



COLLEGE NATIONAL DE BIOCHIMIE DES HÔPITAUX

25^e Journées Nationales

Paris 28-29 Janvier 2016

Programme 16891500004

Protéines : électrophorèse et immunotypage du LCR

Le LCR, un liquide que l'on explore en routine médicale et qui est une fenêtre sur la physiologie du SNC et la physiopathologie

Dr José BOUCRAUT

AP-HM – Laboratoire d'Immunologie



COLLEGE NATIONAL DE BIOCHIMIE DES HÔPITAUX
25^e Journées Nationales
Paris 28-29 Janvier 2016
Programme 16891500004



ODPC N°1689

DECLARATION D'INTERET
DANS LE CADRE DE MISSIONS DE FORMATION

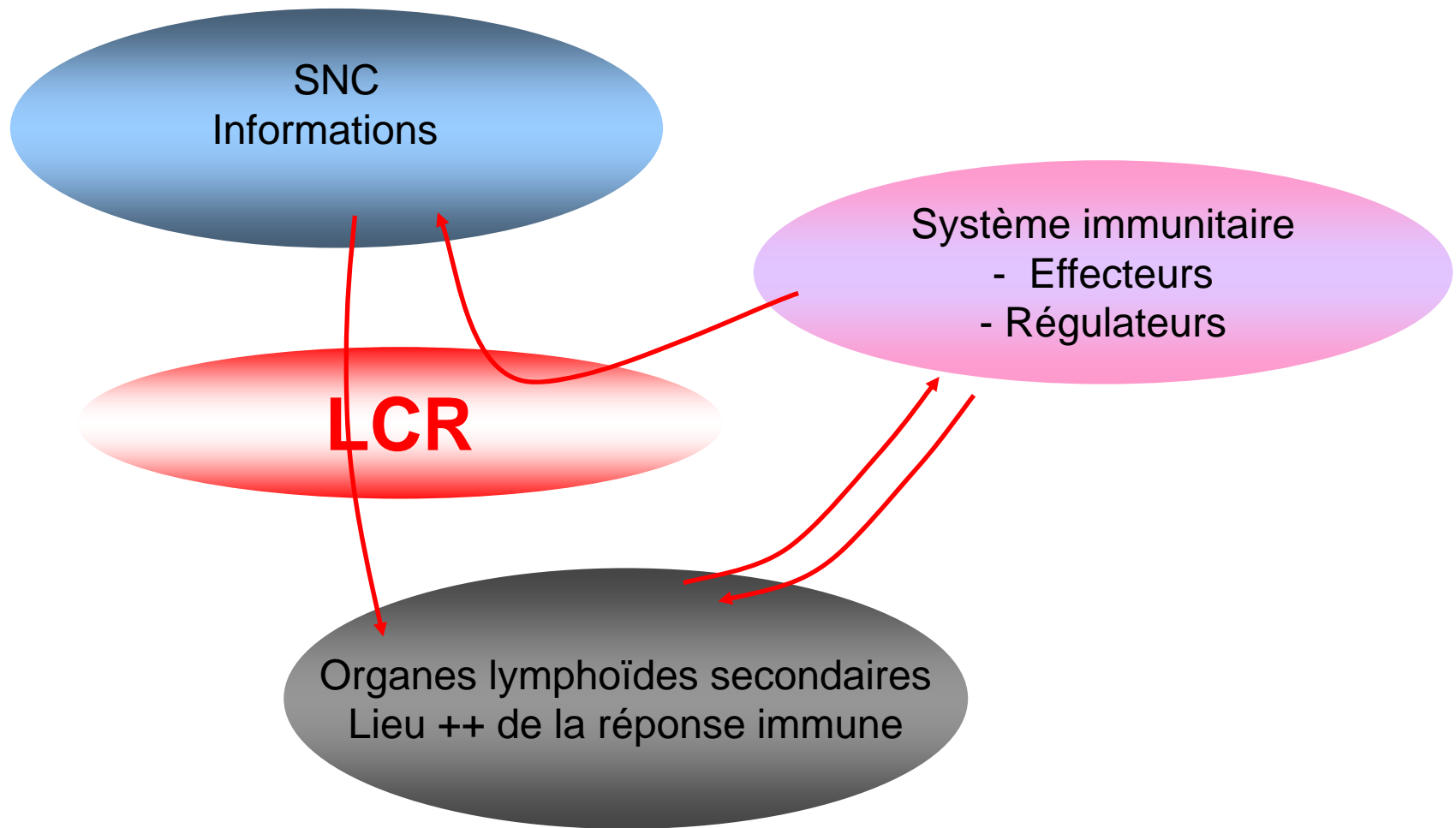
Dr José BOUCRAUT, MD, PhD, MCU HC-PH

AP-HM – Laboratoire d'Immunologie

UMR 7286 CRNS : Equipe interactions neuroimmunes et pathologies du système nerveux

déclare sur l'honneur

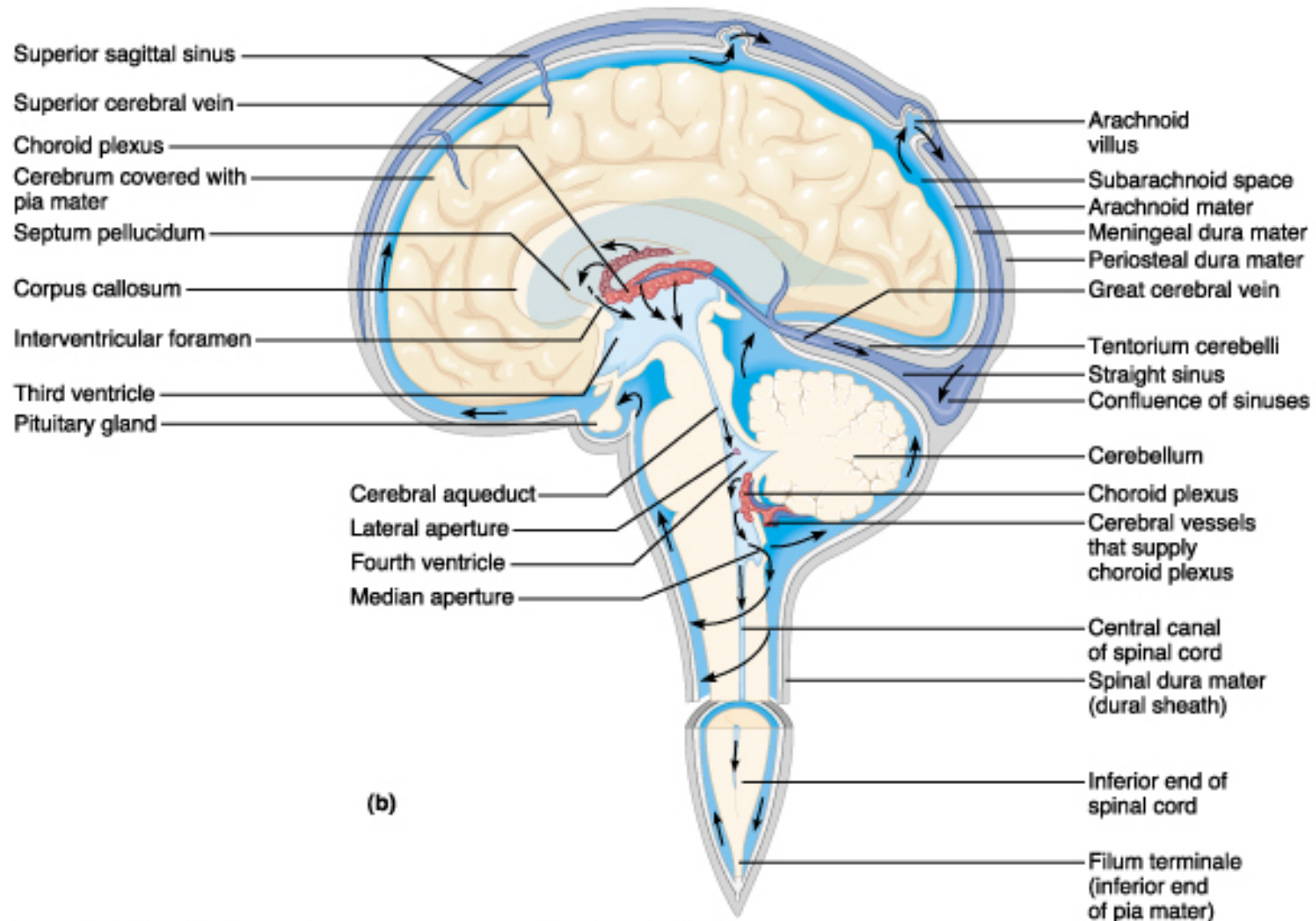
ne pas avoir d'intérêt, direct ou indirect (financier) avec les entreprises pharmaceutiques, du diagnostic ou d'édition de logiciels susceptible de modifier mon jugement ou mes propos, **concernant le DMDIV et/ou le sujet présenté.**



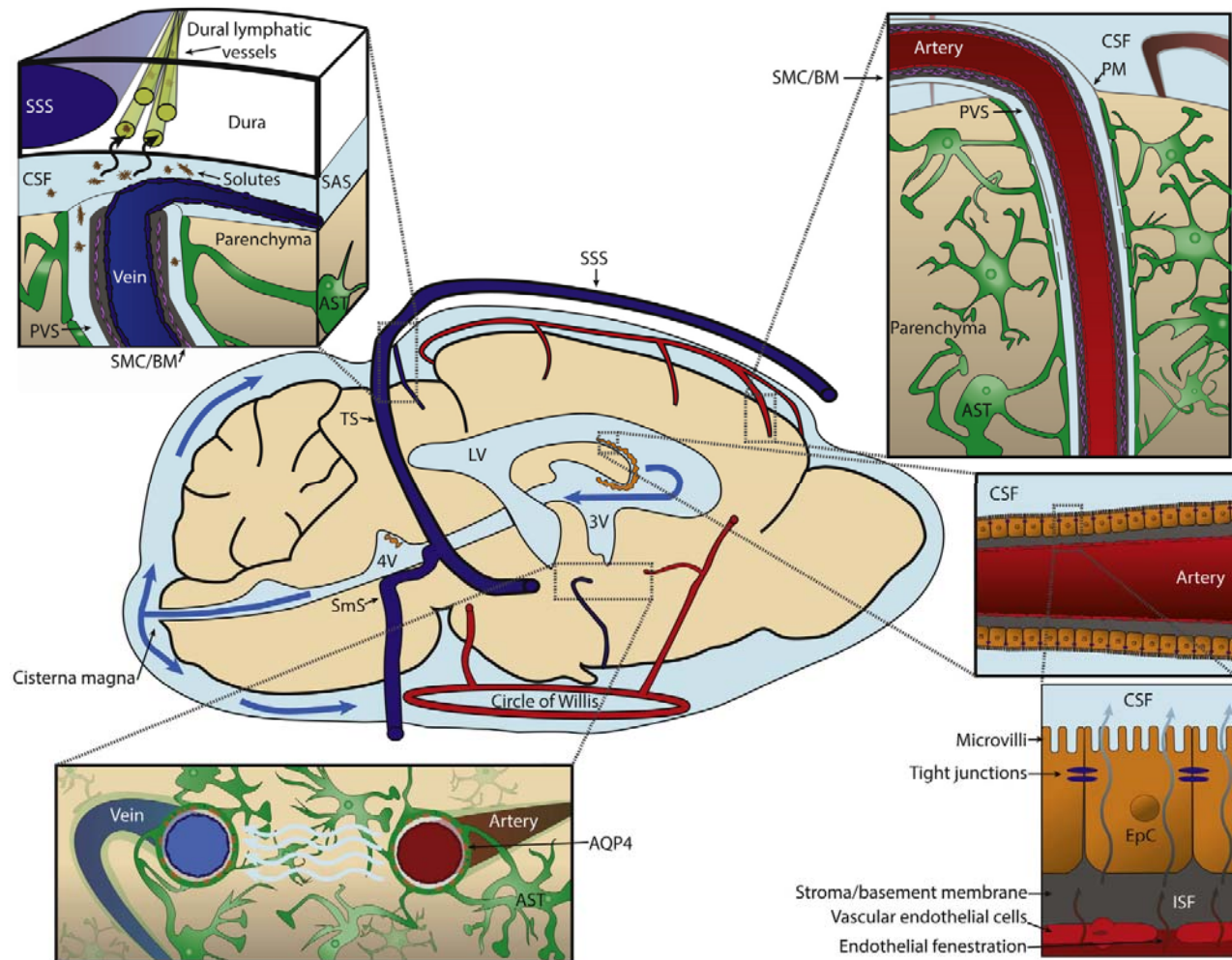
Le LCR est la principale voie des interactions neuroimmunes

Le LCR est utilisé en routine for le diagnostic des maladies autoimmunes, inflammatoires, infectieuses, neurodégénératives et potentiellement utiles pour les psychiatriques dans l'avenir

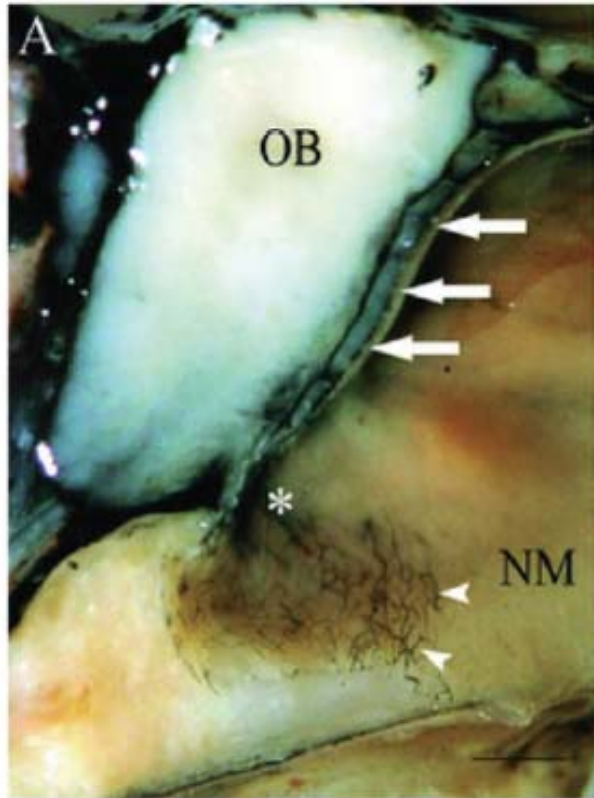
Anatomie des espaces liquidiens



Les origines et les voies de résorption du LCR



Les origines et les voies de résorption du LCR

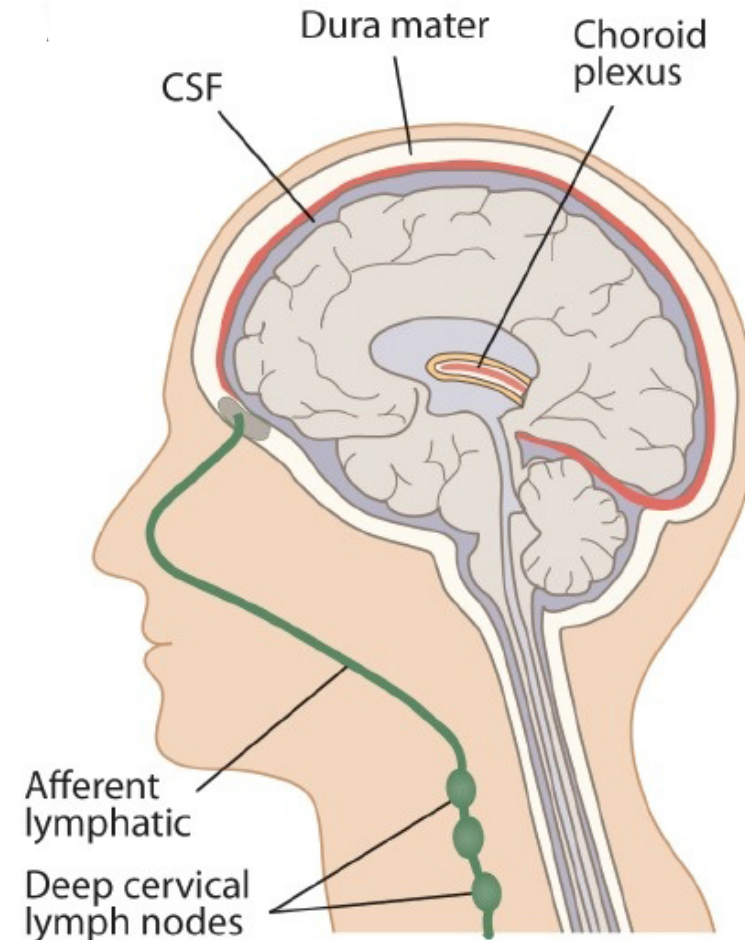


Neuropathology and Applied Neurobiology (2006), 32, 388–396

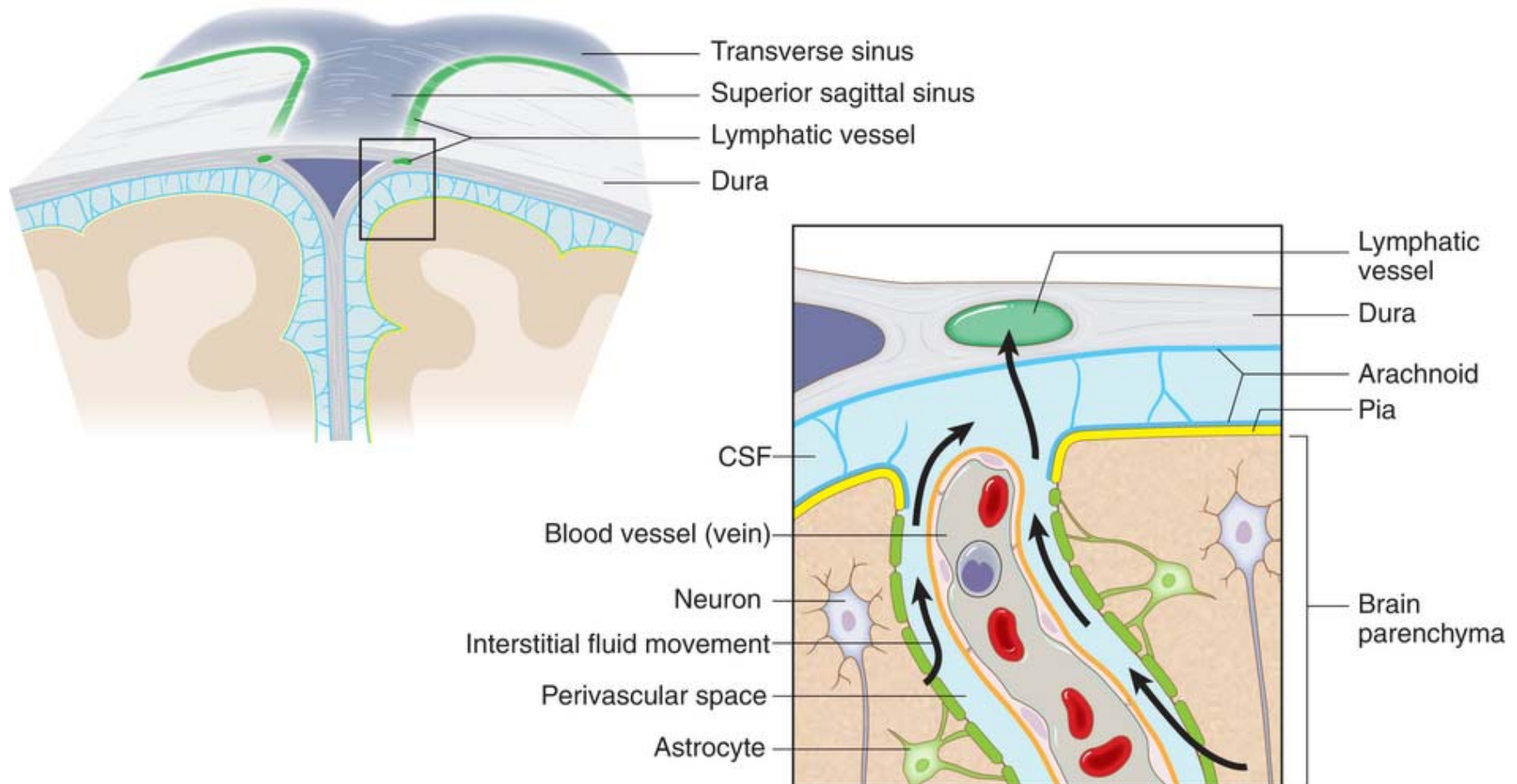
doi: 10.1111/j.1365-2990.2006.00737.x

The olfactory route for cerebrospinal fluid drainage into the peripheral lymphatic system

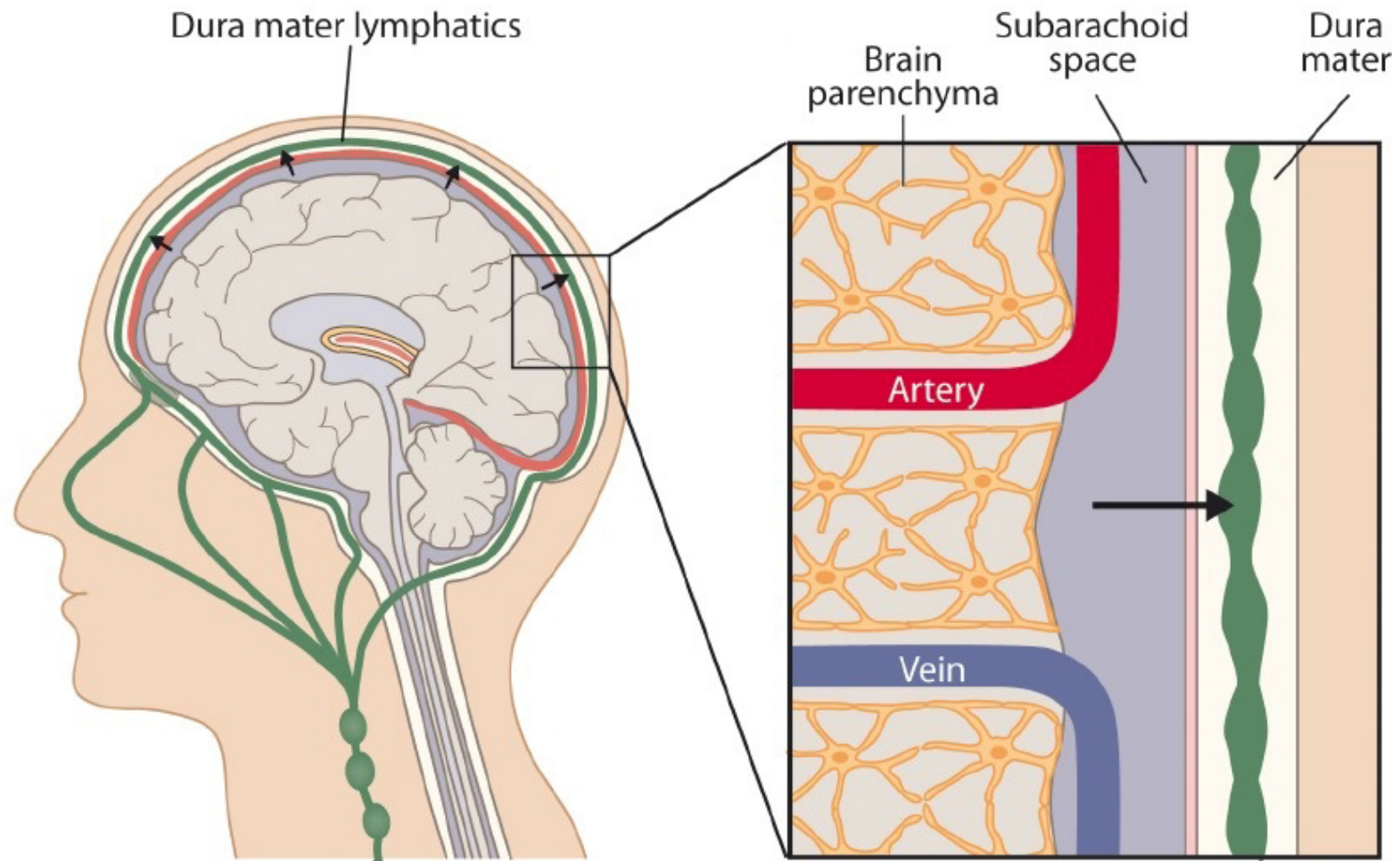
B. A. Walter*†, V. A. Valera‡, S. Takahashi* and T. Ushikit



Les origines et les voies de résorption du LCR

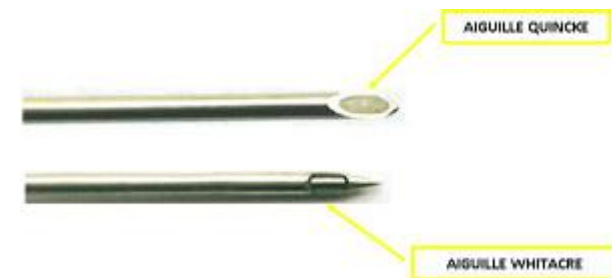
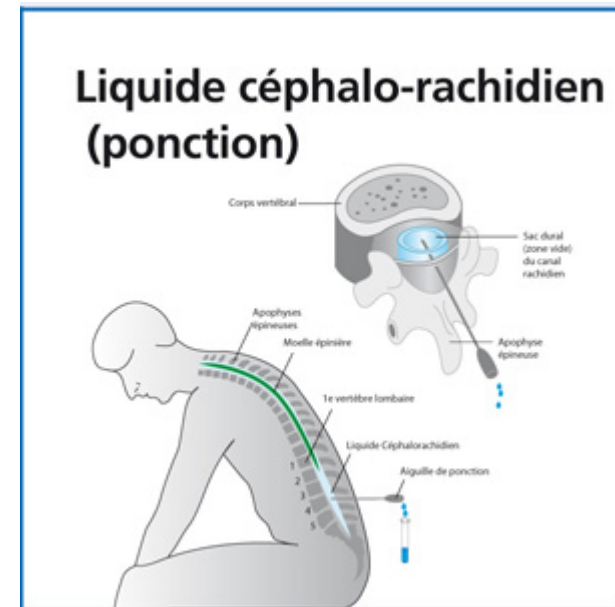


Les origines et les voies de résorption du LCR



Comment se réalise un prélèvement de LCR

- Ponction lombaire :
 - Préparation psychologique
 - Entre L3 et L4 ou L4 et L5
 - Eviter d'être traumatique
 - Petite aiguille avec mandrin
 - Eliminer les premières gouttes sang
 - Laisser couler goutte à goutte quelques ml
 - Contre-indication : hypertension intracrânienne
 - Effets indésirables :
 - Ponction non douloureuse si.....
 - Syndrome post-PL sauf si.....
- Ponction intra-ventriculaire :
 - indication de dérivation ventriculaire : hydrocéphalie

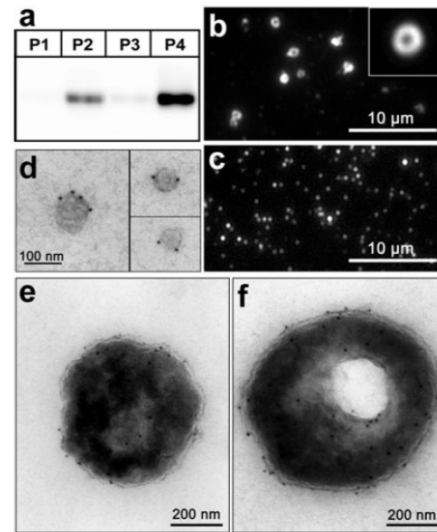


Composition du LCR

- Le volume total du LCR est de 80 à 150 ml
- Le volume de LCR nouvellement formé est d'environ 500 ml/j
- C'est un un liquide clair, eau de roche, légèrement visqueux
- pH et concentrations de glu, K, Ca, bicarbonates et a.a. plus bas que ceux du plasma
- Concentrations de Na, de Cl et Mg plus élevées que dans le plasma.
- La transthyrétine (TTR) protéine majeure du LCR : produite par les cellules des plexus choroïdes : fonction de transport h thyroïdienne.
- de 1 à 3 cellules/mm³ : issus du sang par passage au niveau des plexus choroïdes.
 - Prédominance de lymphocytes (T mémoires ++) et de NK régulatrices avec peu de monocytes et de polynucléaires. (Voie d'immunosurveillance)
- Contient des biomarqueurs issus du tissu nerveux et du liquide interstitiel : voie g lymphatique et passage ependymaire

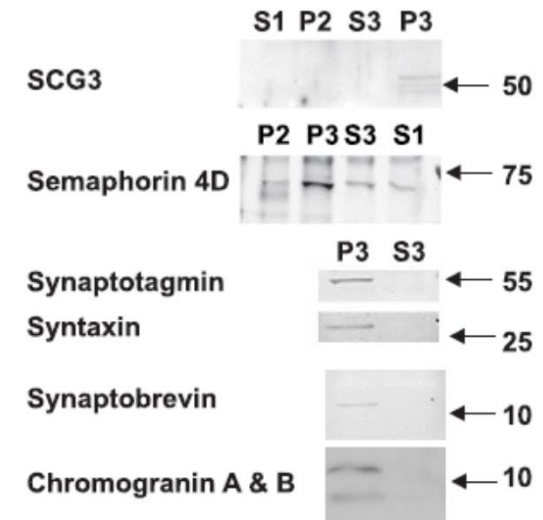
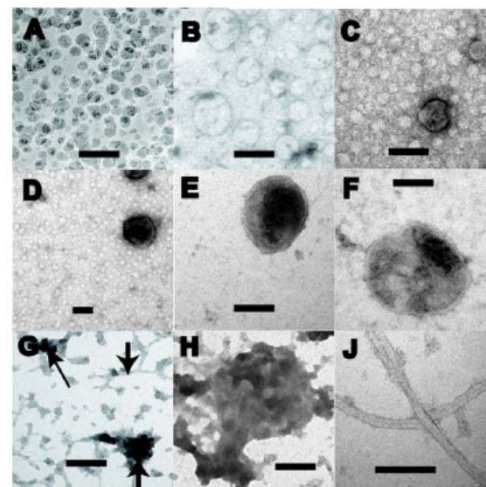
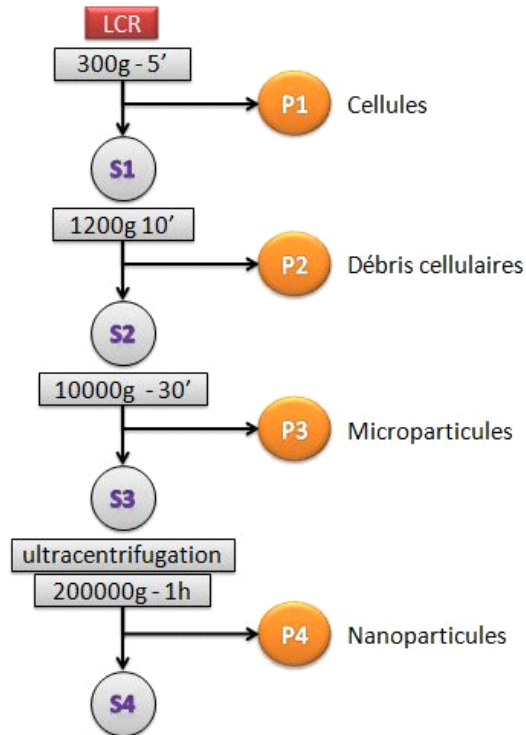
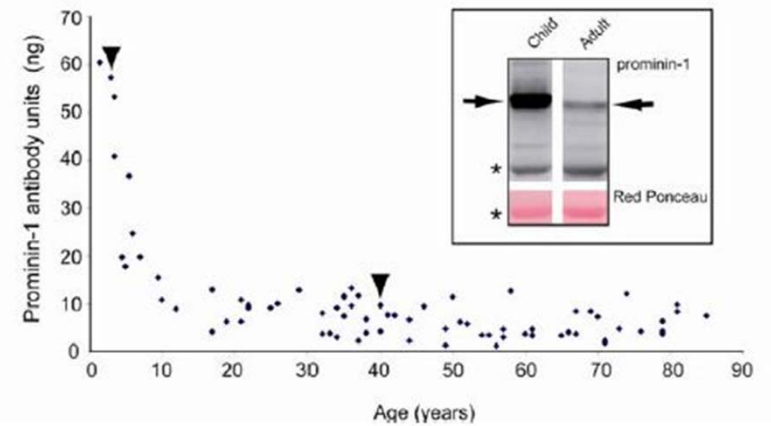
Présence de nanoparticules

CSF in mice E 11

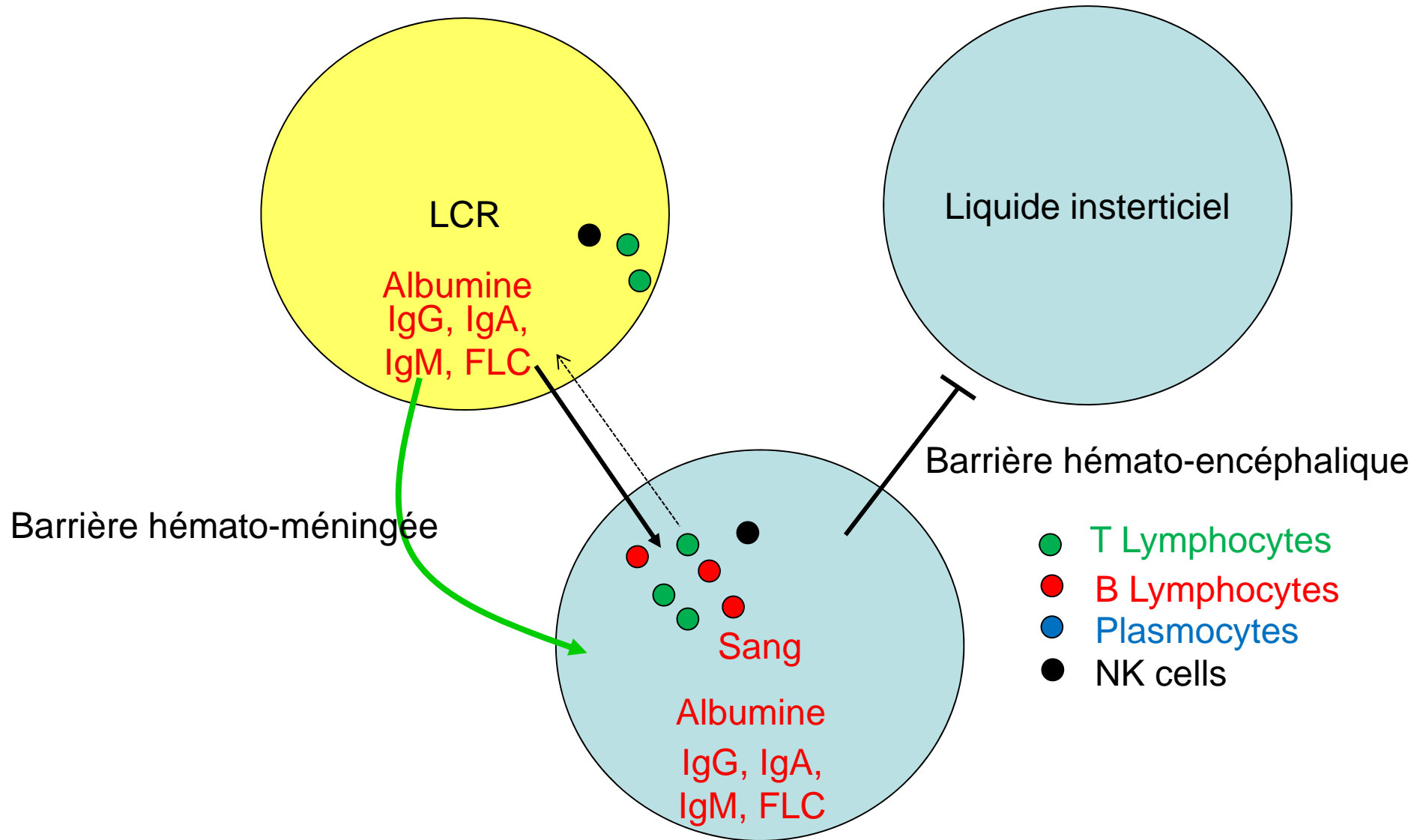


Huttner HB et al, 2008, Stem cells

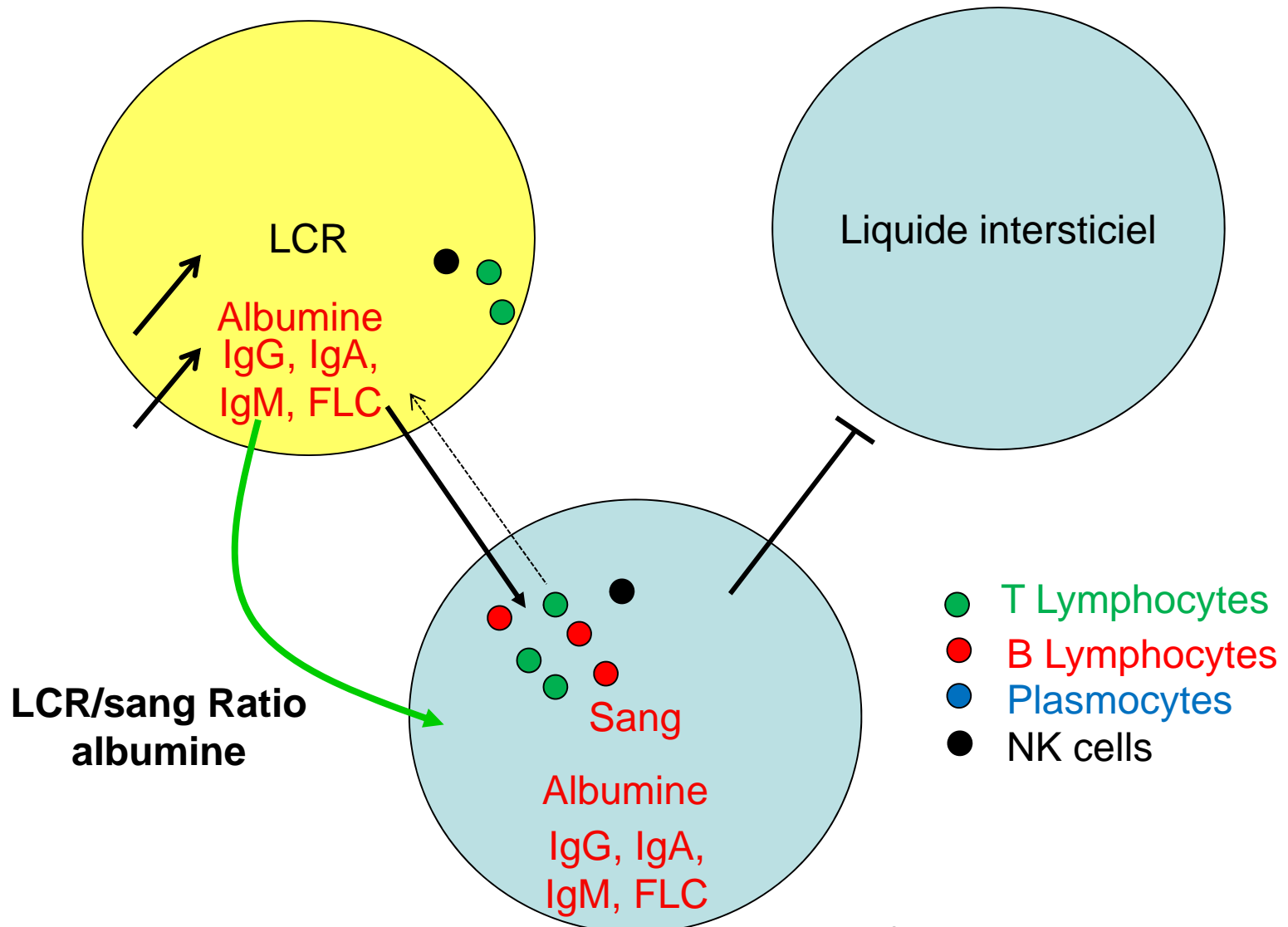
Human CSF



Condition physiologique



Altération de la BHM



Meningites : infectieuses, carcinomateuses; inflammatoires (par ex. Pachyméningite IgG4 (**passage de cellules**))
Meningoradiculites, Polyradiculopathies aiguës ou chroniques

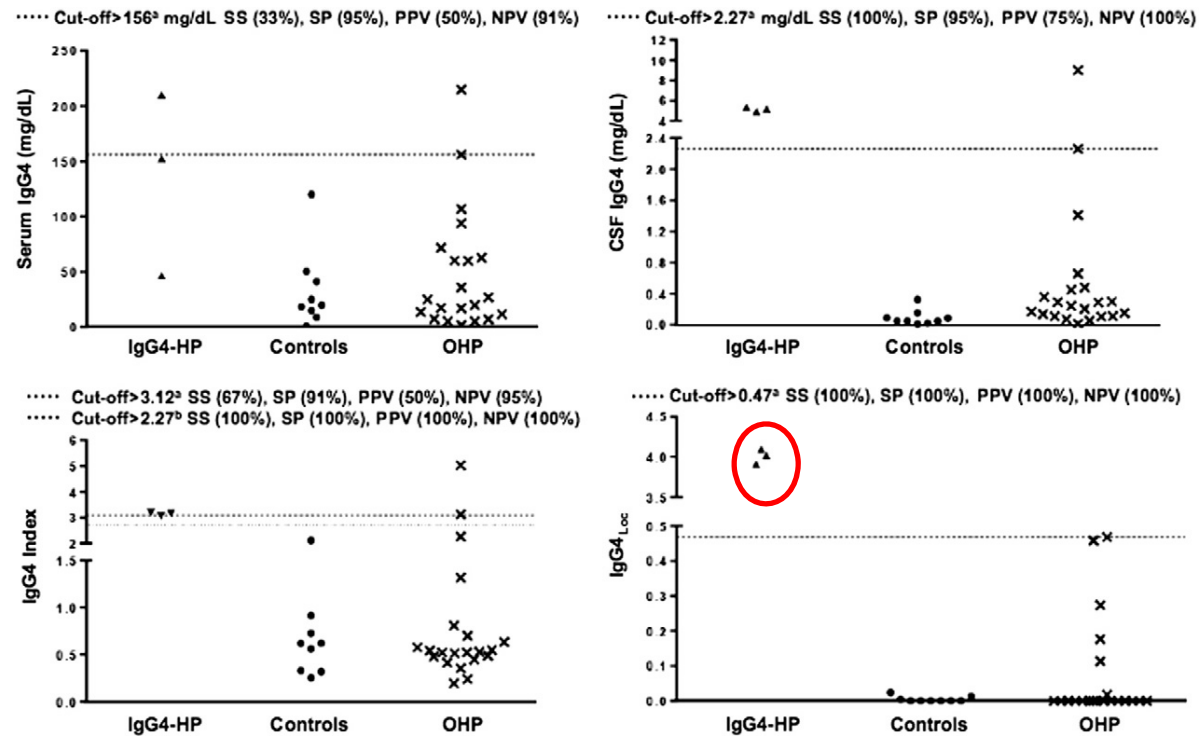
Diagnostic value of *IgG4 Indices* in IgG4-Related Hypertrophic Pachymeningitis ☆☆☆★



Emanuel Della-Torre ^{a,b,*}, Laura Galli ^c, Diego Franciotta ^d, Enrica Paola Bozzolo ^b, Chiara Briani ^e, Roberto Furlan ^f, Luisa Roveri ^g, Maria Sessa ^g, Gabriella Passerini ^{h,1}, Maria Grazia Sabbadini ^{a,b,1}

ABSTRACT

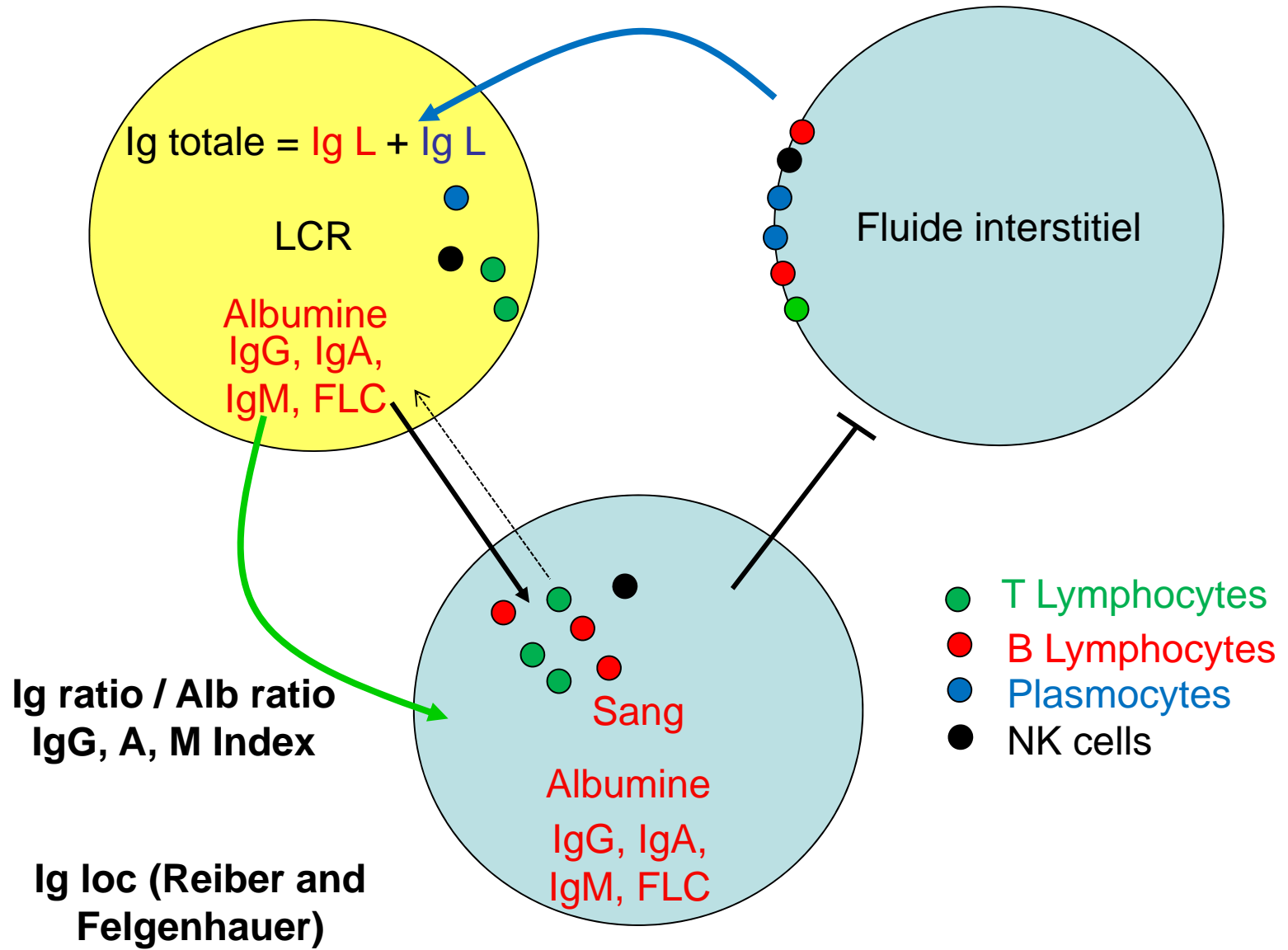
Diagnosis of IgG4-Related Hypertrophic Pachymeningitis (IgG4-HP) relies on meningeal biopsies, because cerebrospinal fluid (CSF) diagnostic biomarkers are lacking. Here, we determined whether IgG4 intrathecal production could distinguish IgG4-HP from other disorders presenting with HP (OHP). In patients with IgG4-HP, the median CSF IgG4 concentration, IgG4 Index and IgG4_{L_{oc}} were significantly higher than in both controls and OHP. CSF IgG4 levels higher than 2.27 mg/dL identified 100% of IgG4-HP and 5% of OHP. An IgG4_{L_{oc}} cut-off of 0.47 identified 100% of IgG4-HP and no cases of OHP. **Our results support CSF IgG4 quantification and IgG4 Indices as alternatives to meningeal biopsy for the diagnosis of IgG4-HP when this procedure is contraindicated or uninformative.**



ELISA method

Reiber and Felgenhauer's formula

Synthèse intrathécale d'Ig



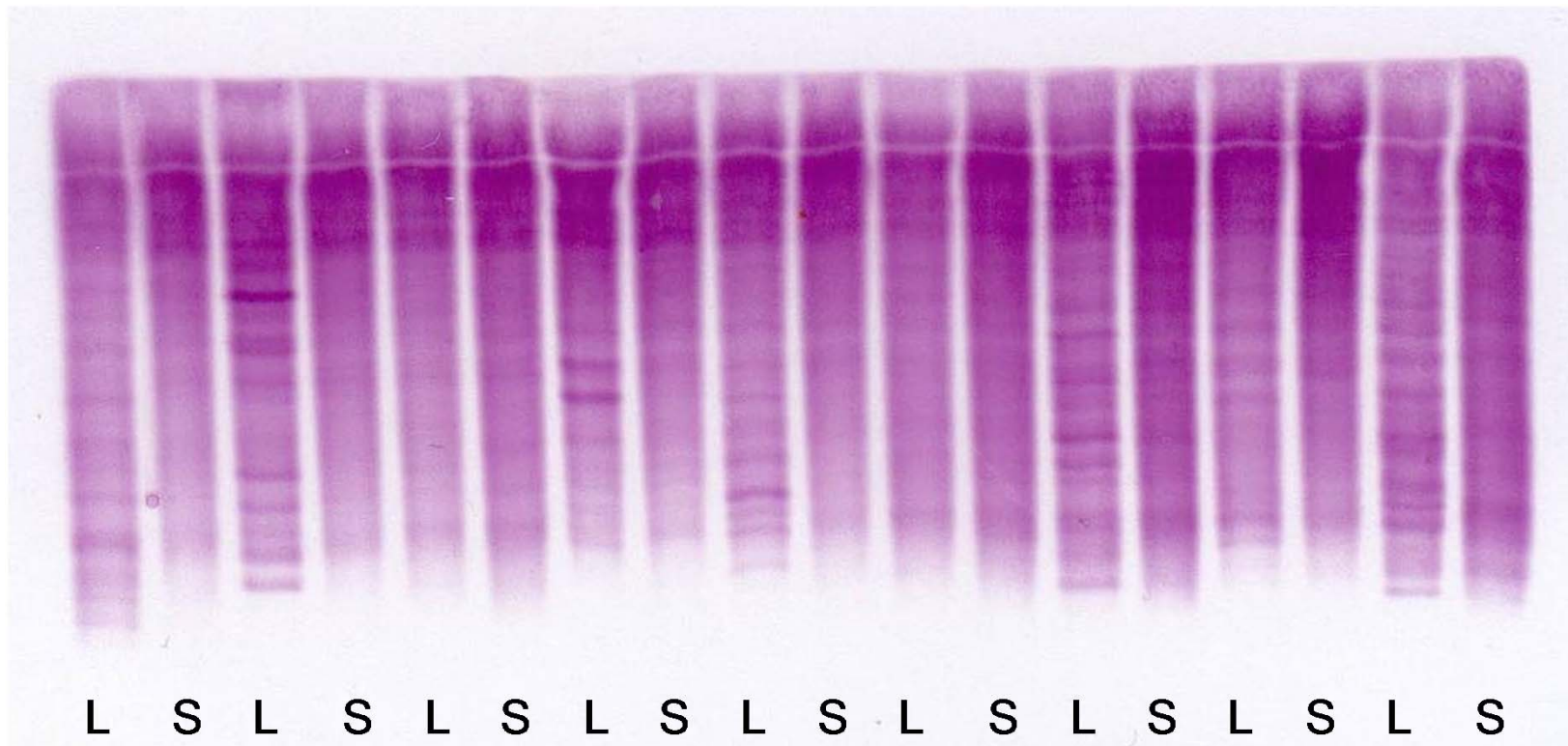
Non spécifique de la SEP

Méthodologie : situation

- L'index IgG n'est pas assez sensible et n'a pas de valeur prédictive pour la pathologie.
- Le marqueur diagnostique gold standard est la recherche de bandes oligoclonales en IEF
- La présence de BOC devant une NORB, un CIS voire un RIS est prédictive de la conversion clinique vers la SEP
- La SIT intrathécale d'IgM a un intérêt pronostique pour les CIS (Durante et al. 2011)
- La SIT intrathécale d'IgM a un intérêt pour les méningoradiculites BB
- La SIT d'IgA est parfois isolée en cas de SEP
- Pour les CLL, potentiel biomarqueur, résultats contradictoires pour la valeur prédictive
- Manque de valeur normales et variations méthodologiques

Oligoclonal banding

Isoelectrofocusing



Interêts des technique d'Immunofixation pour les IgG, les IgA, les IgM et les Kappa et Lambda ++

Method

- 1200 couples sérum/LCR analysés de manière prospective issus de patients explorés pour des pathologies inflammatoires ou non inflammatoires du SNC et SNP.
- Albumine, IgG, IgM, IgA, FLC K et L concentrations quantifiés sur le SPAplus (limite basse = 0,10 mg/L).
- Calcul des Index IgG, IgA, IgM, FLCK and FLCL ($\text{valeurCSF/valeurSerum}/(\text{AlbSerum}/\text{Alb CSF})$).
- Recherche de bandes oligoclonales vec la méthode SEBIA (IF, G, +/- A; M, K ou L).
- Analyse des données cliniques de certains dossiers

Bilan normaux et exclusion des SEP

n = 456	< threshold	Mean [min – max]	Mean + 2 SD
IgG (mg/L)	0	26 [5.37 – 72.24]	132.53
IgA (mg/L)	5	2.82 [0.72 – 23.8]	6.93
IgM (mg/L)	313	No calcul	No calcul
FLC K (mg/L)	91	0.27 [0.1 – 1.66]	0.73
FLC L (mg/L)	151	0.23 [0.1 – 2.15]	0.66

	n	Mean + 3 SD
Index IgG	456	0.72
Index IgA	451	0.45
Index IgM	146	0.18
Index K	365	9.78
Index L	305	9.62

n = 276	Mean [min– max]	Mean + 3 SD
Ratio K/L serum	1.21 [0.46– 3]	2.8
Ratio K/L CSF	1.43 [0.43– 3.53]	3.1

Altération modérée de la BHM

n = 135	< threshold	Mean [min – max]	Mean + 2 SD
IgG (mg/L)	0	99.7 [15 – 280.8]	132.53
IgA (mg/L)	0	8.08 [0.72 – 23.8]	17.26
IgM (mg/L)	28	1.32 [0.29 – 12.5]	4.63
FLC K (mg/L)	2	0.52 [0.10 – 3.54]	1.43
FLC L (mg/L)	2	0.38 [0.1 – 2.21]	1.06

	n	Mean + 3 SD
Index IgG	135	0.75
Index IgA	135	0.49
Index IgM	113	0.28
Index K	133	10.18
Index L	133	7.79

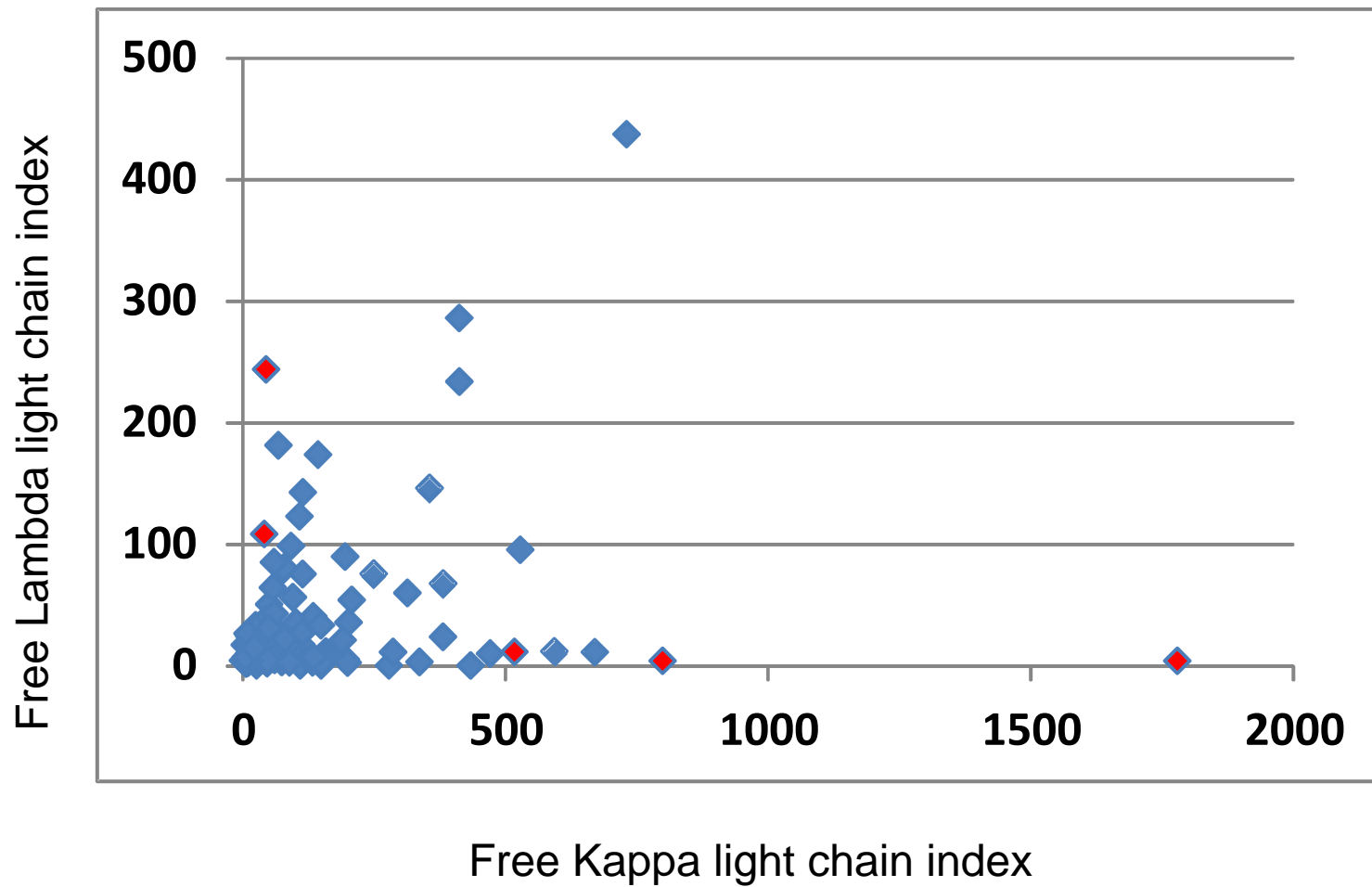
n = 131	Mean [min – max]	Mean + 3 SD
Ratio K/L serum	1.21 [0.46 – 3]	2.01
Ratio K/L CSF	1.43 [0.43 – 3.53]	3.2

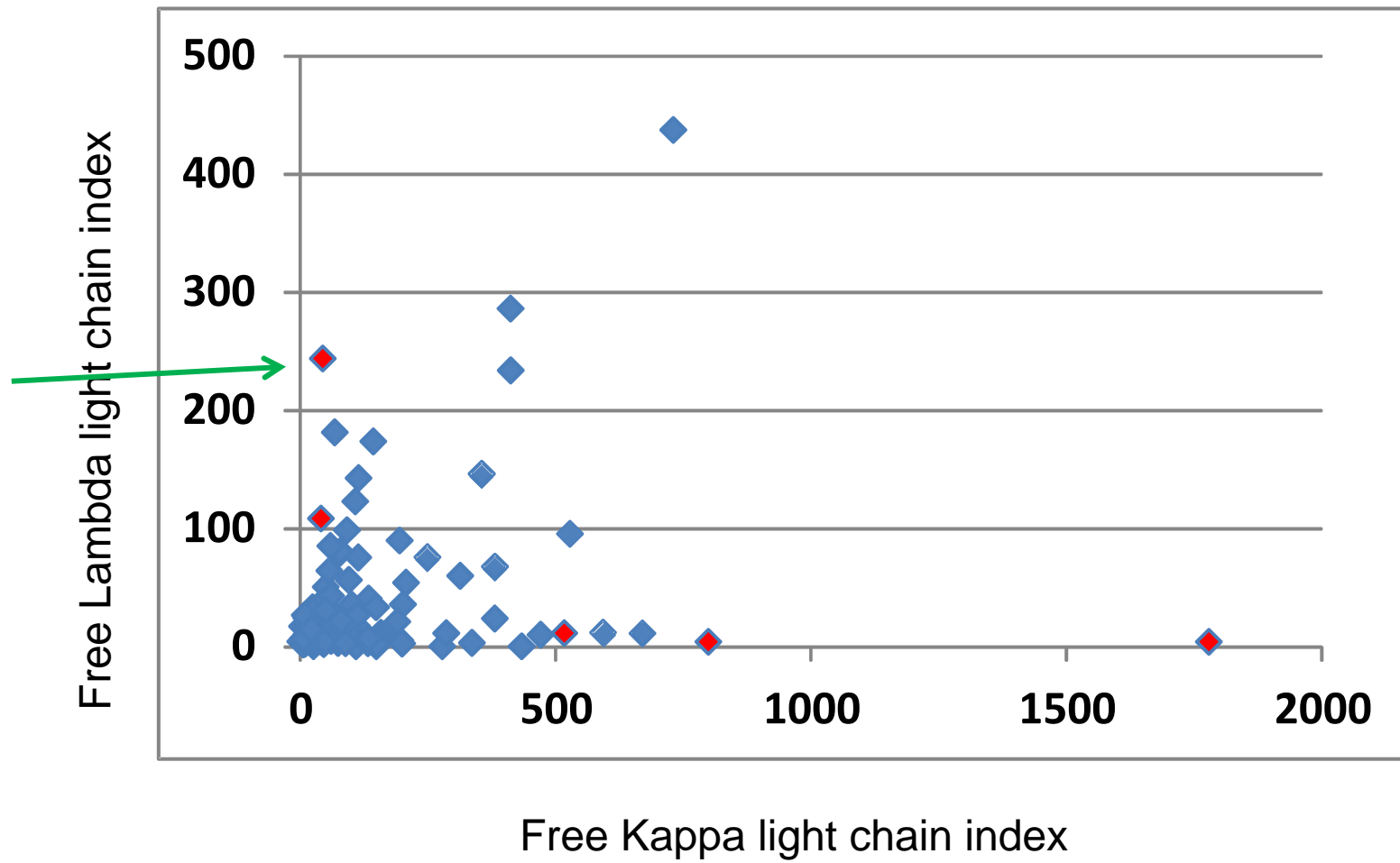
Sujets avec bandes oligoclonales

n = 132	> threshold (percentage)	Min - Max
IgG index	93 (70.4%)	0.41 – 4.28
IgA index	26(19.6%)	0.13 – 3.02
IgM index	55 (41.6%)	NC – 1.36
FLC K index	129 (98.5%)	3.63 – 1779
FLC L index	84 (63.6%)	NC - 437

n = 129	number	Min - Max
FLC CSF ratio < 0.41	4 (3,1%)	0.19-0.38
FLC CSF ratio > 3	45 (34.9%)	3.12 - 509

Les ratio Kappa/Lambda





The place of Free light chain

- Anciennes Etudes :
 - Valeur pronostique de l'index Kappa
 - Nombre de poussées
 - Conversion de la forme CIS vers la SEP
- Etude récente

OPEN ACCESS Freely available online



Kappa Free Light Chains: Diagnostic and Prognostic Relevance in MS and CIS

Stefan Presslauer^{1*}, Dejan Milosavljevic², Wolfgang Huebl², Silvia Parigger¹, Gabriele Schneider-Koch¹, Thomas Bruecke¹

¹ Department of Neurology, Wilhelminenspital, Vienna, Austria, ² Department of Laboratory Medicine, Wilhelminenspital, Vienna, Austria

Conclusion: KFLC determination should become a first line screen in the diagnostic algorithms of MS and CIS. The extent of elevation of intrathecal KFLC has no prognostic value on the disease course in MS and CIS patients.

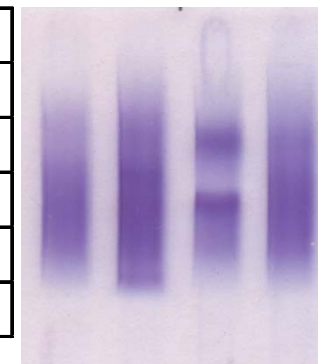
- Différences de fournisseur et d'appareil
- Analyse monoparamétrique

Patient 1

- Lymphome de bas grade depuis Janvier 2013
- Ataxie progressive
- Présence de cellules lymphomateuses B(CD19) 50%, 100% lambda
- Analyses immunochimiques

Immunofixation
Kappa Lambda

	Serum	LCR			
Albumine	42.39	2390	Ratio Alb	56.4	<6.3
IgG	4.1	123.5	Index G	0.53	<0.65
IgM	0.98	1.29	Index M	0.02	<0.11
IgA	0.69	13.96	Index A	0.35	<0.45
Kappa libres	6.06	1.04	Index KL	0.3	<0.8
Lambda libre	8.69	127.8	Index LL	26.08	<0.3



C S C S

Detection of free immunoglobulin light chains in cerebrospinal fluids of patients with central nervous system lymphomas

Roland Schroers^{1*}, Alexander Baraniskin^{1*}, Christoph Heute^{1,2}, Jan Kuhnhen², Andriy Alekseyev³, Wolff Schmiegel¹, Uwe Schlegel², Hendrik-Johannes Pels²

¹Department of Medicine, Hematology and Oncology, Ruhr-University of Bochum, Bochum; ²Department of Neurology, Ruhr-University of Bochum, Bochum; ³Department of Radiology, Ruhr-University of Bochum, Bochum, Germany

European Journal of Haematology 85 (236–242) 2010

Abstract

Diagnosis of central nervous system (CNS) lymphoma depends on histopathology of brain biopsies, because no reliable disease marker in the cerebrospinal fluid (CSF) has been identified yet. B-cell lymphomas such as CNS lymphomas are clonally restricted and express either kappa or lambda immunoglobulin light chains. The aim of this study was to find out a potential diagnostic value of free immunoglobulin light chains released into the CSF of CNS lymphoma patients. Kappa (κ) and lambda (λ) free immunoglobulin light chains (FLC) were measured in CSF and serum samples collected from 21 patients with primary and secondary CNS lymphomas and 14 control patients with different neurologic disorders. FLC concentrations and ratios were compared between patient groups and were further analyzed in correlation with clinical, cytopathological, and radiological findings. FLC concentrations for all patients were lower in CSF when compared to serum. In patients with CNS lymphoma, the FLC ratios in CSF were higher (range 3.92–0.3) compared to control patients (range 3.0–0.3). Irrespective of cytopathological proven lymphomatous meningitis, in 11/21 lymphoma CSF samples the FLC ratios were markedly **above 3.0** indicating a clonally restricted B-cell population. Increased FLC ratios in CSF were found in those patients showing subependymal lymphoma contact as detected in magnetic resonance imaging. **In summary, this is the first report demonstrating that a significant proportion of patients with CNS lymphomas display a markedly increased FLC ratio in the CSF.**

Sujets avec bandes oligoclonales

n = 132	> threshold (percentage)	Min - Max
IgG index	93 (70.4%)	0.41 – 4.28
IgA index	26(19.6%)	0.13 – 3.02
IgM index	55 (41.6%)	NC – 1.36
FLC K index	129 (98.5%)	3.63 – 1779
FLC L index	84 (63.6%)	NC - 437

n = 129	number	Min - Max
FLC CSF ratio < 0.41	4 (3,1%)	0.19-0.38
FLC CSF ratio > 3	45 (34.9%)	3.12 - 509

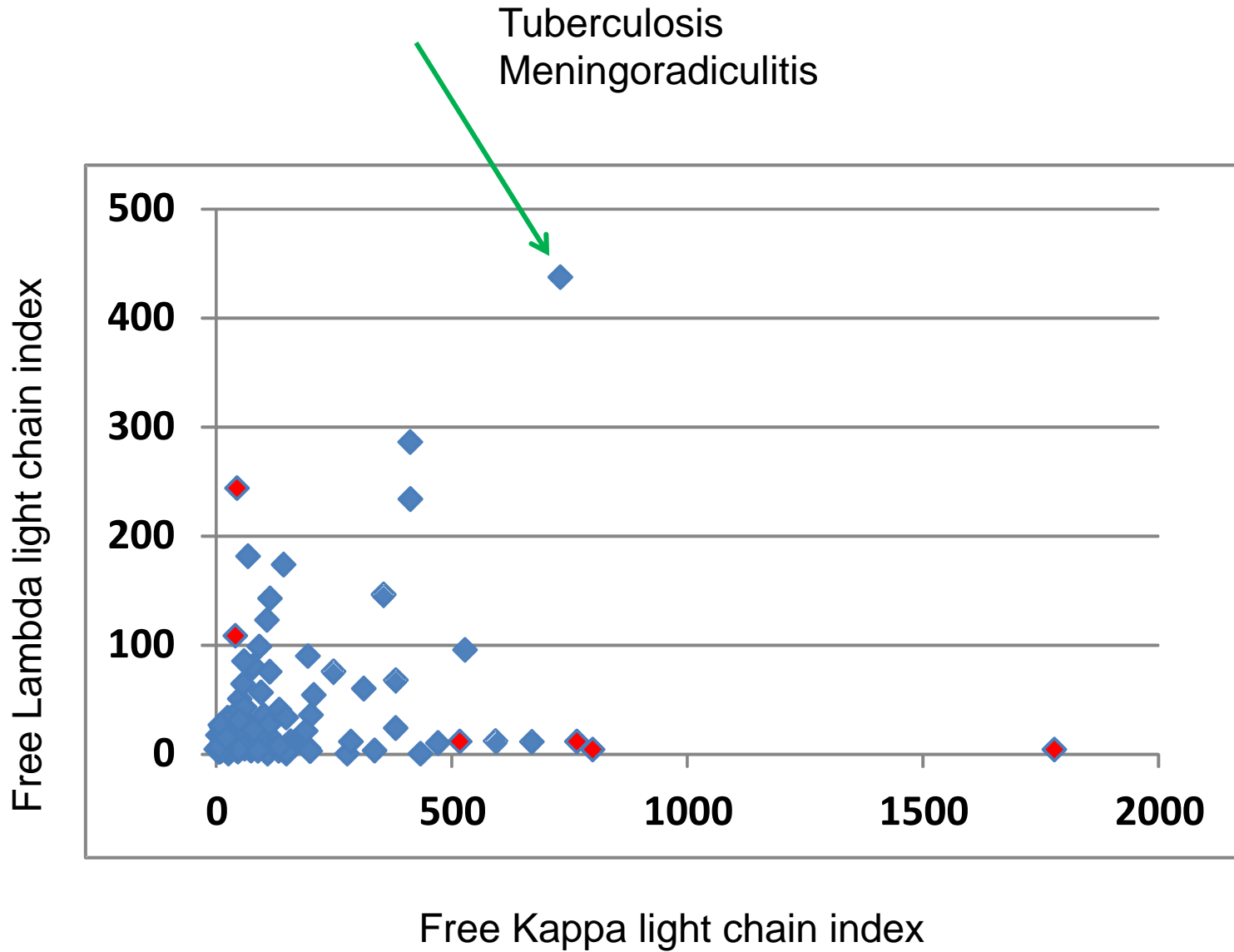


Illustration d'un cas de SEP avec
synthèse isolée d'IgA

BHM	IndG	IndM	IndA	IndK	IndL	CONCLUSION	Diagnostic
6.36795087	0.45203109	0.04148131	0.56725389	4.49007745	0.36785584	SIT d'IgA isolé	MS
6.5	0.65	0.11	0.45	0.8	0.3		

10 cas rendus normaux : 7 cas avec
index K positifs : 7 cas de suspicion
de SPE dont 5 cas de NORB

Pas de corrélation entre l'index IgM et l'index Kappa.

Kappa Free Light Chains: Diagnostic and Prognostic Relevance in MS and CIS

Stefan Presslauer^{1*}, Dejan Milosavljevic², Wolfgang Huebl², Silvia Parigger¹, Gabriele Schneider-Koch¹, Thomas Bruecke¹

¹ Department of Neurology, Wilhelminenspital, Vienna, Austria, ² Department of Laboratory Medicine, Wilhelminenspital, Vienna, Austria

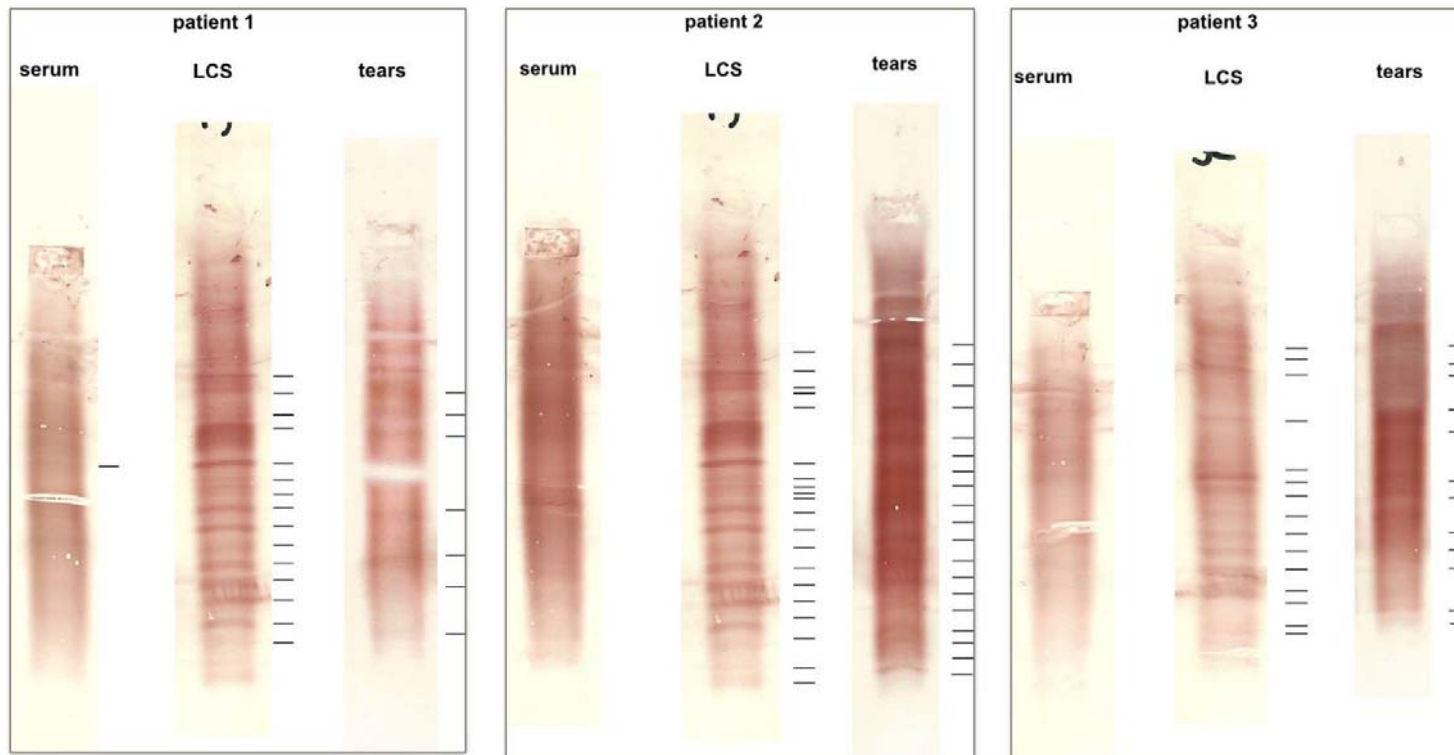
Conclusion: KFLC determination should become a first line screen in the diagnostic algorithms of MS and CIS. The extent of elevation of intrathecal KFLC has no prognostic value on the disease course in MS and CIS patients.

Conclusion

- Haute sensibilité de l'index FLC K pour le diagnostic des encéphalites
- L'analyse de l'index FLC Kappa est suffisante
- Nécessité d'une étude collaborative pour une évaluation médico-économique
- Etude clinique de suivi pour des informations pronostiques
- Intérêt pour les diagnostics des lymphomes B
 - Les cellules tumorales sont difficile à mettre en évidence
 - (PL répétées)
 - La modification du ratio n'est pas spécifique
 - Cependant : l'absence de profil oligoclonal permet d'améliorer la spécificité
 - Le dosage de l'IL-6 et l'IL-10 (ratio) est aussi informatif

Merci de votre attention !

Les larmes



C Lebrun, 2015

Les larmes

- Pas d'expérience personnelle, hors réflexion recherche
 - Prélèvements :
 - Schirmer, capillaire, avec ou sans stimulation
 - Origine variée des protéines (variations en fonction du protocole)
 - Sécrétion
 - Sérum
 - Production
 - LCR