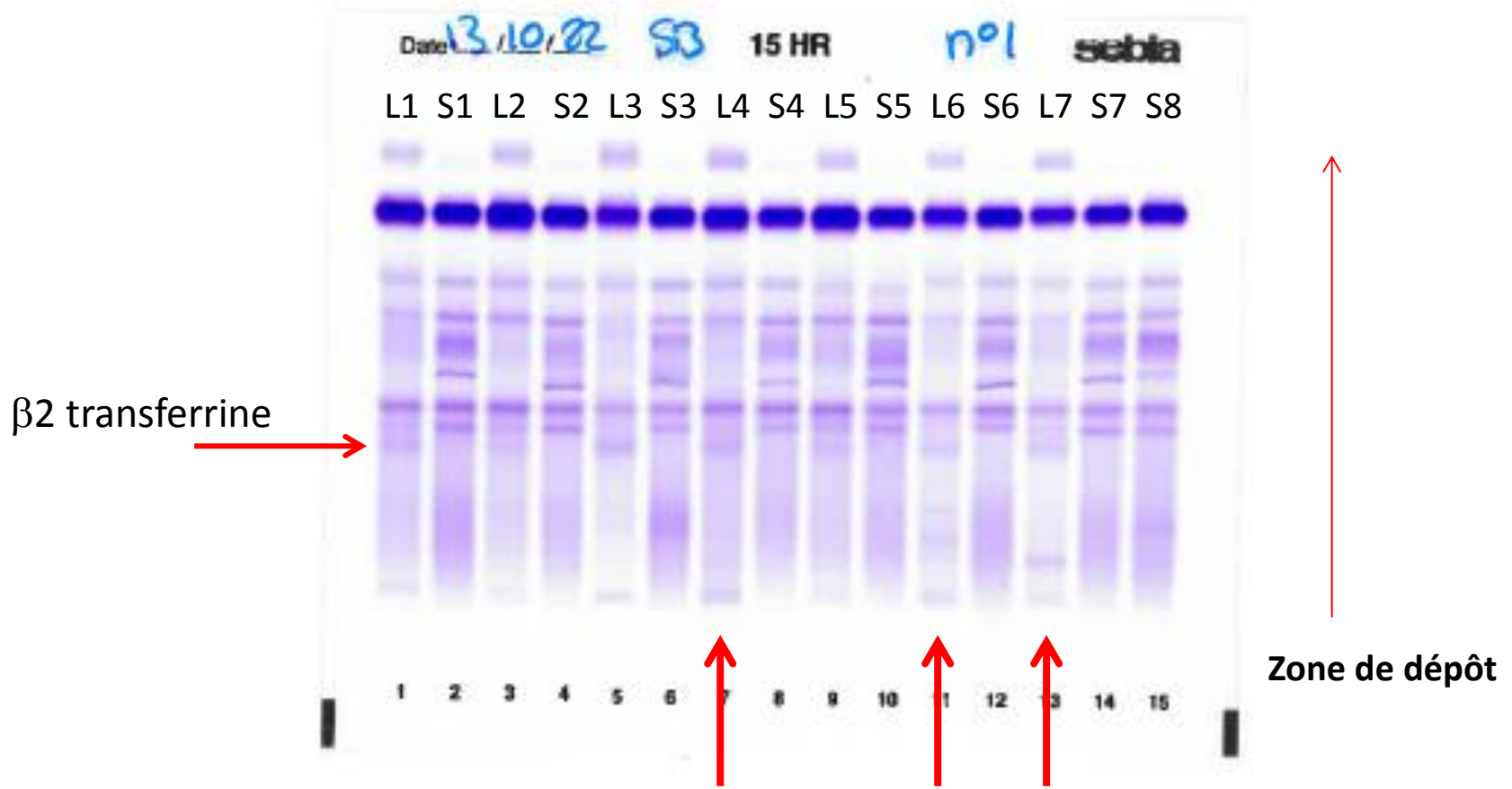
Coloration: Violet Acide

Séchage

Interprétation



Hydragel 15 HR Sébia®



Profil oligoclonal du LCS

Electrophorèse HR

- Vue d'ensemble des protéines
- Permet de repérer des profils oligoclonaux ou des anomalies de répartition des Ig
- Mais, Insuffisant car manque de sensibilité

Recherche de Bande Oligoclonales (BOC) d'IgG par Isoélectrofocalisation (IEF)

Sérum dilués + LCS non concentrés

Quantité d'IgG déposées identiques pour le sérum et le LCS

Dépôt 10 μ L de LCS pur ou dilué pour déposer 200ng d'IgG

Dépôt de 10 μ L de sérum dilué pour déposer la même quantité d'IgG que dans le LCS

Kit Hydragel CSF Focusing Sébia®

Gel d'agarose

Gradient de pH 3-9

Préfocalisation

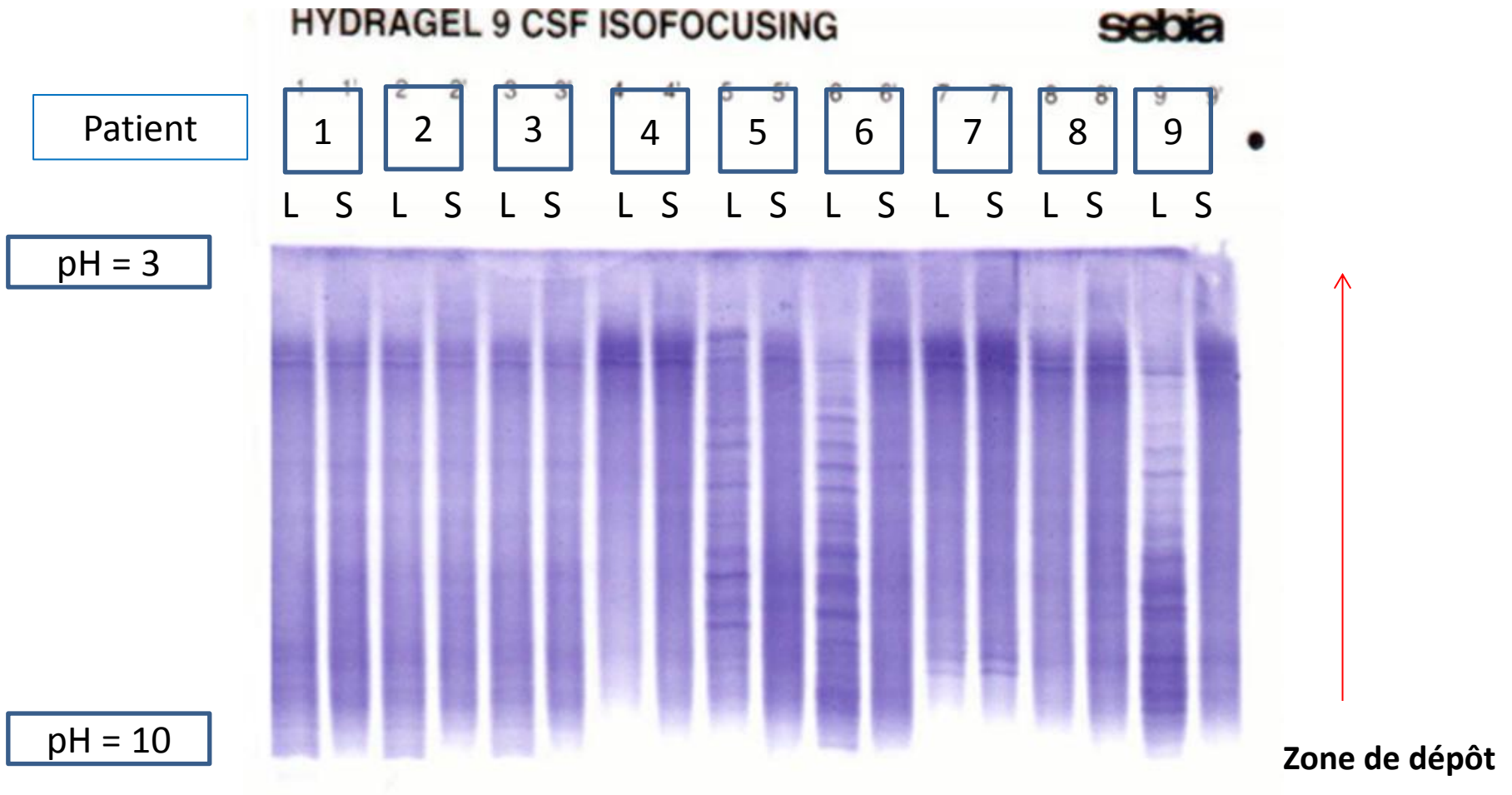
Dépôt des échantillons

Focalisation Haut voltage → Refroidissement

Immunoprécipitation avec anticorps anti-IgG marqué

Coloration des complexes IgG-Anticorps

Recherche de Bande Oligoclonales (BOC) d'IgG par Isoélectrofocalisation (IEF)



Recherche de Bande Oligoclonales (BOC) d'IgG par Isoélectrofocalisation (IEF)

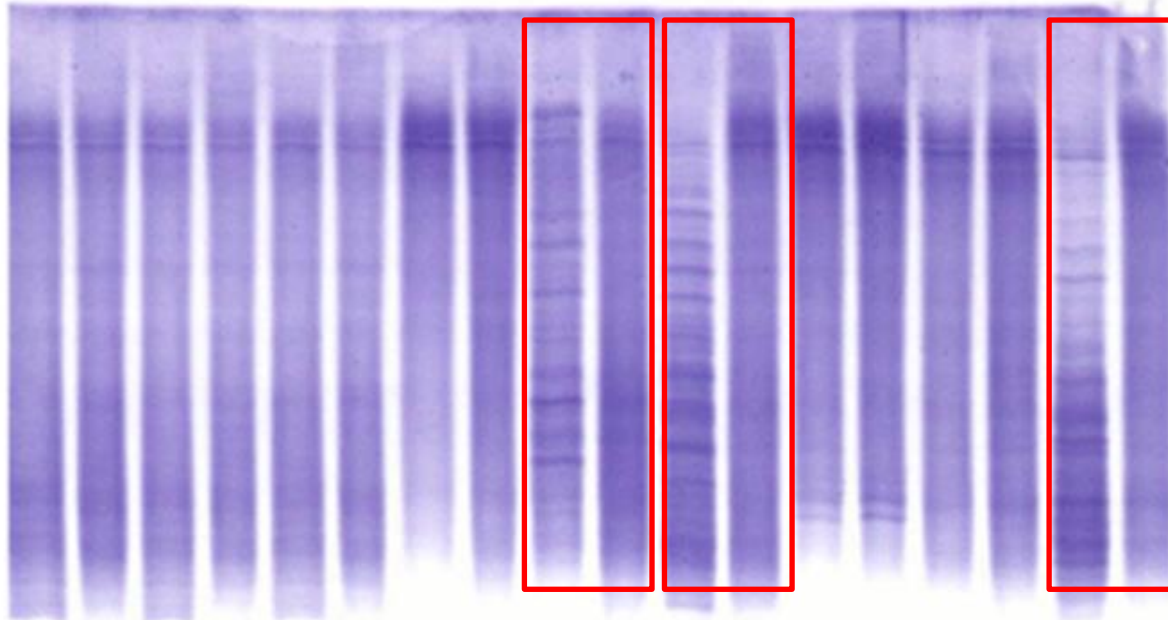
HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING

sebia

1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 8 9 9
P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9
L S L S L S L S L S L S L S L S L S

pH = 3

pH = 10



Zone de dépôt

Recherche de bandes oligoclonales surnuméraires dans le LCS

→ Synthèse locale intrathécale d'IgG

Recherche de Bande Oligoclonales (BOC) d'IgG par Isoélectrofocalisation (IEF)

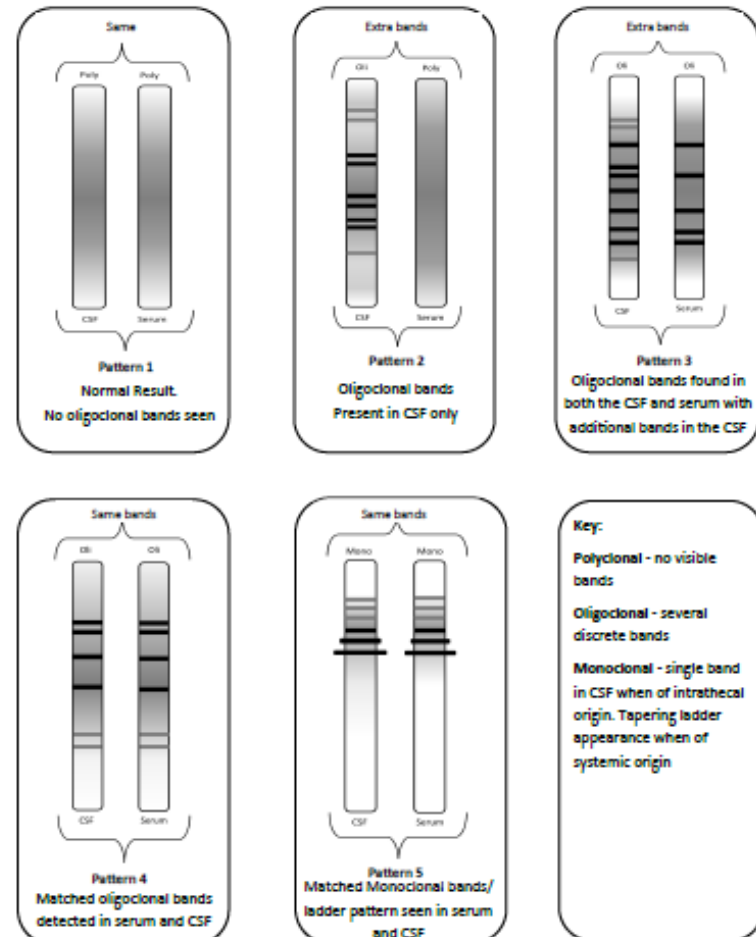
Diagrams showing schematic representations of CSF and serum

isoelectric focusing patterns

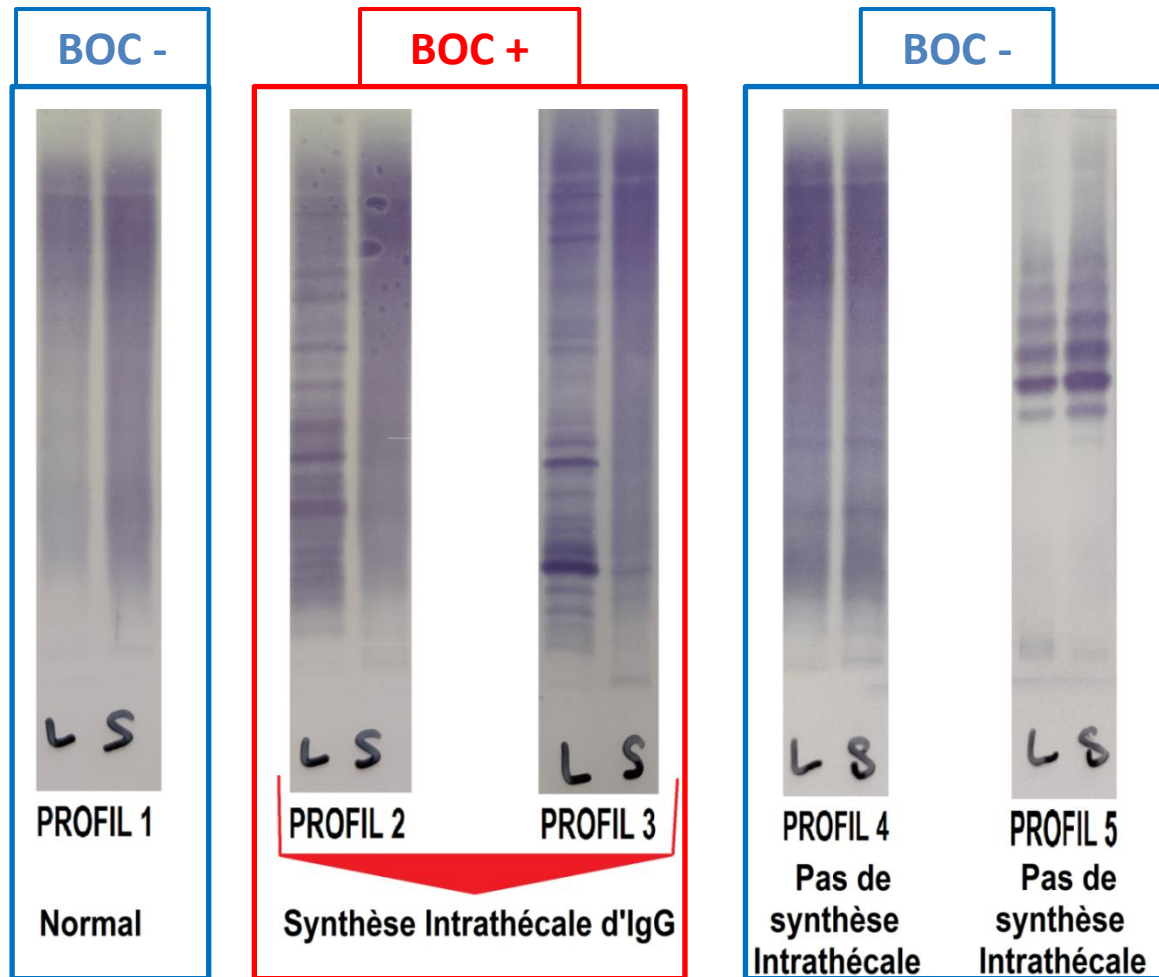
Extra Bands in the CSF compared to serum is indicative of intrathecal IgG synthesis

Recherche de bandes oligoclonales
surnuméraires dans le LCS

Consensus international = 5 types de
profil



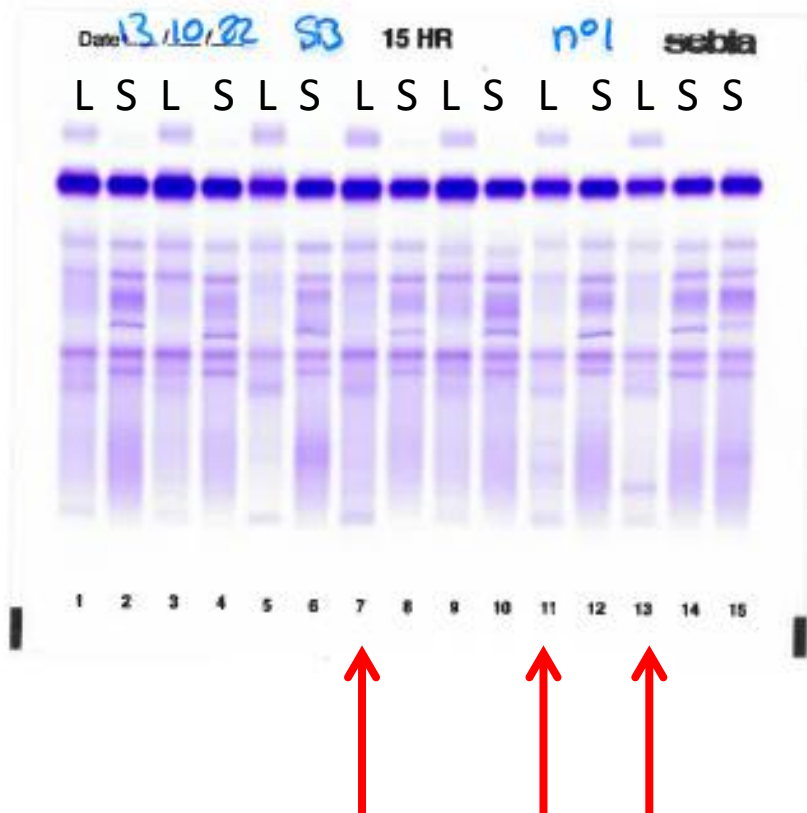
Recherche de Bande Oligoclonales (BOC) par Isoélectrofocalisation (IEF)



Recherche de bandes oligoclonales surnuméraires dans le LCS

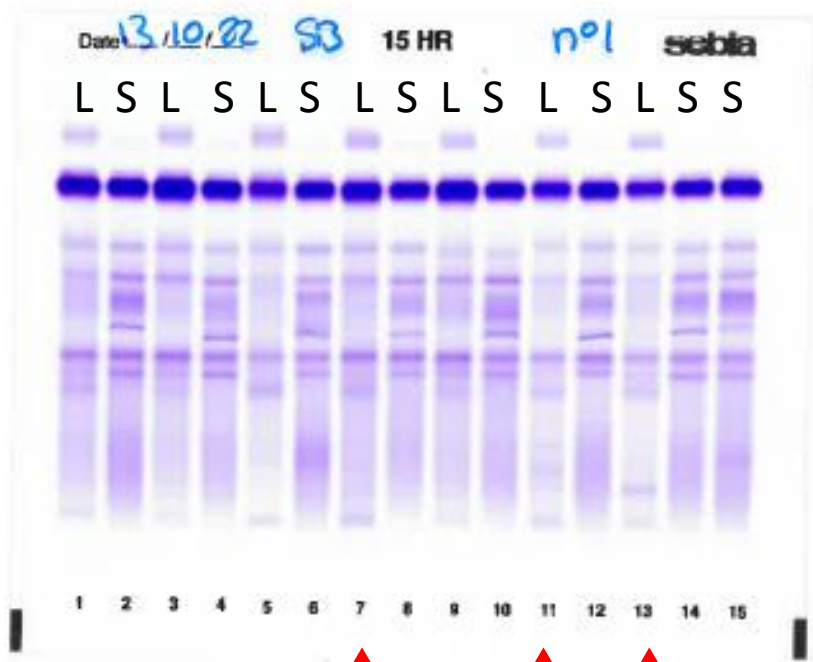
Consensus international = 5 types de profil

Quelques exemples

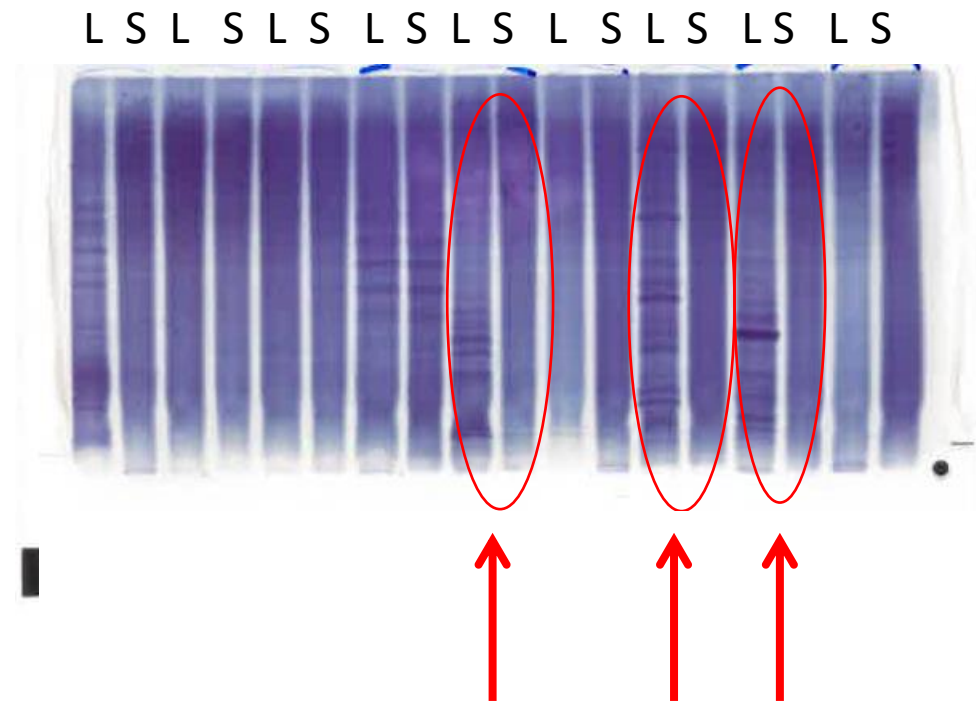


Profil oligoclonal du LCS

Quelques exemples

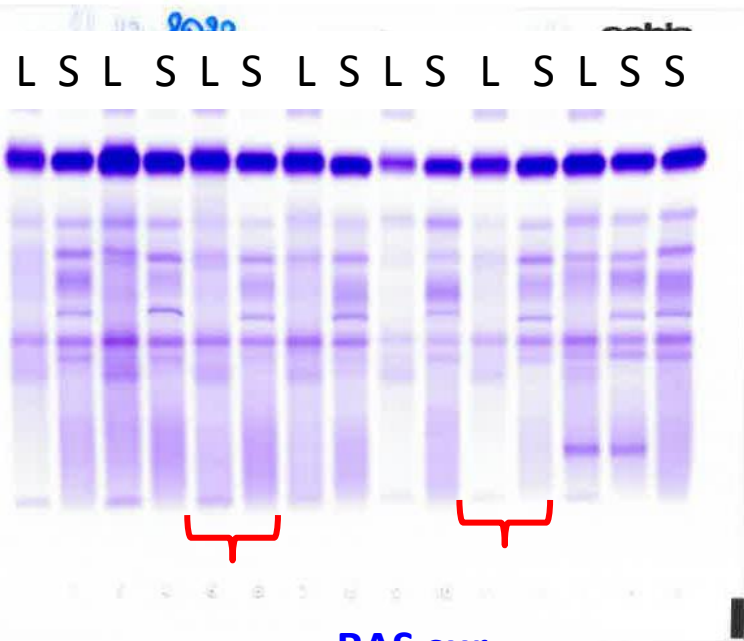


↑ ↑ ↑
Profil oligoclonal du LCS



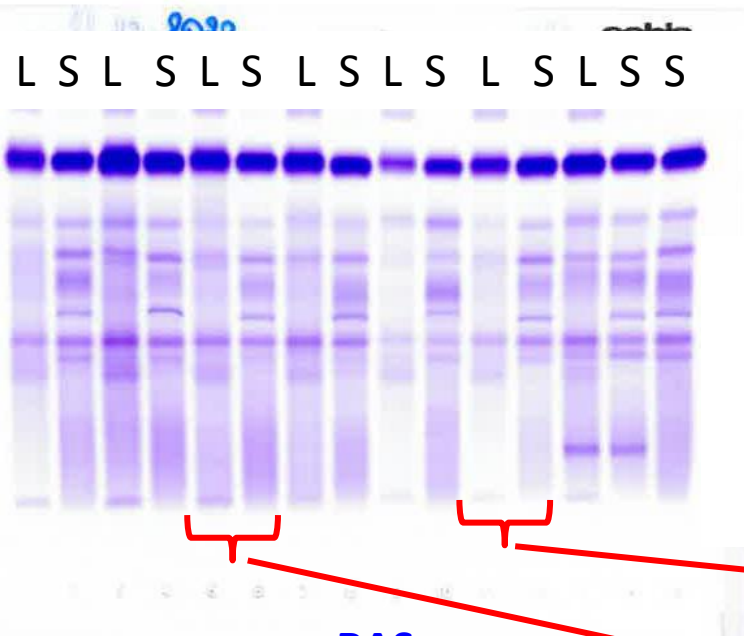
BOC+
Profils 2/3

Quelques exemples



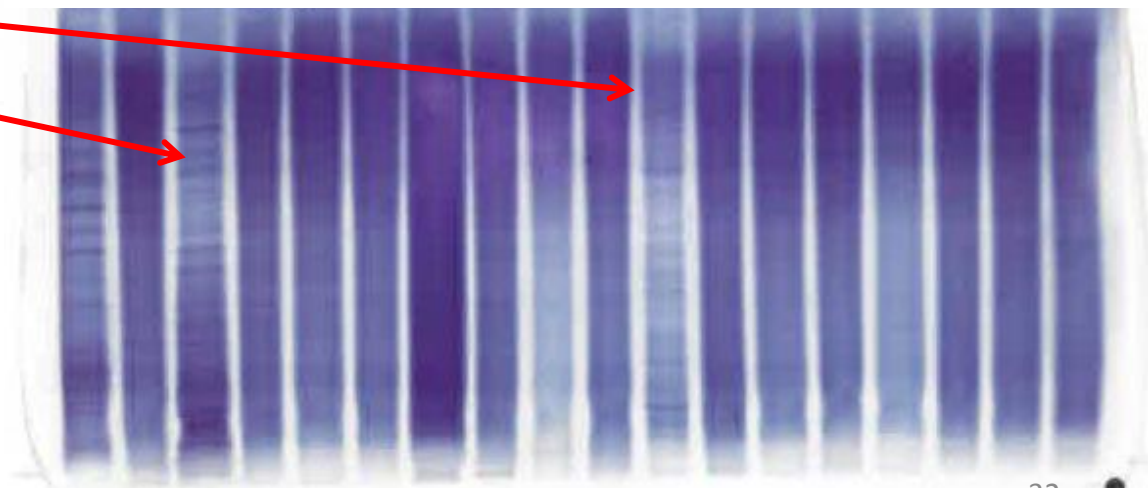
**RAS sur
electrophorèse
HR**

Quelques exemples

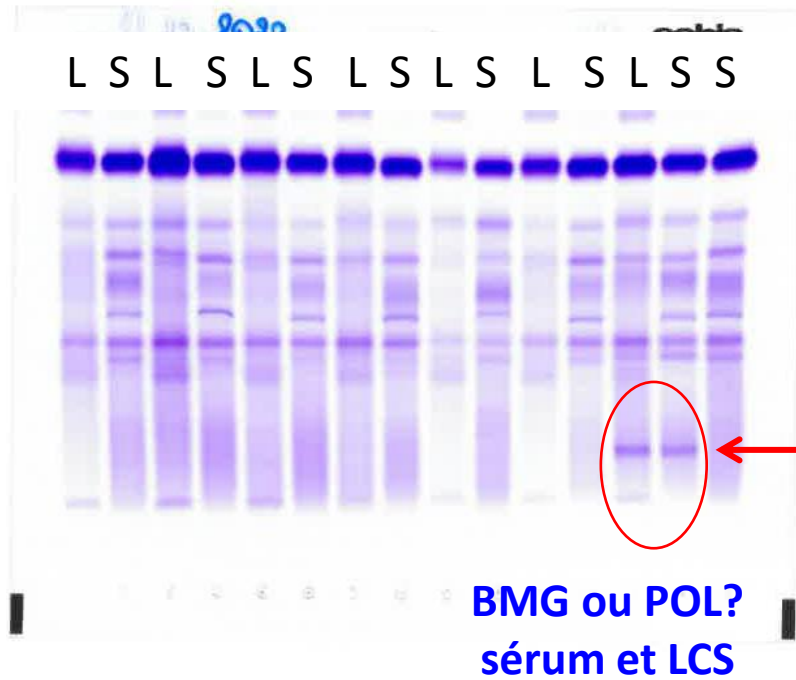


**RAS sur
electrophorèse
HR**

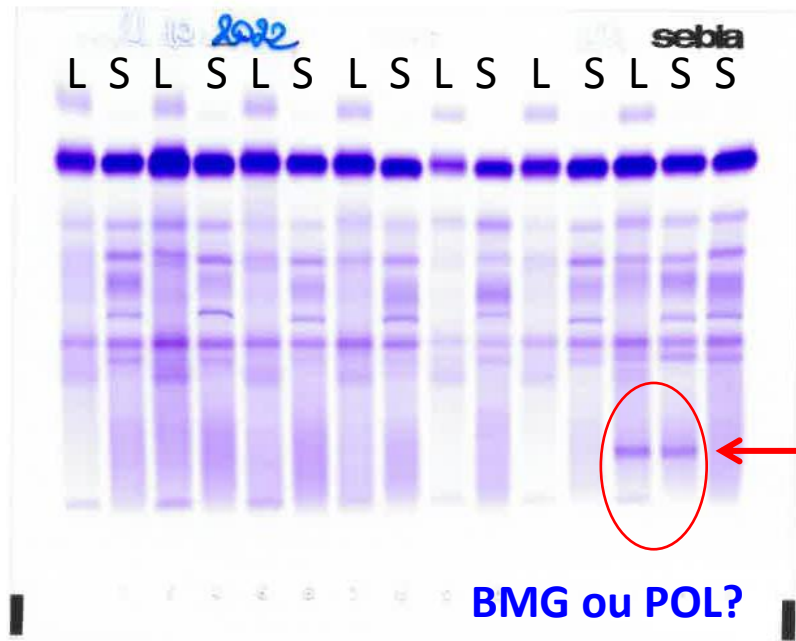
L1 S1 L2 S2 L3 S3 L4 S4 L5 S5 L6 S6 L7 S7 L8 S8 L9 S9



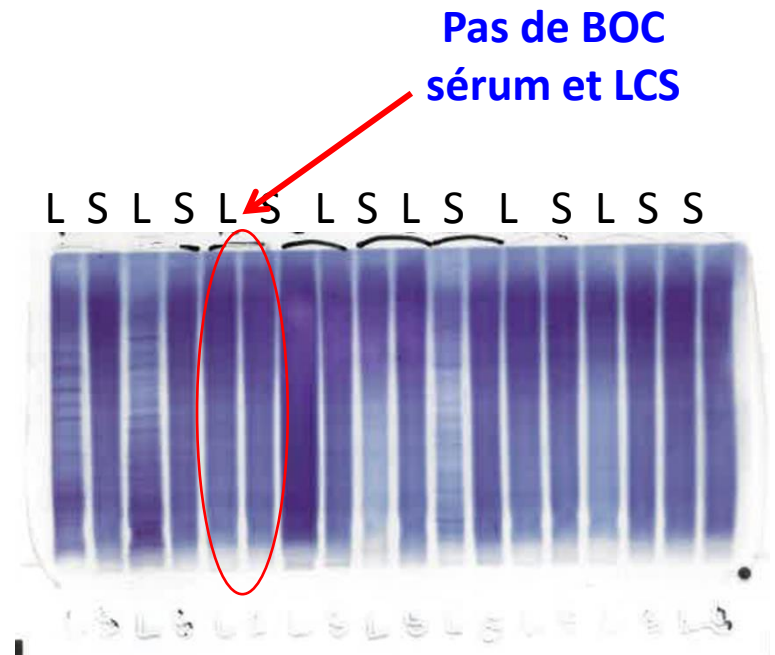
Quelques exemples



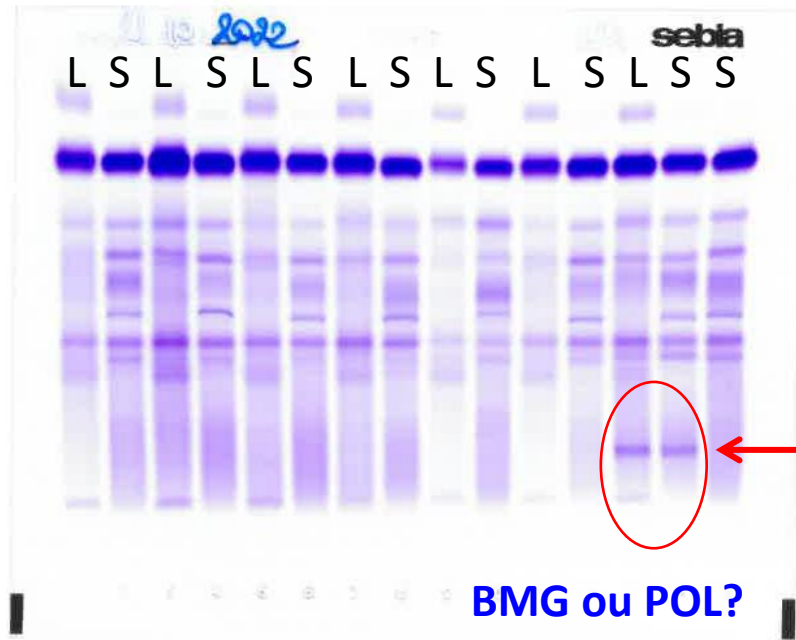
Quelques exemples



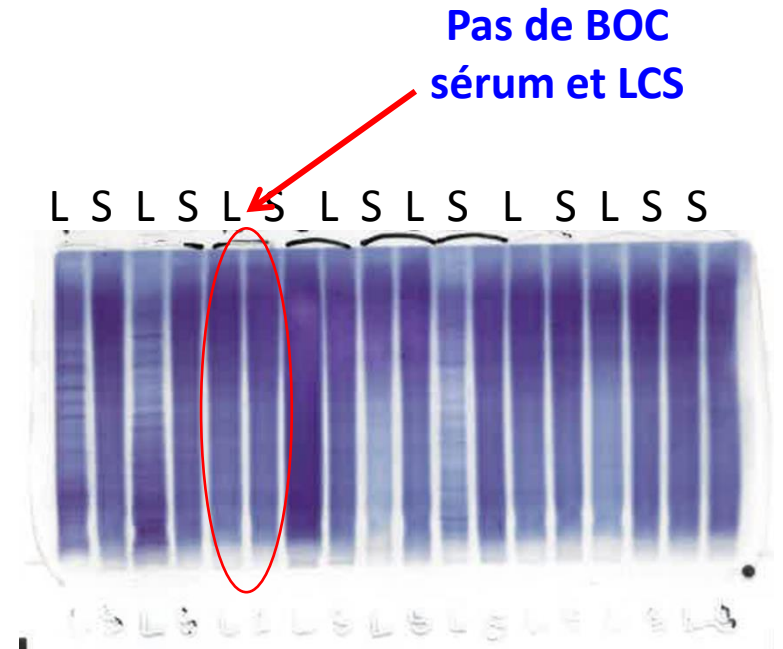
**BMG ou POL?
sérum et LCS**



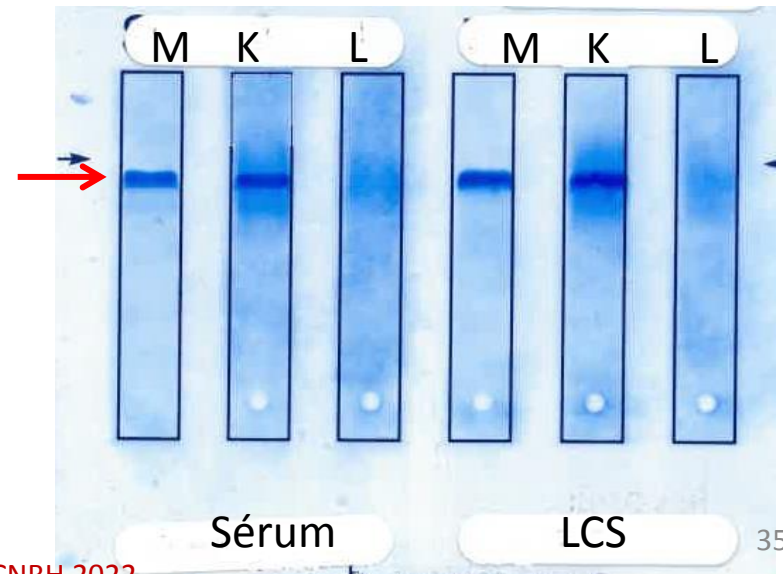
Quelques exemples



**BMG ou POL?
sérum et LCS**

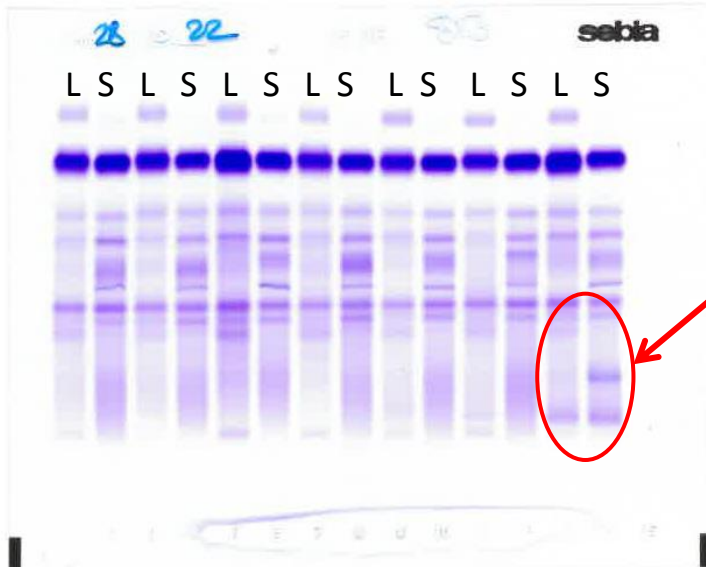


**Pas de BOC
sérum et LCS**



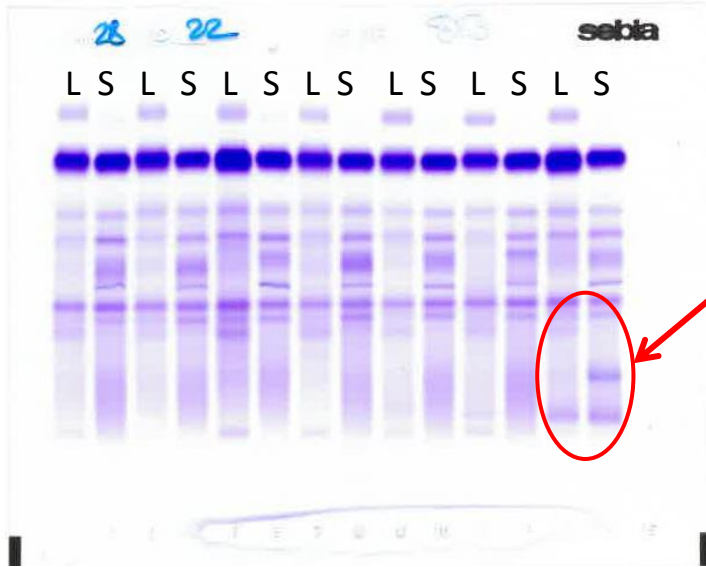
**IgM Kappa
monoclonale sérum
+ LCS**

Quelques exemples



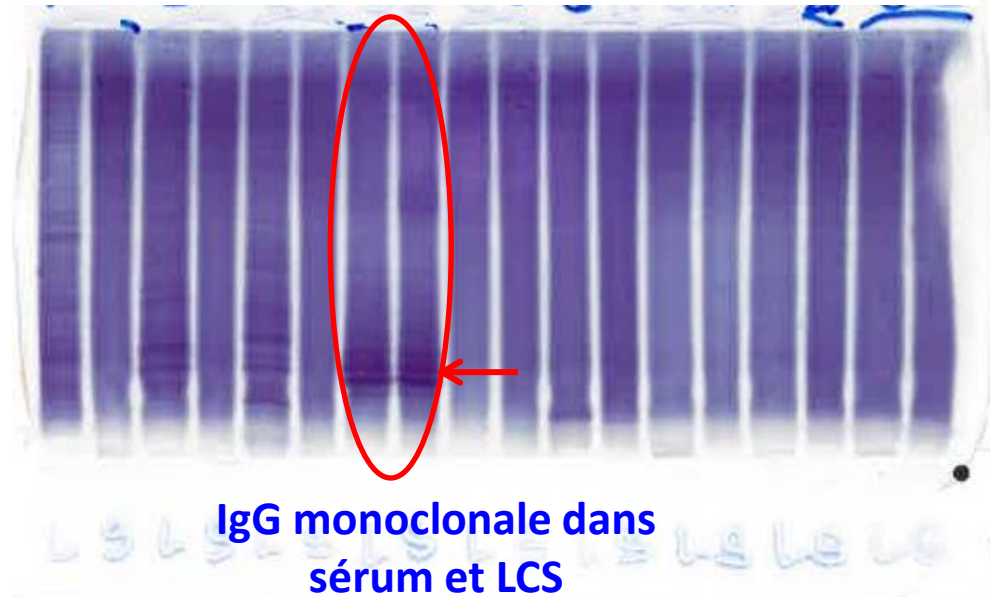
POL?
Ig monoclonale?
≠ sérum/LCS

Quelques exemples



POL?
Ig monoclonale?
≠ sérum/LCS

L1 S1 L2 S2 L3 S3 L4 S4 L5 S5 L6 S6 L7 S7 L8 S8 L9 S9



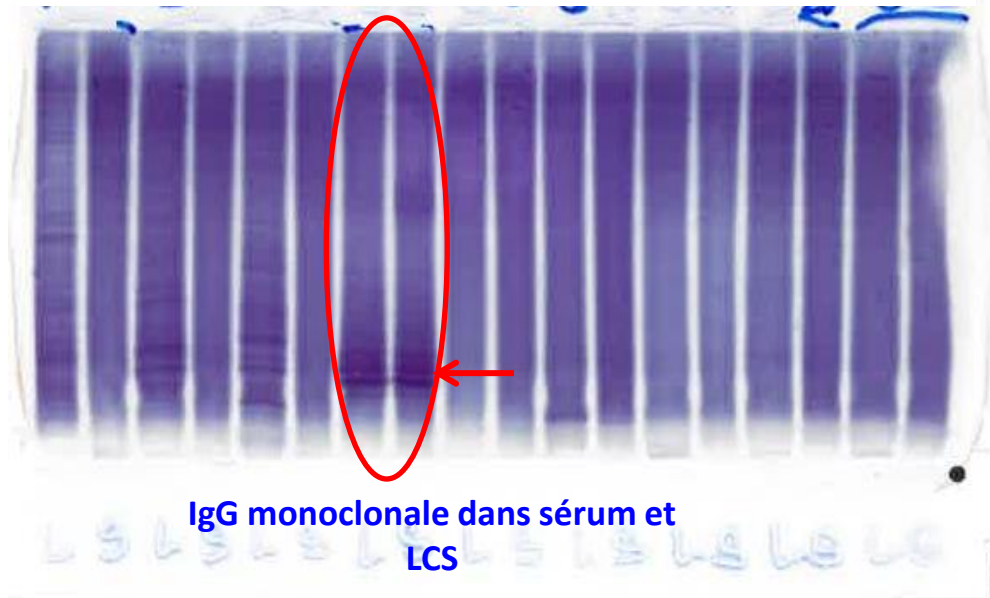
IgG monoclonale dans
sérum et LCS

Quelques exemples

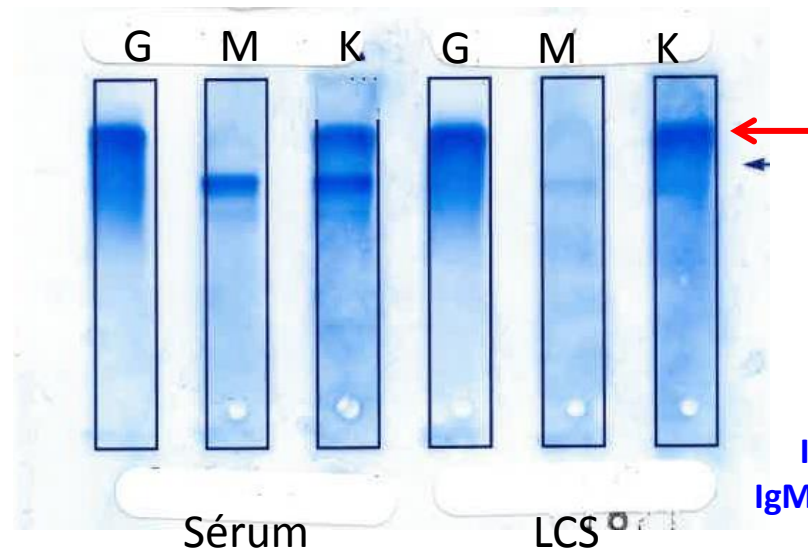


POL?
Ig monoclonale?
≠ sérum/LCS

L1 S1 L2 S2 L3 S3 L4 S4 L5 S5 L6 S6 L7 S7 L8 S8 L9 S9



IgG monoclonale dans sérum et LCS



IgG Kappa monoclonale sérum et LCS
IgM kappa monoclonale sérum (traces LCS)

Recherche BOC dans le diagnostic SEP

- Critères de Mac Donald (révision en 2017)
- **DIS = dissémination dans l'espace / DIT = dissémination dans le temps**

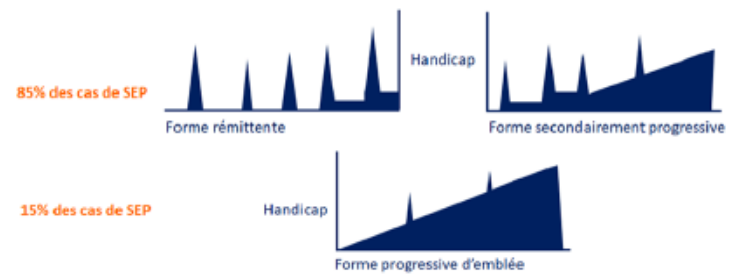
Présentation clinique	Données supplémentaires nécessaire au diagnostic de SEP
≥ 2 poussées cliniques Preuve clinique de ≥ 2 lésions	Aucune
≥ 2 poussées cliniques Preuve clinique d'une lésion	DIS démontrée par une nouvelle poussée clinique impliquant un autre territoire du SNC ou par IRM
1 poussée clinique Preuve clinique de ≥ 2 lésions	DIT démontrée par une nouvelle poussée clinique ou par IRM OU Bandes Oligoclonales (BOC) spécifiques dans le Liquide Cerebro-Spinal (LCS)
1 poussée clinique Preuve clinique d'une lésion	DIS démontrée par une nouvelle poussée clinique impliquant un autre territoire du SNC ou par IRM DIT démontrée par une nouvelle poussée clinique ou par IRM OU Bandes Oligoclonales (BOC) spécifiques dans le Liquide Cerebro-Spinal (LCS)

PL réalisée souvent lors de la 1^{ère} poussée!

Recherche de Bande Oligoclonales (BOC) par Isoélectrofocalisation (IEF)

Avantages

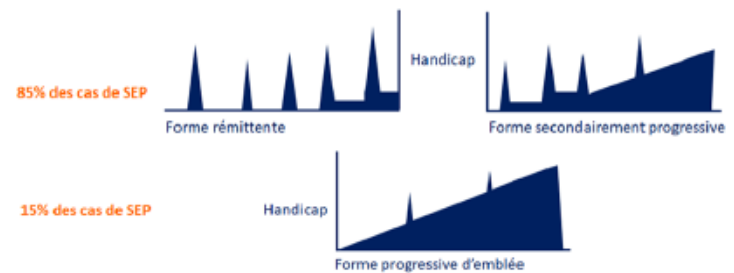
- **Sensibilité 94,1%**
 - Profil SEP stable dans le temps
 - Utile au diagnostic
 - Pas d'information pronostic
 - Pas d'information sur la réponse au traitement



Recherche de Bande Oligoclonales (BOC) par Isoélectrofocalisation (IEF)

Avantages

- **Sensibilité 94,1%**
 - Profil SEP stable dans le temps
 - Utile au diagnostic
 - Pas d'information pronostic
 - Pas d'information sur la réponse au traitement
- **Spécificité 69,6%**
 - Présence de BOC dans autres contextes inflammatoires, infectieux, tumoraux...



Recherche de Bande Oligoclonales (BOC) par Isoélectrofocalisation (IEF)

Avantages

- **Sensibilité 94,1%**
 - Profil SEP stable dans le temps
 - Utile au diagnostic
 - Pas d'information pronostic
 - Pas d'information sur la réponse au traitement
- **Spécificité 69,6%**
 - Présence de BOC dans autres pathologies

Inconvénients

IgG uniquement

Absence d'information quantitative

Manipulations longues, coûteuses

Variabilité nb BOC avec latitude

Variabilité interprétation BOC

Quid des profils avec seulement 1 ou

2 BOC

→ **Nouveaux biomarqueurs**

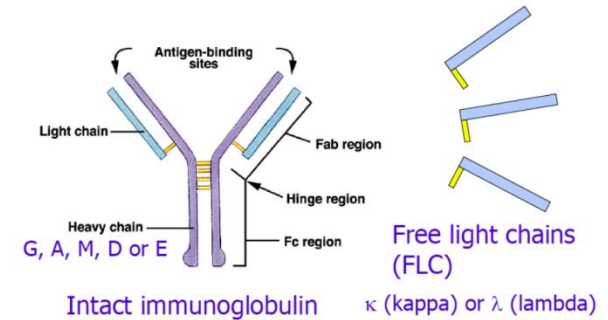
CLL Kappa dans le LCS

ÉTUDE DES CHAÎNES LÉGÈRES LIBRES DANS LE LCR

CLL Kappa dans le LCS

Excès de synthèse de chaînes légères par rapport aux chaînes lourdes (10-40%)

Élimination rénale



Emily Rimmer, University of Manitoba

Chaînes légères κ

Synthétisées en quantité plus importante

Monomères

½ vie : 2-3 heures

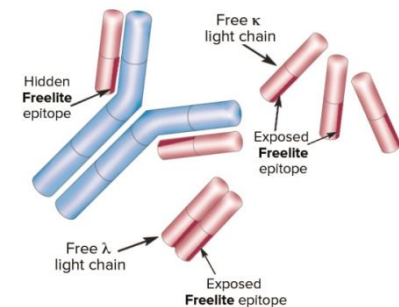
Plus associées au répertoire auto-immun

Sérum κ/λ ≈ 0,6

Chaînes légères λ

Dimères

½ vie : 3-6 heures



CLL Kappa dans le LCS - Contexte

- 1980-1990
 - Intérêt détection des chaînes légères libres Kappa dans le LCS des patients SEP
 - CLL Kappa LCS chez 84% des patients SEP contre 2,4% pour Contrôles
 - CLL Lambda non spécifique
 - Réponse immune IgG-Kappa dans la SEP et IgG-Lambda dans les maladies infectieuses du SNC
 - Corrélation entre l'Index Kappa et la présence de BOC IgG dans le LCS de patients SEP
- Mais
 - premières techniques de dosage des CLL dans le LCS → ELISA
 - faible sensibilité
 - moins informatives que l'IEF

*Rudick R.A. et al. Ann Neurol. 1986 ; 20(1):63-9.
DeCarli C. et al. Neurology. 1987;37(8):1334-8.*

*Rudick R.A. et al. Neurology. 1989;39(7):964-8.
Fagnart O.C. et al. J Neuroimmunol. 1988;19(1-2):119-32*

CLL Kappa dans le LCS - Contexte

- Depuis 2010
 - Amélioration des techniques de dosages:
 - immuno-néphélométrie ou immuno-turbidimétrie,
 - ont permis de relancer l'intérêt pour le dosage des CLL dans le LCS, particulièrement dans la SEP
- ➔ nombreuses études publiées sur le dosage des CLL Kappa et **l'Index Kappa** dans le cadre de la SEP

The screenshot shows a PubMed search interface. The search bar contains the text "kappa free light chains + multiple sclerosis". Below the search bar, there are buttons for "Save", "Email", and "Send to". The search results are sorted by "Best match" and displayed on page 1 of 15. The first result is titled "The Increasing Role of Kappa Free Light Chains in the Diagnosis of Multiple Sclerosis" by Konen FF, Schwenkenbecher P, Jendretzky KF, Gingele S, Söhs KW, Tumani H, Söbe M, Skripuletz T. The article is from Cells, 2021, Nov 6;10(11):3056. The PMID is 34831279. The article is available as a Free PMC article. The abstract states: "Free light chains (FLC) are a promising biomarker to detect intrathecal inflammation in patients with inflammatory central nervous system (CNS) diseases, including multiple sclerosis (MS). The diagnostic use of this biomarker; in particular the ...".

PubMed.gov

kappa free light chains + multiple sclerosis

Advanced Create alert Create RSS User Guide

Save Email Send to Sorted by: Best match Display options

MY NCBI FILTERS

149 results Page 1 of 15

RESULTS BY YEAR

1975 2022

1 The Increasing Role of **Kappa Free Light Chains** in the Diagnosis of **Multiple Sclerosis**.

Cite Konen FF, Schwenkenbecher P, Jendretzky KF, Gingele S, Söhs KW, Tumani H, Söbe M, Skripuletz T. Cells. 2021 Nov 6;10(11):3056. doi: 10.3390/cells10113056.

Share PMID: 34831279 Free PMC article. Review.

Free light chains (FLC) are a promising biomarker to detect intrathecal inflammation in patients with inflammatory central nervous system (CNS) diseases, including **multiple sclerosis (MS)**. The diagnostic use of this biomarker; in particular the ...

Comment utiliser ce paramètre?

Diagnostic SEP

Pronostic SEP

Réponse au traitement SEP

En complément des BOC?

- ✓ pré-screening
 - ✓ Algorithmes?

- ✓ 1 ou 2 BOC

En remplacement des BOC?

- ✓ Binarisation = Perte d'informations?

Valeur absolue des CLL kappa

- ✓ Seuil de détection/sensibilité
- ✓ Automates dépendants
- ✓ Turbidimétrie/néphémémétrie

Dosage dans le seul LCR

Variations âge, sexe

Seuils?

Index κ = Quotient Kappa/Quotient Albumine

- ✓ Seuil?

Fraction intrathécale: IF κ

- ✓ Formule complexe...
$$\text{FLC IF} = (\text{FLC}_{\text{loc}} / \text{CSF FLC}) \times 100$$

with $\text{FLC}_{\text{loc}} = (\text{Q}_{\text{FLC}} / \text{Q}_{\text{FLC}(\text{lim})}) \times \text{serum FLC}$
$$\text{Q}_{\text{KFLC}(\text{lim})} = 3.27 (\text{Q}_{\text{alb}}^2 + 33)^{0.5} - 8.2 (\times 10^{-3})$$

Etude réalisée au CHU de Nantes



Etude rétrospective Mars 2019 → Décembre 2020

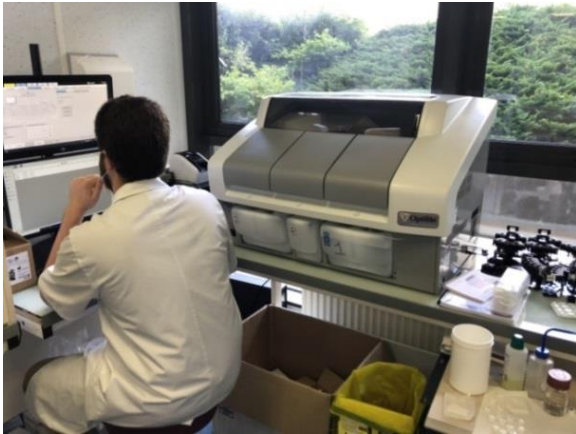
Analyse protéinologique du LCS et du sérum de **397 patients**

- Dosages IMMAGE 800® (Beckman Coulter®) sérums et LCS (Alb, IgG, IgA, IgM)
- IEF sur Hydrasis® (Sebia®)
 - 152 patients BOC+
 - 245 patients BOC-

Dosages sur Optilite de juillet 2020 à Février 2021

Albumine, IgG, IgA, IgM, CLLK, CLLL sérum et LCS

Dosages CLL Kappa dans le LCS et le sérum



Paramètre	CLL Kappa sérum	CLL Kappa LCS	CLL Lambda sérum	CLL Lambda LCS
Dilution échantillon	1/10	Pur	1/8	Pur
Autres options (dilutions)	Pur	½	Pur	½
	½	1/10	½	1/8
	1/100	1/100	1/80	1/80
	1/1000	1/1000	1/800	1/800
	1/10000	1/10000	1/8000	1/8000
Gamme de mesure (mg/L)	2,9 - 127	0,33 - 12,7	0,74-17,4	0,74 - 17,4

Tableau 6 : Dilutions et gammes de mesure paramètres Freelite Mx[®] Optilite[®]

Automate Optilite[®] (The Binding Site[®])

- Méthode immuno-turbidimétrique
 - Antisérums spécifiques + échantillon + tampon de réaction
 - Formation d'un complexe Antigène-Anticorps
 - Intensité de transmission lumineuse
 - Mesure spectrophotométrique (λ différent selon paramètre)



Limites de détection LCS (Freelite Mx Assay[®])

0,33 mg/L : CLL Kappa
0,74 mg/L : CLL Lambda



Etude réalisée au CHU de Nantes

Etude rétrospective Mars 2019 → Décembre 2020

Analyse protéinologique du LCS et du sérum de **397 patients**

→ 152 patients BOC+

→ 245 patients BOC-

Analyse dossiers patients

Définition de 5 groupes cliniques

Exclusion de 26 patients

Groupe	Total
SEP	103
SCI	36
AMNI	85
CS+MNNI	147
Total	371

ANNÉE 2022

N°

THÈSE
pour le
DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par
Pierre-Olivier BERTHO

Présentée et soutenue publiquement le 19 septembre 2022

Détermination de l'Index Kappa et apport biologique dans le diagnostic de la sclérose en plaques

Résultats étude Nantaise

Les patients BOC+

Sont plus jeunes

Les femmes sont plus représentées

Présentent un Index IgG significativement plus élevé que les patients BOC- (0,76 contre 0,48).

Présentent un Index Kappa significativement plus élevé que les patients BOC- (49,8 contre 3,6).

	BOC+	BOC-	P- value
Âge	39,7	50,6	0,001
H/F	50/102	112/133	NS
Se-Kappa (mg/L)	13,4	14,1	NS
LCS-Kappa (mg/L)	3,4	0,33	0,003
Index Kappa	49,8	3,6	< 0,0001

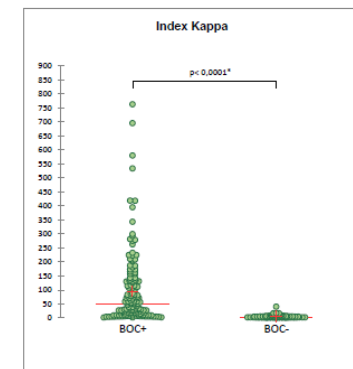


Figure 30 : Index Kappa des patients BOC+ et BOC- (Scattergram)

Résultats étude Nantaise

Les patients BOC+

Corrélation entre le nombre de BOC IgG et l'index Kappa.

→ Une valeur d'Index Kappa de 8,6 permet de séparer de manière optimale les patients BOC+ et BOC-, avec une sensibilité de 84,9% et une spécificité de 89,2%.

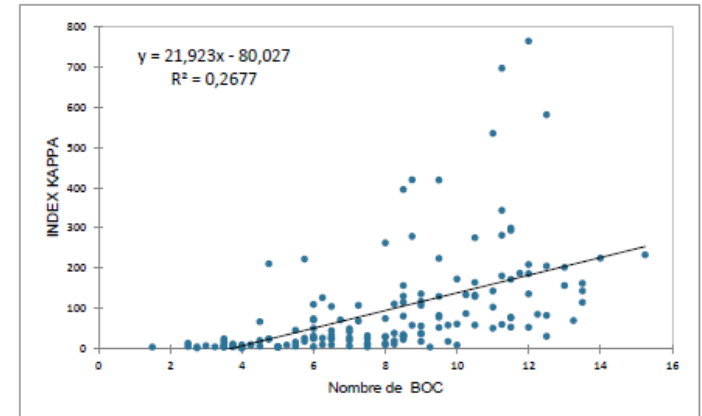
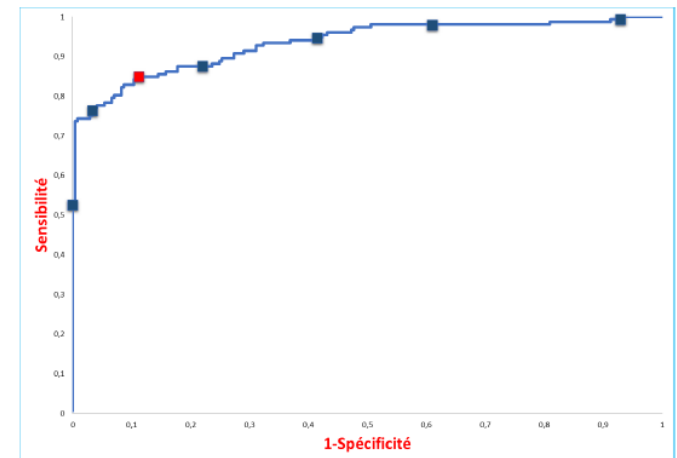


Figure 31 : Droite de corrélation Index Kappa-Nombre de BOC

ANNEXE 2: Courbe ROC évaluant la sensibilité et la spécificité de l'Index Kappa (par rapport à la détermination de BOC à l'IEF) entre groupe BOC+ et groupe BOC-, avec différents cut-offs évalués



Résultats étude Nantaise

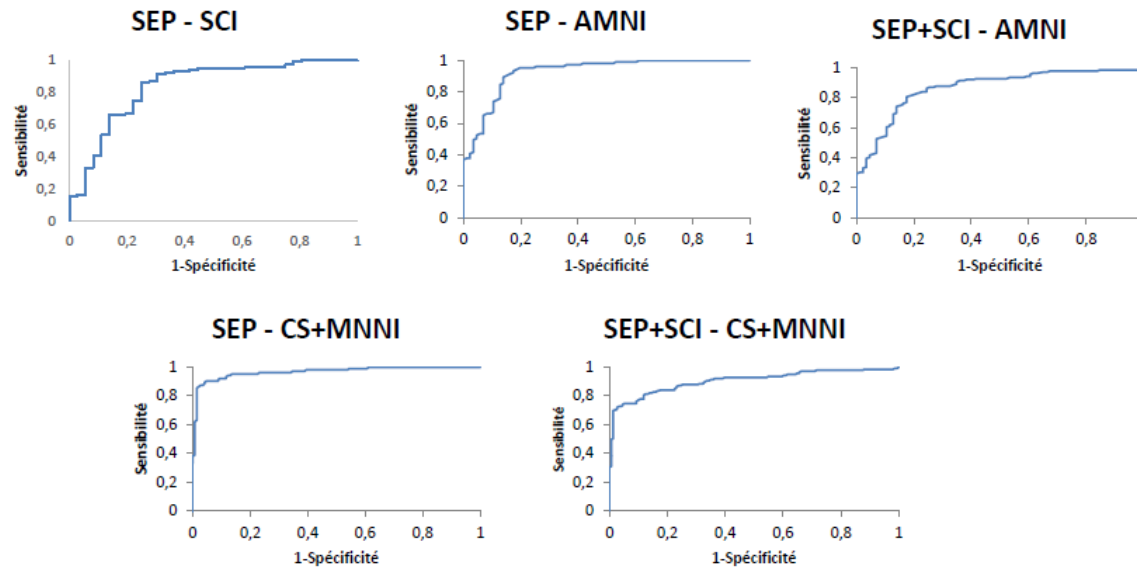
Les patients SEP sont :

- Plus jeunes que ceux des autres groupes,
- Plus fréquemment des femmes
- Très majoritairement BOC+ (95%)
- Présentent un nombre de de BOC IgG à l'IEF plus élevé
- Index Kappa médian = 74,3 significativement plus élevé que celui des autres groupes,

	SEP	SCI	AMNI	CS+MN NI
Age	38,3	46,7	56,6	48,1
F/H	75/28	21/15	39/46	84/63
Se- Kappa (mg/L)	13,4	12	15,1	14,2
CSF- kappa (mg/L)	6,1	0,33	0,33	0,33
Index Kappa	74,3	7,7	4,1	4

Résultats étude Nantaise

ANNEXE 3: Courbes ROC évaluant la sensibilité et la spécificité de l'Index Kappa (par rapport à la détermination de BOC à l'IEF) entre les différents groupes cliniques définis



- **Valeurs seuils:**

- Le cut-off d'Index Kappa permettant de séparer au mieux le groupe SEP du groupe Contrôle est de 13,3 ;
- Si on regroupe les patients SEP+SCI, le cut-off optimal est plus faible = 9,2, avec une légère baisse de la sensibilité et de la spécificité.
- Ce cut-off de 9,2 permet également une meilleure séparation des groupes SEP+SCI et AMNI.

Valeurs usuelles des chaines kappa dans le LCS

- Dans le sérum
 - Kappa libres : 3,3 - 19,4 mg/L
 - Lambda libres : 5,7 - 26,3 mg/L
 - ratio : 0,26 - 1,65
- **Dans le LCS**
 - Beaucoup de patients avec chaines kappa < seuil de détection (0,33 mg/L)
 - 60% étude toulousaine
 - Notre étude: 54% (214/39), λ 80,6% (320/397)
 - Mais plus de 80% en cas de BOC-
 - 80,4 % (197/245) , λ 94,3% (231/245)
 - BOC+ κ 11,2% (17/152) λ 58,6% (89/152)

Seuil CLL K LCS > 1 mg/L → pathologique

Données littérature Index Kappa

	2015	2016	2019	2019	2020	2020	2021	2021	2021	2022	2022
	Menendez -Vallarez	Zeman	Crespi	Leurs	Ferraro	Gaetani	Rosenstein	San Diaz	Vecchio	Alves Martin	Levrault
Index k	10,6	3,2	5	6,6	6,2	7,8	4,6	3,04	5	7,25	8,9

Pas de valeur seuil consensuelle...

Données littérature Index Kappa

	2015	2016	2019	2019	2020	2020	2021	2021	2021	2022	2022
	Menendez -Vallarez	Zeman	Crespi	Leurs	Ferraro	Gaetani	Rosenstein	San Diaz	Vecchio	Alves Martin	Levrault
Index k	10,6	3,2	5	6,6	6,2	7,8	4,6	3,04	5	7,25	8,9
méthode	neph	turb	turb	turb	turb	turb	neph	turb	turb	neph	turb

Pas de valeur seuil consensuelle

Hétérogénéité des méthodes de dosages des CLL K

Limite de détection :

0,33 mg/L en turbidimétrie Optilite- Binding Site®

0,06 mg/L en néphélométrie BN - Siemens®

→ ≠ Valeurs prises en compte (0,33 ou 0,17 ou 0)

Données littérature Index Kappa

	2015	2016	2019	2019	2020	2020	2021	2021	2021	2022	2022
	Menendez -Vallarez	Zeman	Crespi	Leurs	Ferraro	Gaetani	Rosenstein	San Diaz	Vecchio	Alves Martin	Levrault
N =	176	124	385	669	652	170	252	245	373	191	1621
SEP	29	17	127	284	84	38	203	45	133	39	675
Index k	10,6	3,2	5	6,6	6,2	7,8	4,6	3,04	5	7,25	8,9
méthode	neph	turb	turb	turb	turb	turb	neph	turb	turb	neph	turb

Pas de valeur seuil consensuelle

Nombre de sujets, nombre de SEP

Population contrôle

SEP ± SCI vs non SEP

Notre étude: 9,2 SEP+SCI mais 13,3 SEP vs contrôles

Etude SF-SEP (2022): 8,9

SEP vs AMNI

Notre étude : 13,2

Etude SF-SEP (2022) : 11,6

Données littérature Index Kappa

	2015	2016	2019	2019	2020	2020	2021	2021	2021	2022	2022
	Menendez -Vallarez	Zeman	Crespi	Leurs	Ferraro	Gaetani	Rosenstein	San Diaz	Vecchio	Alves Martin	Levrault
N =	176	124	385	669	652	170	252	245	373	191	1621
SEP	29	17	127	284	84	38	203	45	133	39	675
Index k	10,6	3,2	5	6,6	6,2	7,8	4,6	3,04	5	7,25	8,9
méthode	neph	turb	turb	turb	turb	turb	neph	turb	turb	neph	turb

Pas de valeur seuil consensuelle

Hétérogénéité des méthodes de dosages des CLL K

≠ Valeurs prises en compte

Nombre de sujets,

Nombre de SEP

SEP seul ou avec SCI versus quel groupe

Sensibilité 90-95%

Spécificité 80-90%

VPP 50-95%

VPN 85-99%

Facteurs influençant ou pas index κ

675 patients SEP inclus

OUI

- Age
 - \nearrow âge = \searrow index Kappa
- Genre
 - Index kappa femmes > hommes
- Maladie active
 - Index plus élevé

NON

- Phénotype SEP
- Corticoïdes avant PL
- Type d'événement clinique
- Méthode de dosage
- Congélation des échantillons

Place en clinique

- 214 patients avec événement clinique évocateur de SEP, suivi 5 ans
- Index Kappa > 6,6
 - Associé à une nouvelle poussée
 - ≠ BOC
 - Meilleure performance des critères Mc Donald avec index Kappa que BOC
- Risque de 2^{ème} poussée X 2 tous les + 100 d'index Kappa

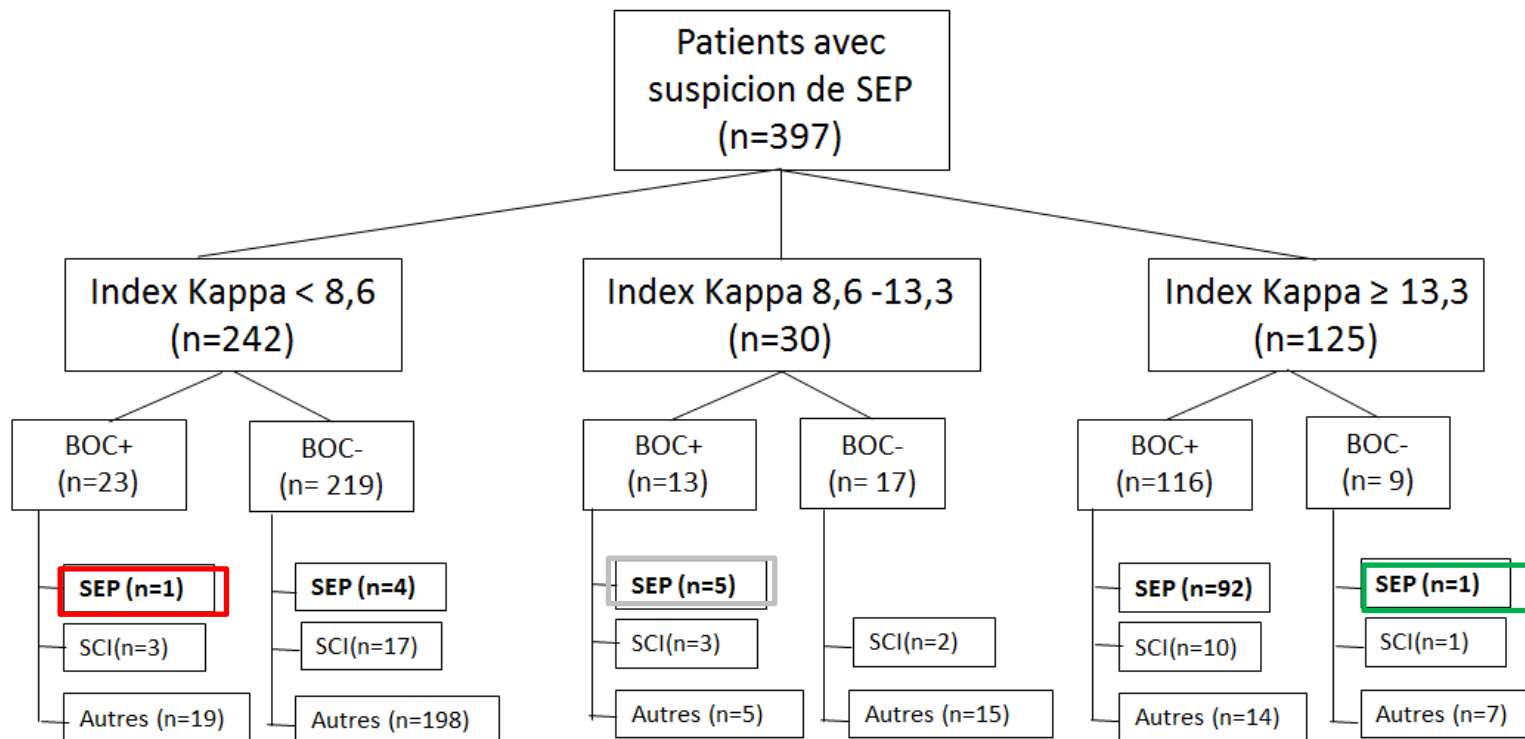
Arambide et al, Brain 2022; Berek et al Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation 2021

Place en pratique

- Index Kappa: marqueur biologique potentiel de la SEP?
 - En complément de la recherche de BOC plutôt que seul
 - Gain de spécificité surtout (Spécificité IEF: 69%)
- Résultat rapide, quantitatif, opérateur-indépendant
- Dosage des paramètres sur même automate pour éviter variabilités
 - Abaissement seuil de quantification des CLL dans le LCS?
- Intérêt d'un algorithme décisionnel

Proposition d'algorithme

- Développé par certains auteurs (*Valencia-Vera E. et al.; Clin Chem Lab Med. 2018, Marlas M et al 2022*)
- **Notre étude**
 - **BOC+ vs BOC-** - cut-off de **8,6** → VPP 99% et VPN 80%
 - **Partie 2: SEP vs Contrôles** cut-off de **13,3** → VPP 99% et VPN 40%



Dosage CLL kappa dans le LCR

- Résultat quantitatif
- Plus rapide que l'IEF
- Facilement automatisable
- Adaptée à de grandes séries de patients
- Moins coûteuse
- Valeur du seuil d'Index Kappa (cut-off) doit être mieux définie
- Harmonisation/standardisation des techniques de laboratoire souhaitable

→ place dans le diagnostic de la SEP

Intégration dans la prochaine révision des critères de McDonald?

Take home message

Analyse biochimique du LCS

Examens spécialisés

Fréquent en CHU (activité recours)

Contextes pathologiques variables

Analyses quantitatives et qualitatives

Consensus d'interprétation des BOC

CLL kappa en développement

Dialogue clinico-biologique



Merci pour votre attention