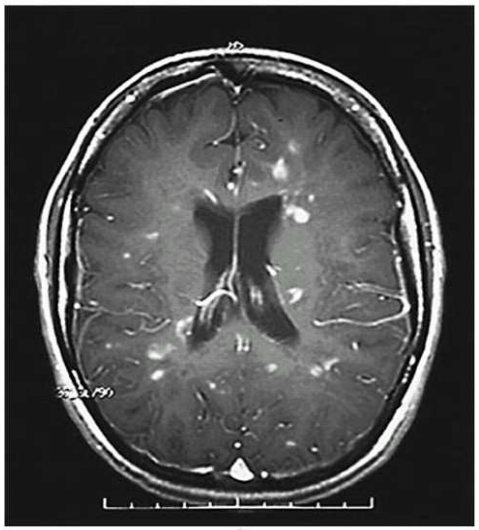
L’analyse du LCR dans le diagnostic de la sclérose en plaques

N. Gillain.
Acorata Belgique
Les Jeudis de Fleurus: 31 mai 2007

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

A

B



C

D

Qu’est-ce que la sclérose en plaques?

- C’est une maladie inflammatoire du SNC
- Elle est caractérisée par des lésions démyélinisantes dans la substance blanche cérébrale et/ou médullaire: les plaques
- Ces lésions sont disséminées dans l’espace et dans le temps
- La démonstration d’une dissémination temporelle est réalisée grâce à l’imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) qui permet de différentier les « vieilles plaques » inactives et bien délimitées des « nouvelles plaques » actives qui captent le gadolinium pendant une période de deux mois

La SEP est une maladie très hétérogène:

- Par sa symptomatologie qui dépend de l'emplacement et de la gravité des lésions:

  - troubles moteurs, névrite optique, troubles sensitifs, troubles de l'équilibre (signes inauguraux)

  - tremblements , troubles sphinctériens , troubles cognitifs (signes généralement plus tardifs)

- Par son évolution clinique: imprévisible, elle varie d'un patient à l'autre (seulement des critères de bons ou mauvais pronostic): en moyenne 12 ans après les premiers symptômes , 40% des patients sont dépendants pour la marche

L'évolution est hétérogène

Syndrome cliniquement isolé

Forme Rémittente (80%) (RR en anglais)

Forme Secondairement Progressive (= SP)

Forme Progressive Primaire (20%)

L’épidémiologie

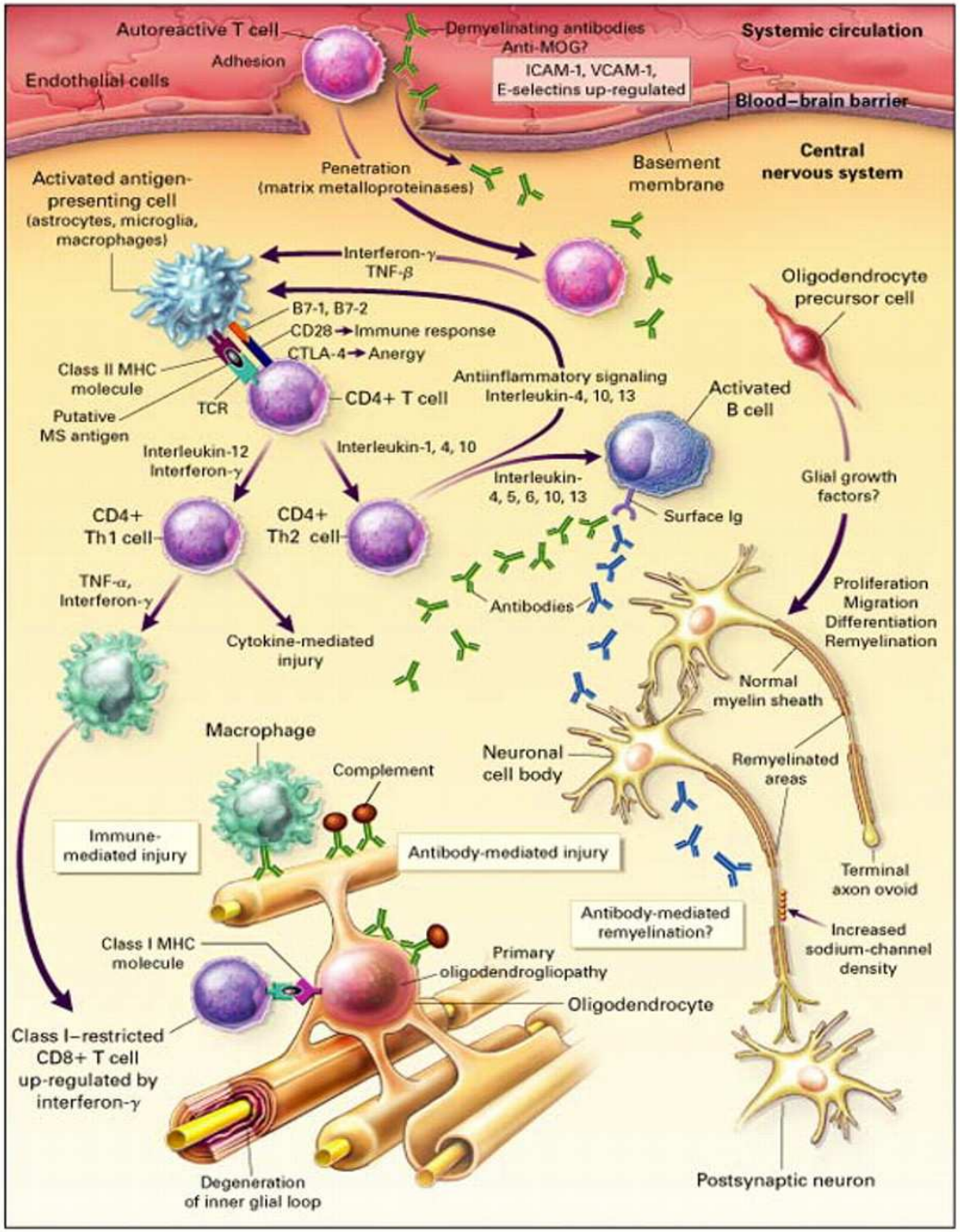
- 1 pour 1000 habitants en Belgique
- Plus fréquente chez la femme (2:1)
- Maladie rare dans l’enfance (5% avant 5 ans) et après 40 ans (10%)
- Existence d’un gradient nord-sud dans les deux hémisphères, facteurs ethniques, environnement pendant l’enfance
- Formes familiales (10% des cas): prédisposition génétique à développer une réaction immunitaire à un agent pathogène (lequel: ?)
- En Europe, associée au HLA DR2 et HLA DQW1

La physiopathologie

- Un terrain génétiquement prédisposé et un agent infectieux inconnu
- Des lymphocytes auto-réactifs périphériques qui ont une activité anti-MOG (myelin oligodendrocyte protein) et anti-MBP (myelin basic protein)
- Une réaction inflammatoire qui altère la barriére hématoencéphalique et permet le passage de ces cellules dans le SNC
- Un contact entre les cellules T cytotoxiques et les cellules présentatrices d’antigène du SNC et la libération de cytokines proinflammatoires

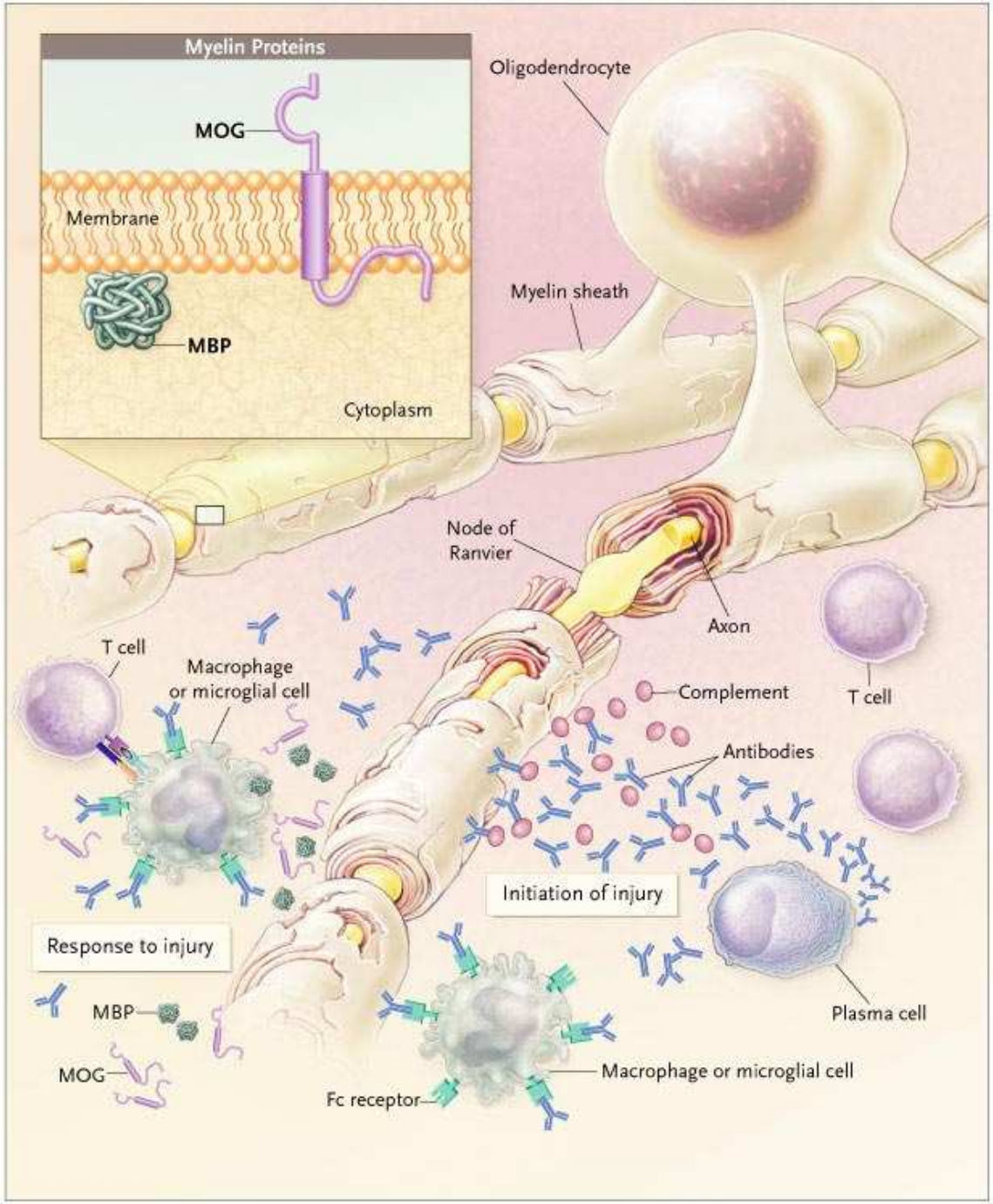
- Des clones de lymphocytes B prolifèrent: ils synthétisent des Ac différents mais dirigés contre des Ag de la gaine de myéline et les oligodendrocytes; ces anticorps activent le complément
- Les cellules T cytotoxiques et les macro-phages détruisent la gaine de myéline et dénudent l'axone
- La production locale de nouveaux Ac entretien le processus autoimmun
- Au début de la formation de la plaque, la myéline est partiellement reconstituée et l'intégrité de l'axone conservé

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

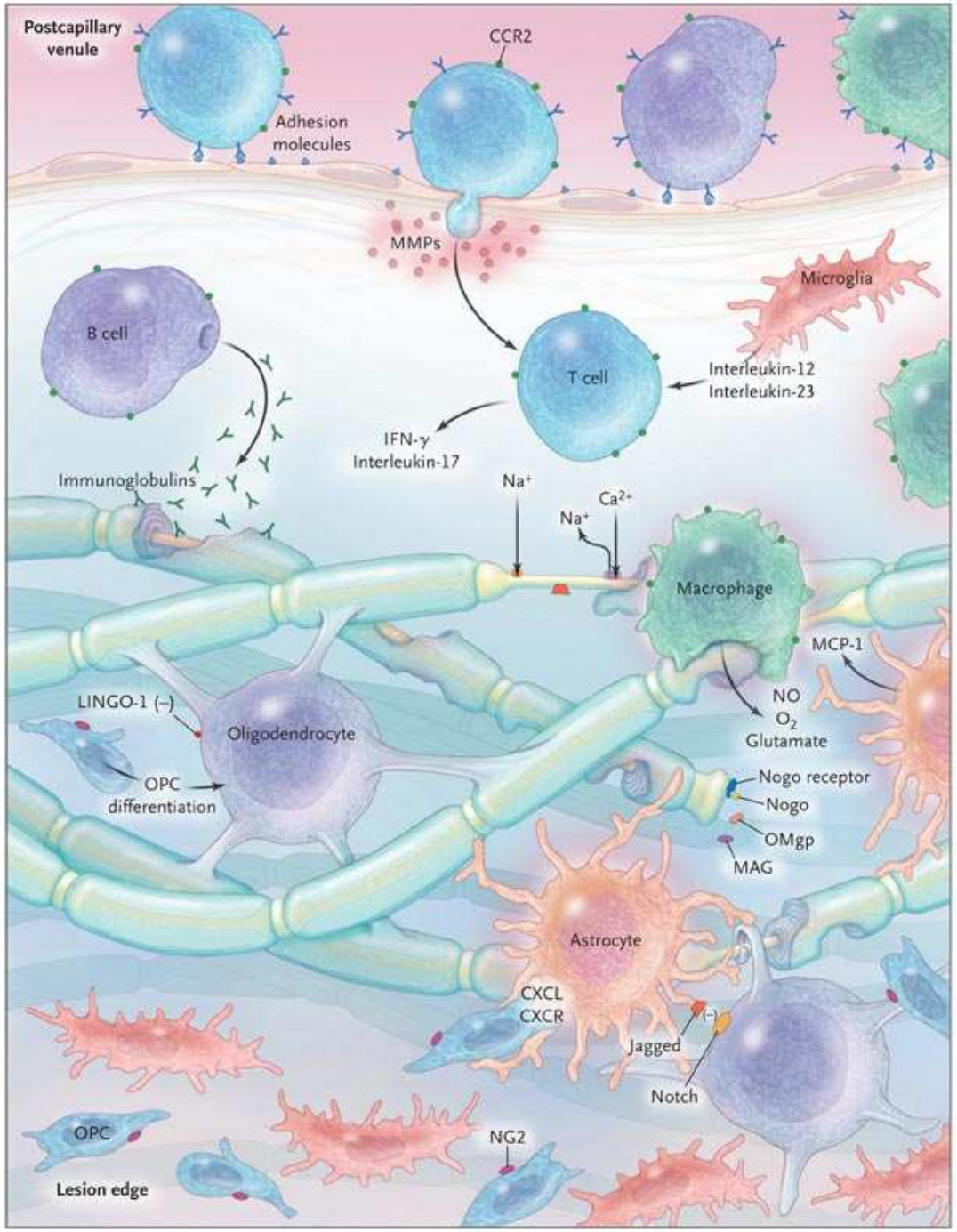


Noseworthy J et al. N Engl J Med 2000

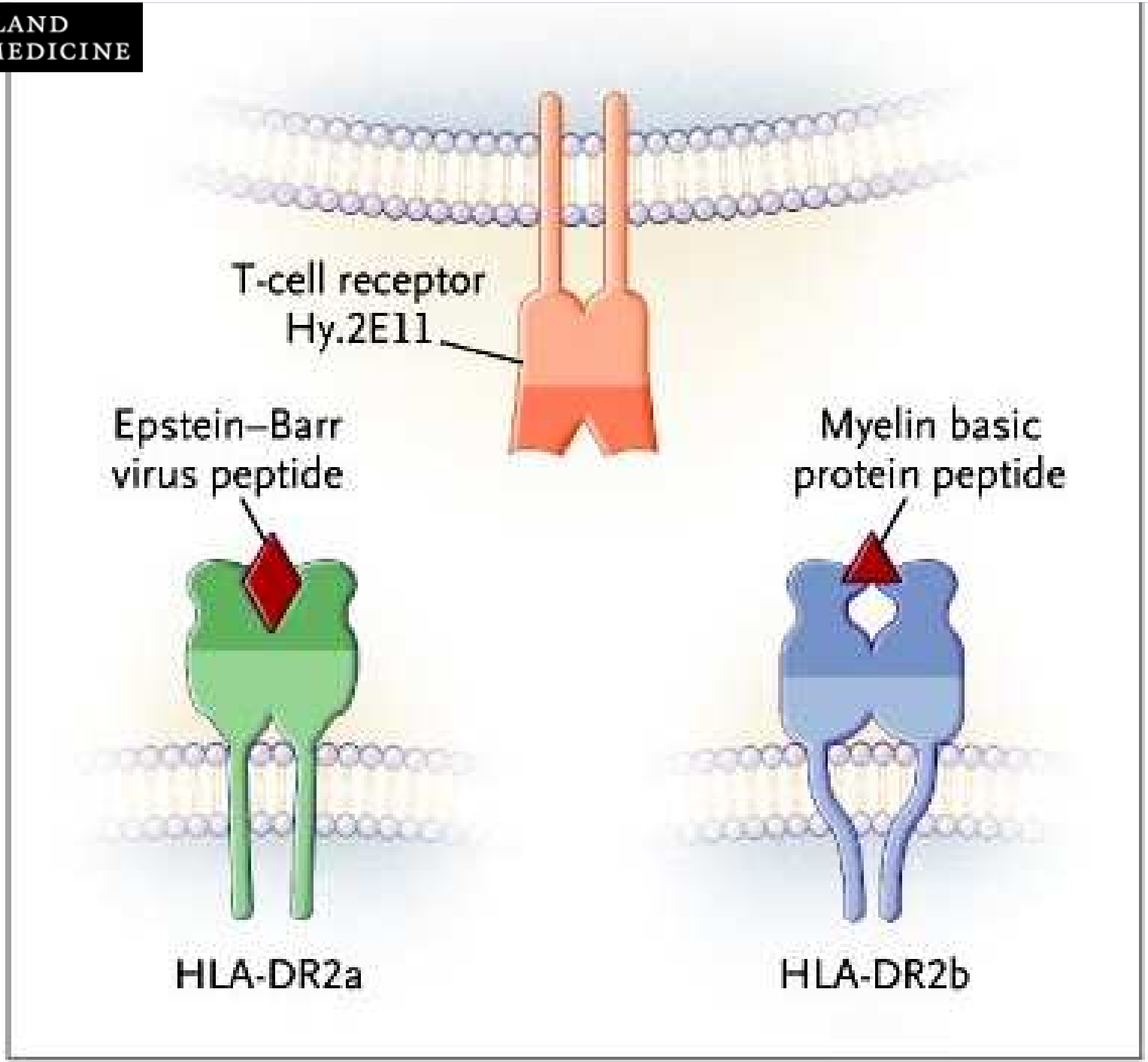
The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE



SEP et virus: l'EBV

- Lang isole un recepteur des cellules T d'un patient atteint de SEP, Hy2E11: il reconnaît le CMH lié à la MBP
- Le récepteur reconnaît également un peptide de l'EBV associé au HLA-DR2a et un autre peptide dérivé de la MBP associé au HLA-DR2b
- Toutes les cellules présentatrices de l'antigène des patients HLA-DR2 portent le HLA-DR2a et le HLA-DR2b

Les traitements

- Ils ont une activité relative surtout dans les formes progressives
- leur but: bloquer la réaction inflammatoire et diminuer le nombre de poussées
- pour les poussées: cortisone (solumédrol)
- traitement de fond: immunomodulateurs (interféron ß, acétate de glatiramène) ou immunosuppresseurs (méthotrexate, azothioprime, mitoxantrone)
- ils doivent être administrés le plus rapidemnt possible dès l'apparition des signes cliniques
- Plus ciblé: le Natalizumab (Tysabri) qui inhibe l'adhésion des lymphocytes au niveau de l'endothélium vasculaire

« Il n’existe pas d’anomalies biologiques ou neurophysiologiques ni de lésions décelables en imagerie médicale qui soient spécifiques de la SEP »

Professeur C. Sindic

Les critères de diagnostic de McDonald de 2001 revu en 2005

Ils sont basés sur l'IRM, les potentiels évoqués et l'analyse du LCR

Ils se focalisent sur la spécificité d'avantage que sur la sensibilité

Table 3. Diagnosis of Multiple Sclerosis in Disease with Progression from Onset

Original McDonald Criteria	2005 Revisions
1. Positive CSF *and* 2. Dissemination in *space* by MRI evidence of nine or more T2 brain lesions *or* Two or more cord lesions *or* Four to eight brain lesions and one cord lesion *or* Positive VEP with four to eight MRI lesions *or* Positive VEP with less than four brain lesions plus one cord lesion *and* 3. Dissemination in *time* by MRI *or* Continued progression for 1 year	1. One year of disease progression (retrospectively or prospectively determined) 2. *Plus* two of the following: a. Positive brain MRI (nine T2 lesions or four or more T2 lesions with positive VEP) b. Positive spinal cord MRI (two focal T2 lesions) c. Positive CSF* (isoelectric focusing evidence of oligoclonal IgG bands or increased IgG index, or both).

L’analyse du LCR dans la SEP (consensus de 2005)

- L’analyse du LCR est relativement normale dans la SEP:
  - leucocytes normaux ou faiblement augmentés
  leucocytes > 5/mm3: seulement 34% des SEP
  > 50/mm3: SEP très peu probable
  - légère altération de la barrière sang/LCR:
  faible augmentation de la protéinorachie
  > 1gr/l: SEP exclue
- L’analyse du LCR est indispensable dans la SEP parce qu’elle permet de démontrer l’existence d’une synthèse intrathécale d’IgG

La démonstration de l'existence d'une synthèse intrathécale d'immunoglobulines

- Elle nécessite la réalisation d'une ponction lombaire et d'un prélèvement de sang le même jour et la réalisation des analyses en parallèle sur ces deux prélèvements.

- Elle peut se faite sur base d'analyses dites

  - qualitatives: la mise en évidence de bandes oligoclonales spécifiques au LCR

  - quantitatives: basées sur le dosage des IgG et de l'albumine, l'utilisation de formules mathématiques et/ou l'interprétation des dosages à l'aide d'un logiciel .

La mise en évidence des Bandes oligoclonales: une électrophorèse en gel d'agarose haute résolution ne suffit pas !

Il faut :

- ramener les concentrations des IgG du LCR et du sérum à des concentrations identiques
- réaliser une migration dans un gradient de pH (3 à 10) sous un voltage élevé et un contrôle rigoureux de la température
- révéler les IgG par une technique spécifique et très sensible

Deux kits sur le marché:

- IgG-IEF d'Helena Bioscience
- Hygragel CSF Isofocusing de Sebia

La technique Sebia comporte différentes étapes semi-automatisées sur l'Hydrasys Fosusing System:

- préfocalisation pour établir le gradient de pH (migration des ampholines seules)
- dépôts des LCR et des sérums préalablement dilués afin d'obtenir la même concentration d'IgG (20mg/l) (Hydraplus)
- isofocalisation proprement dite : migration à 1000 V maximum pendant environ 45 minutes à température constante (20°C)
- immunofixation en présence d'anti-IgG liées à la peroxydase
- révélation des IgG à l'aide de TTF3
- lavage du gel dans le module de coloration

Comment interpréter les images observées?

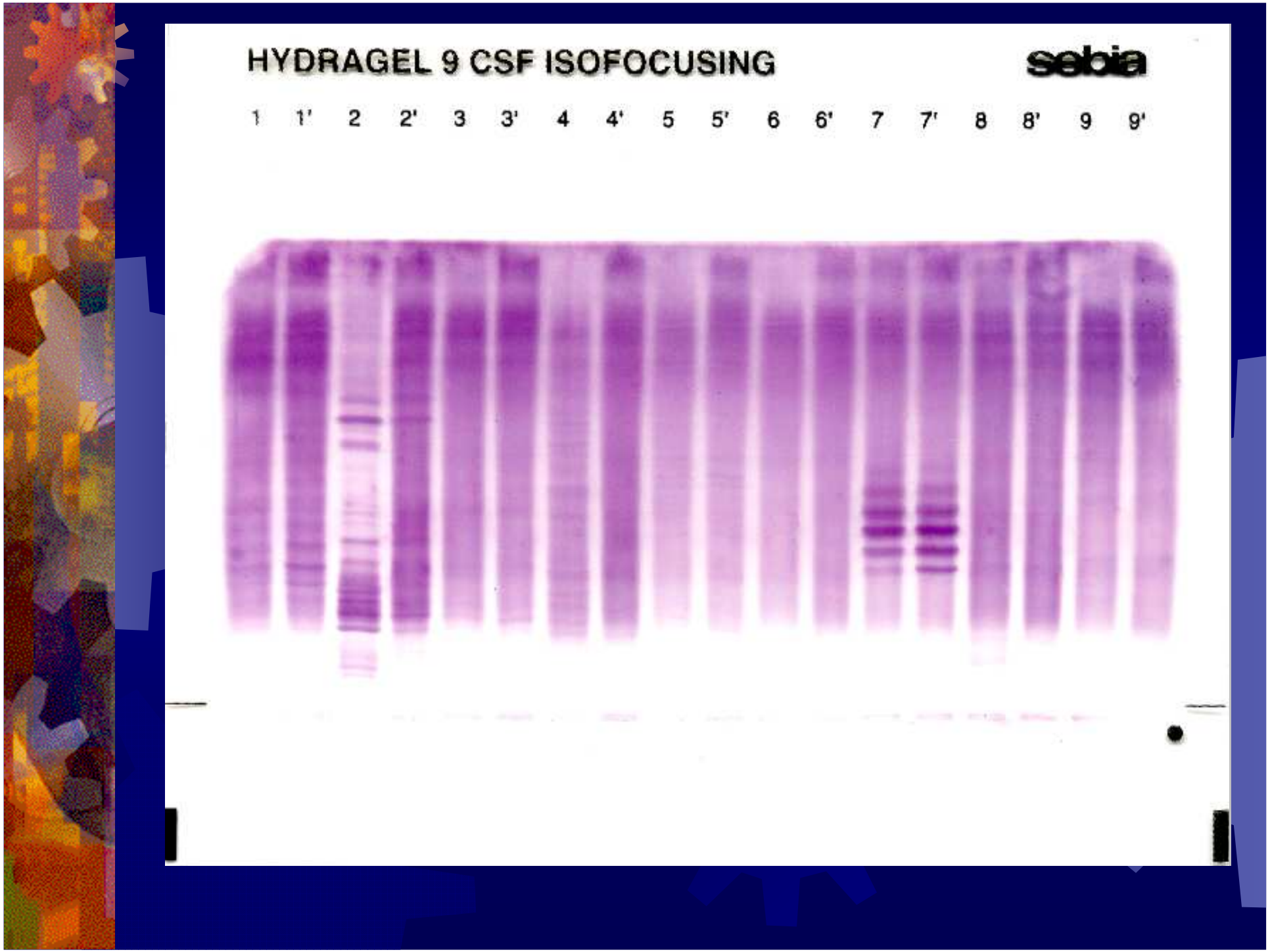
- la recherche est considérée comme négative:

- il n'y pas de bandes dans le LCR et le sérum
- le nombre de bandes est identique dans le LCR et le sérum (bandes en miroir): les bandes observées sont transsudées
- le nombre de bande est identique dans le LCR et le sérum mais ce dernier contient un composant monoclonal

  (les bandes ont alors un aspect caractéristique)

- la recherche est considérée comme positive :

- il y a des bandes dans le LCR et pas dans le sérum
- il y a des bandes dans le LCR et le sérum, mais le LCR présente en plus des bandes qui lui sont propres : certaines bandes sont transsudées, d'autres synthétisées au niveau du système nerveux central.


HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING
sebia
1 1' 2 2' 3 3' 4 4' 5 5' 6 6' 7 7' 8 8' 9 9'

La recherche des bandes oligoclonales à la portée de tous les laboratoires?

Oui, mais:

- technique nécessitant un équipement particulier, 3 heures de manipulation, du personnel entrainé à la lecture des gels:

  ! *Une bande peut faire la différence*

- il faudrait rechercher les bandes oligoclonales constituées par des chaînes légères (kappa), des IgM, des IgA

  ! *Une synthèse intrathécale d'IgM serait de mauvais pronostic*

Les BO sont présentes chez 95% des patients atteints de SEP mais également lors de:

Autres pathologies inflammatoire du SNC:

- maladie de Behçet, neurosarcoïdose, neurolupus (plus souvent bandes en miroir)
- atteinte paranéoplasique du SNC

Pathologies infectieuses

- encéphalite ou méningite virale :herpes, varicelle-zona, HIV, oreillon, rougeole…
- maladie de Lyme, syphillis, phases tardives des méningites purulentes
- méningite tuberculeuse
- affection parasitaire ou fongique
- panencéphalite subaïgue sclérosante (100% de positivité)

Pathologies tumorales :

- lymphome du SNC.

Les tests quantitatifs: le dosage des IgG

- Les IgG du LCR (<36 mg/l) sont d'origine plasmatique, elles augmentent en cas de:

- Synthèse accrue au niveau périphérique

- Altération de la barrière sang/LCR

- Synthèse intrathécale des immunoglobulines

les trois processus pouvant coexister

- Différentes formules permettent de faire la différence entre IgG transsudées et IgG synthétisées localement: Schuller, Tourtellote
- Le calcul le plus utile:

  index IgG ou index de Tibbling et Link
- L'interprétation la plus fiable: le diagramme de Reiber

L'index IgG

- L'intégrité de la barrière sg/LCR est estimée à partir de l'albumine du LCR (130-380 mg/l) essentiellement d'origine hépatique sur base de la formule:

  Qalbumine :

  albumine du LCR/ albumine du sérum (<0.0075)

  Qalbumine varie avec l'âge :

28.10-3	chez le nouveau-né
5.10-3	avant 40 ans
8.10-3	avant 60 ans
9.10-3	chez le senior

- La transsudation normale des IgG est estimée par la formule

  QIgG :IgG du LCR/ IgG du sérum (<0.0035)

- Une synthèse intrathécale est probable si

  index IgG = QIgG/Qalbumine >0.7

Les diagrammes de Reiber et de Fateh-Mogaham

- Reiber démontre

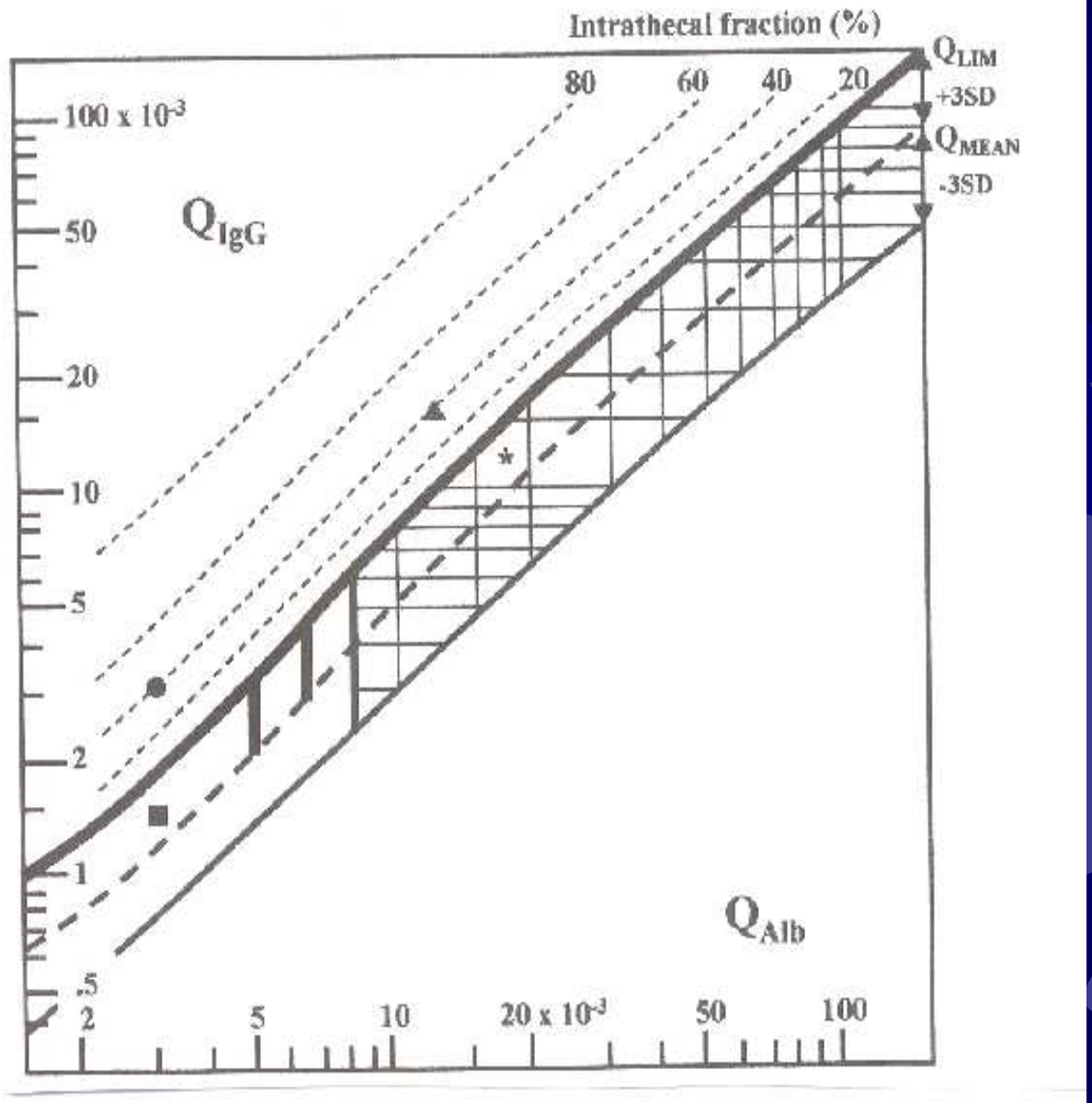
  - que la relation entre Qalbu et QIgG est hyper-bolique

  - il définit à partir d'un grand nombre d'observations la Qlim à parir de laquelle la probabilité d'une synthèse intrathécale est élevée

  - il élabore un diagramme permettant d'interpréter l'index IgG

- Une variante: le diagramme de Fateh-Moghadam, un diagramme comportant des zones correspondant à des probabilités variables de synthèse intrathécale et d'altération de la barrière sg/LCR

Le diagramme de Reiber



La Qlim qui délimite deux zones :

- **au dessus de la Qlim, existence d'une synthèse intrathécale :**

  l'importance de cette synthèse est estimée en % et suivant que le Qalbumine est supérieur ou inférieur à la limite correspondant à l'âge du patient, il y a ou pas altération de la barrière sang/LCR

- **en dessous de la Qlim, pas de synthèse intrathécale :**

  zone blanche: valeurs normales

  zone hachurée: simple transsudation des IgG sériques.

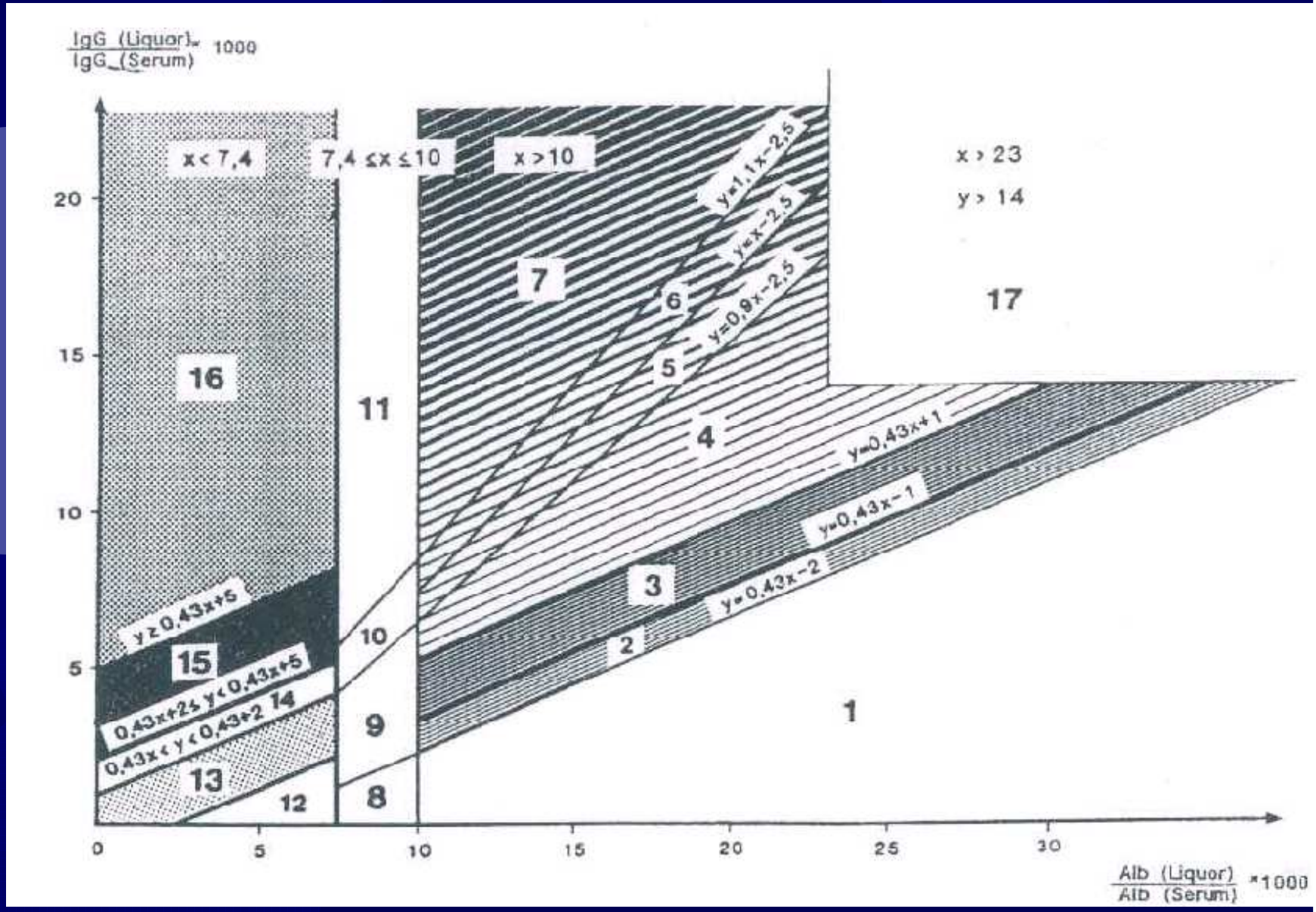
SEPP et Protis (Dade-Behring)

Pour optimaliser l'exploitation des résultats (notamment les variations physiologiques de la barrière avec l'âge) , on a créé des logiciels qui calculent l'index IgG, qui le positionnent sur les diagrammes et qui génèrent un commentaire interprétatif sur base des dosages et de l'âge du patient

Protis positionne les quotients sur le diagramme et génère différents commentaires :

- 1) impossible de détecter une synthèse d'IgG par analyse des quotients (exemple ■)
- 2) détection d'une synthèse intrathécale par analyse des quotients (exemple ● ; synthèse relative : 40%)
- 3) légère altération de la barrière, impossible de détecter une synthèse (exemple ✱)
- 4) suspicion d'une synthèse intrathécale
- 5) grave altération de la barrière, impossible de détecter une synthèse
- 6) légère altération avec détection d'une synthèse (exemple ▲: synthèse relative : 37%)
- 7) grave altération et détection d'une synthèse

Diagramme de Fateh-Moghadam et SEPP



Nom	: X	Prénom	: Y	Dossier	: 0408-20000
Prescripteur	:	Age	: 34 Ans	Sexe	: F
Naissance	: 16/01/1971	Prélvmt.	: 09/09/2004		

Edité le : 09/09/2004

PROFIL PROTEIQUE LCR

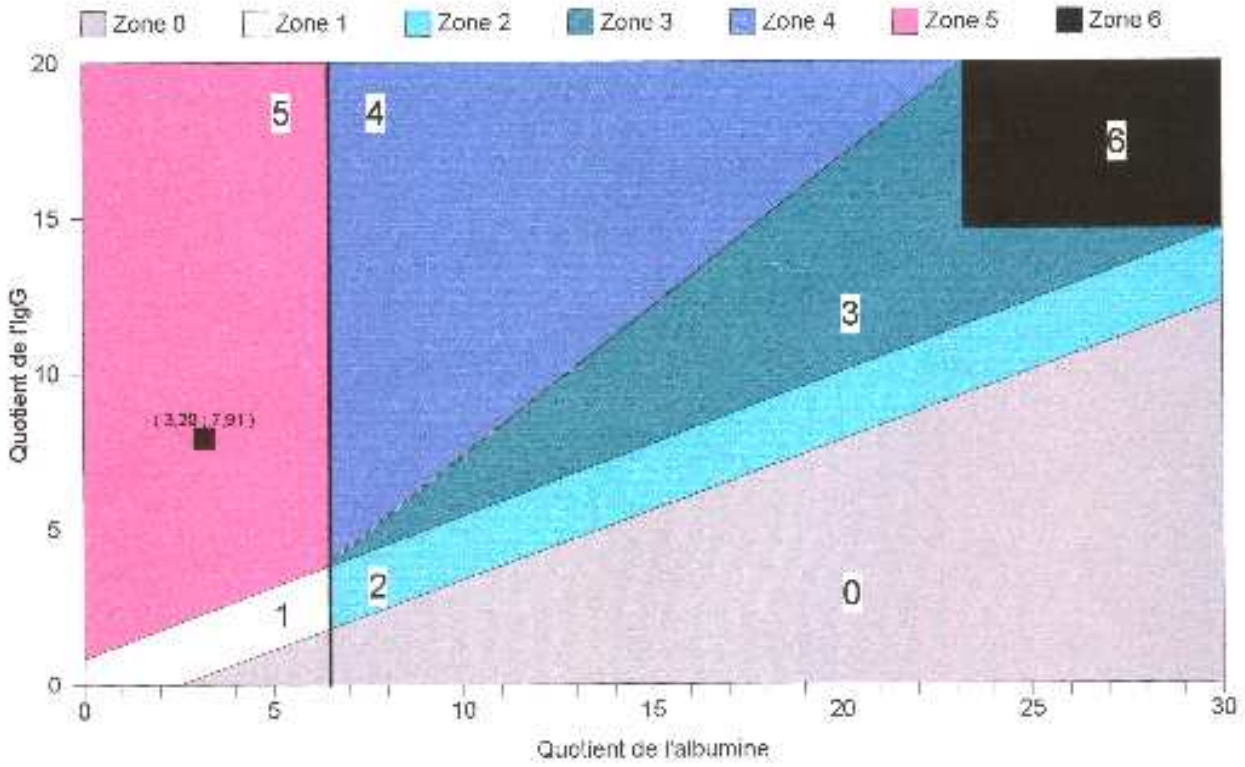


Diagramme de Reiber

Synthèse intrathécale d'IgG sans altération de la barrière.

zone 0 (grise) :	valeur peu probable : erreur méthodologique possible, à contrôler
zone 1 (blanche) :	zone des valeurs normales : pas d'anomalie décelable
zone 2 (turquoise) :	légère altération de la barrière hématoencéphalique
zone 3 (verte) :	importante altération de la barrière avec synthèse intrathécale possible
zone 4 (bleue) :	importante altération de la barrière avec synthèse intrathécale
zone 5 (rose) :	synthèse intrathécale sans altération de la barrière
zone 6 (noire) :	altération massive de la barrière

Les limites des tests quantitatifs

- Ils ne sont pas applicables chez l'enfant de moins d'un an et en cas de lésion de la colonne
- Ils exigent une très qualité analytique: les analyses doivent être réalisées en parallèle sur le sang et le LCR avec la même technique: l'organisation d'un contrôle interlaboratoire au niveau national est souhaitable
- Ils ne sont pas appliquables en cas de contamination sanguine
- Les logiciels donnent des interprétations différentes pour des dosages identiques

	PROTIS			SEPP		
Nombre de globules rouges	<30/mm3 (n: 225)	>30/mm3 (n :45)	Tous (n :270)	<30/mm3 (n :225)	>30/mm3 (n :45)	Tous (n :270)
Sensibilité	76	27	67	87	36	77
Spécificité	97	91	96	83	76	84
VPP	85	50	80	57	33	57
VPN	94	79	91	97	79	93

Plus que le commentaire généré par le logiciel, c'est la position de l'index qui compte!

- Il faut rendre le graphique au clinicien: le commentaire est peu fiable si l'index est proche d'une ligne du diagramme (le tableau ci-dessus est basé sur le commentaire et non l'emplacement de l'index)
- SEPP donne plus de faux résultats que Protis en présence d'une contamination sanguine
- La VPN de SEPP et donc sa sensibilité est beaucoup plus élevée que celle de Protis

Quel test réaliser ?

- Les techniques quantitatives ne sont pas équivalentes aux techniques qualitatives (critique des critères de Mc Donald, revision 2005)
- La recherche des bandes oligoclonales reste la méthode de référence et est particulièrement intéressante pour la prise en charge des syndromes cliniques isolés puisqu'elles prédisent une évolution rapide (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, septembre 2006)
- Les techniques quantitatives sont réalisables par tout laboratoire possédant un néphélomètre et elles permettent une orientation rapide du clinicien dans sa démarche diagnostique en attendant le résultat de l'électrofocalisation : il faut faire les deux!

Quelles nouveaux développement peut-on envisager au laboratoire ?

- Techniques qualitatives:

  la recherche des bandes oligoclonales de type IgM: leur présence prédirait le passage à une forme secondaire progressive

- Techniques quantitatives:

  la concentration des chaînes légères kappa (freelite) et le rapport kappa LCR/kappa sang serait aussi fiable que la recherche des BO

L’équipe:

- recherches des bandes oligoclonales: J.-P. Verlaine
- dosages quantitatifs et diagrammes:
J. Vanherque et F. Detroz

La gestion des résultats par le logiciel central Glims:
Docteur C. Nève

Les Cliniciens du Service Universitaire de Neurologie du CHR la Citadelle et le docteur A. Fumal