

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

le mercredi 24 juin 2009

par **Julie Chevalier**

née le 31 octobre 1980 à Rennes

Conformément aux dispositions du décret
du 23 janvier 2003, ce mémoire tient lieu de :

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**PLACE DE L'ISOÉLECTROFOCALISATION
DES IMMUNOGLOBULINES G DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN
ET DU LOGICIEL PROTIS® POUR LE DIAGNOSTIC
DE LA SCLÉROSE EN PLAQUE.**

Président : Monsieur Jean-Marie BARD,
Professeur de Biochimie - Pharmacie

Directeur de thèse : Madame Lucienne GUENET,
Maître de Conférence - Praticien Hospitalier de Biochimie – Médecine

Membres du jury : Madame Véronique DEBURGHRAEVE,
Praticien Attaché de Neurologie - Médecine
Monsieur André LE TREUT,
Professeur - Praticien Hospitalier de Biochimie - Médecine
Madame Martine ROPERT,
Praticien Hospitalier de Biochimie – Médecine

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
1. INTRODUCTION.....	9
2. PHYSIOLOGIE DU LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN (LCR) ET DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE (BHE).....	12
2.1. LE LCR.....	12
2.1.1. <i>Structure des méninges et localisation anatomique du LCR.</i>	12
2.1.2. <i>Composition du LCR.</i>	14
2.1.3. <i>Production du LCR.</i>	15
2.1.3.1. <i>Lieu de production.</i>	15
2.1.3.2. <i>Mécanismes de production.</i>	15
2.1.3.3. <i>Régulation de la production.</i>	16
2.1.4. <i>Circulation du LCR.</i>	17
2.1.5. <i>Rôle du LCR.</i>	18
2.1.6. <i>Technique de prélèvement du LCR.</i>	18
2.2. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE (BHE).	19
2.2.1. <i>Données anatomiques et morphologiques de la BHE.</i>	19
2.2.2. <i>Mécanismes de transport des molécules au niveau des différentes barrières.</i>	21
2.3. ELEMENTS DE NEURO-IMMUNOLOGIE.....	23
2.3.1. <i>Modifications de l'état immunitaire et protéique du SNC.</i>	23
2.3.2. <i>Généralités sur le processus de présentation des antigènes dans le SNC.</i>	24
2.3.3. <i>Mécanismes d'adhésion et de migration des cellules immunitaires dans le SNC.</i>	24
2.3.4. <i>Rôle des cytokines lors des réactions immunitaires.</i>	26
2.3.5. <i>Modèles expérimentaux pour l'étude des maladies neuro-immunologiques démyélinisantes.</i>	26
3. LA SCLEROSE EN PLAQUE (SEP).....	29
3.1. STRUCTURE ET FONCTIONS DE LA FIBRE MYELINISEE.....	29
3.1.1. <i>Données morphologiques.</i>	29
3.1.2. <i>Fonctions de la myéline du SNC.</i>	30
3.2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES.....	30
3.3. DEFINITION ANATOMOPATHOLOGIQUE DE LA SEP.	32
3.4. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SEP.....	33
3.5. ETIOPATHOGENIE DE LA SEP.....	35
3.6. EVOLUTION DE LA SEP.....	36
3.6.1. <i>Les phases cliniques de poussées et de progression.</i>	36
3.6.2. <i>Les types évolutifs de la SEP.</i>	36
3.6.3. <i>L'évolution d'ensemble de la SEP.</i>	37
3.7. DIAGNOSTIC POSITIF DE LA SEP.	38
3.7.1. <i>L'IRM cérébrale.</i>	39
3.7.2. <i>L'analyse biologique du LCR.</i>	39
3.7.3. <i>Les critères diagnostiques de la SEP.</i>	40
3.8. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DE LA SEP.	41
3.9. LE RESEAU SEP BRETAGNE.....	43

4. ANALYSE BIOCHIMIQUE DU LCR DANS LE CADRE D'UNE RECHERCHE DE SYNTHÈSE INTRATHÉCALE POUR LE DIAGNOSTIC DE SEP.	45
4.1. INTRODUCTION.....	45
4.2. EXPLORATION BIOCHIMIQUE QUANTITATIVE DU LCR.....	45
4.2.1. Dosage de l'albumine.....	45
4.2.1.1. Les différentes techniques de dosage et les valeurs normales.....	45
4.2.1.2. Evaluation et signification du rapport albumine : QAlb.....	46
4.2.2. Dosage des IgG, M et A.....	47
4.2.2.1. Les différentes techniques de dosage et les valeurs usuelles.....	47
4.2.2.2. Intérêt de l'analyse biologique des IgM et des IgA dans le LCR.....	47
4.2.3. Dosage des chaînes légères (CL) libres d'Igs.....	48
4.2.4. Les différentes formules de détection de synthèse intrathécale.....	49
4.2.4.1. Index IgG ou index de Link.....	49
4.2.4.2. Le log index.....	50
4.2.4.3. Formule de Tourtelotte.....	50
4.2.4.4. Formule de Schuller.....	51
4.2.4.5. Formule et diagramme de Reiber.....	51
4.2.4.6. Formule de Blennow.....	52
4.2.4.7. Performances des formules.....	53
4.2.5. Les logiciels d'aide au diagnostic Protis® et SEPP®.....	54
4.3. EXPLORATION BIOCHIMIQUE QUALITATIVE DU LCR.....	56
4.3.1. Les électrophorèses conventionnelles.....	56
4.3.1.1. Principe de l'électrophorèse et réalisation.....	56
4.3.1.2. Interprétation des électrophorèses.....	57
4.3.2. Les techniques d'immunofixation.....	57
4.3.2.1. Principe de l'immunofixation.....	57
4.3.2.2. Interprétation des immunofixations.....	58
4.3.3. Les techniques d'isoélectrofocalisation.....	59
4.3.3.1. Principe de l'isoélectrofocalisation.....	59
4.3.3.2. Les supports utilisés.....	60
4.3.3.3. Techniques de révélation des protéines.....	60
4.3.3.4. Interprétations des isoélectrofocalisations.....	60
4.3.3.5. Recommandations sur la technique d'isoélectrofocalisation pour la recherche de synthèse intrathécale selon le consensus de 2005.....	62
5. MATERIELS ET METHODES.	65
5.1. LES PATIENTS.....	65
5.1.1. Description du groupe d'étude.....	65
5.1.2. Les prélèvements.....	67
5.1.3. Classification clinique des patients.....	67
5.2. ANALYSES EFFECTUEES AU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE DU CHU DE PONTCHAILLOU.....	68
5.2.1. Les dosages.....	68
5.2.1.1. Dosages des protéines sériques totales.....	68
5.2.1.2. Dosages des protéines totales du LCR.....	69
5.2.1.3. Dosage de l'albumine sérique.....	70
5.2.1.4. Dosage des IgG sériques, de l'albumine et des IgG du LCR.....	70
5.2.1.5. Expression des analyses quantitatives au laboratoire.....	72
5.2.2. Les analyses qualitatives.....	72
5.2.2.1. Immunofixation HYDRAGEL 6 CSF SEBIA®.....	72
5.2.2.2. Isoélectrofocalisation HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING SEBIA®.....	75

6. RESULTATS	80
6.1. RESULTATS CLINIQUES	80
6.2. RESULTATS DES DOSAGES	81
6.2.1. <i>Protéïnorachie</i>	81
6.2.2. <i>Albumine</i>	81
6.2.2.1. <i>Albuminémie</i>	81
6.2.2.2. <i>Albuminorachie</i>	81
6.2.2.3. <i>Rapport QAlb</i>	82
6.2.3. <i>IgG</i>	82
6.2.3.1. <i>IgG sériques</i>	82
6.2.3.2. <i>IgG du LCR</i>	82
6.3. RESULTATS DES INDEX DE LINK ET DE TOURTELOTTE	82
6.3.1. <i>Utilisation du logiciel d'aide au diagnostic Protis®</i>	82
6.3.2. <i>Rappels des méthodes d'évaluation des tests biologiques à visée diagnostique</i>	84
6.3.3. <i>Analyse de l'index de Link</i>	85
6.3.3.1. <i>Répartition des index de Link en fonction du contexte clinique</i>	85
6.3.3.2. <i>Répartition des index de Link en fonction de la BHE</i>	85
6.3.3.3. <i>Performances de l'index de Link</i>	86
6.3.4. <i>Analyse de l'indice de Tourtelotte</i>	87
6.3.4.1. <i>Répartition de l'indice de Tourtelotte en fonction du contexte clinique</i>	87
6.3.4.2. <i>Répartition de l'indice de Tourtelotte en fonction de la BHE</i>	87
6.3.4.3. <i>Performances de l'indice de Tourtelotte</i>	87
6.4. RESULTATS DES ANALYSES QUALITATIVES	88
6.4.1. <i>Résultats de l'isoélectrofocalisation sur HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING Sébia®</i>	88
6.4.1.1. <i>Classification des résultats obtenus</i>	88
6.4.1.2. <i>Analyse des profils électrophorétiques et des index de Link et de Tourtelotte</i>	89
6.4.1.3. <i>Répartition des profils électrophorétiques en fonction du contexte clinique</i>	90
6.4.2. <i>Comparaison des deux techniques d'analyses qualitatives</i>	91
6.4.2.1. <i>Estimation des performances des techniques qualitatives</i>	91
6.4.2.2. <i>Calcul des coefficients de concordance Kappa</i>	93
6.4.2.3. <i>Analyse des discordances entre les deux techniques électrophorétiques</i>	95
7. DISCUSSION	100
7.1. ASPECTS TECHNIQUES DE L'ISOELECTROFOCALISATION (IEF) AVEC LE KIT "HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING" DE SEBIA®	100
7.2. PERFORMANCES DU KIT D'IEF DANS LA SEP ET COMPARAISON PAR RAPPORT A L'ANCIENNE TECHNIQUE D'IFIX	101
7.2.1. <i>Analyse de nos résultats</i>	102
7.2.2. <i>Comparaison par rapport à la littérature</i>	106
7.3. AUTRES PATHOLOGIES ASSOCIEES A UNE SYNTHÈSE INTRATHECALE D'Igs	108
7.4. ABSENCE DE SYNTHÈSE INTRATHECALE D'Igs DANS LES SEP	110
7.5. SEP PEDIATRIQUES	113
8. CONCLUSION	117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	121

LISTE DES FIGURES , GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1 : Organisation des méninges.....	13
Figure 2 : Le système ventriculaire et ses relations avec l'espace sous arachnoïdien.....	14
Figure 3 : Mécanisme de production du LCR dans la cellule choroïde.....	17
Figure 4 : Technique de prélèvement du LCR par ponction lombaire.....	19
Figure 5 : Représentation schématique de la BHE.....	21
Figure 6 : Différents types d'échange intervenant à travers les cellules endothéliales du SNC.....	23
Figure 7 : Mécanismes d'adhésion et de reconnaissance cellulaire au niveau du SNC.....	26
Figure 8 : Représentation schématique de la gaine de myéline et de son association avec l'axone et la cellule gliale.....	30
Figure 9 : Taux d'incidence standardisée pour 100 000 personnes en France.....	32
Figure 10 : Classification des types évolutifs de la SEP.....	38
Figure 11 : Brochure du réseau SEP Bretagne.....	44
Figure 12 : Représentation logarithmique de la relation hyperbolique entre le rapport QIgG et le rapport QAlb selon la formule de Reiber.....	53
Figure 13 : Représentation schématique du diagramme de Fateh-Moghadam.....	56
Figure 14 : Représentation des 5 types de profils observés dans le LCR et le sérum.....	62
Figure 15 : Représentation d'un appareil à néphélométrie à source laser.....	72
Figure 16 : Mode opératoire de la technique d'immunofixation du LCR sur Hydrasis de Sébia®.....	75
Figure 17 : Mode opératoire de l'application de l'antisérum pour la technique d'isoélectrofocalisation du LCR de Sébia®.....	78
Figure 18 : Exemple de compte rendu généré par le logiciel Protis® pour l'analyse biochimique quantitative des couples LCR/sérum.....	84
Figure 19 : Les trois principaux profils électrophorétiques des IgG du LCR et du sérum par IEF.....	89
Figure 20 : Profils électrophorétiques des IgG du couple LCR/sérum de Mr N.D. obtenus par les techniques d'IFIX et d'IEF.....	97
Figure 21 : Profils électrophorétiques des IgG du couple LCR/sérum de Mme G.M. obtenus par les techniques d'IFIX et d'IEF.....	97
Figure 22 : Profils électrophorétiques des IgG du couple LCR/sérum de Mme D.Y. obtenus par les techniques d'IFIX et d'IEF.....	98
Figure 23 : Profils électrophorétiques des IgG du couple LCR/sérum de Mme R.M. obtenus par les techniques d'IFIX et d'IEF.....	98
Figure 24 : Profils électrophorétiques des IgG de deux couples LCR/sérum de Mr G.Y. et de Mr P.Y. obtenus par les techniques d'IFIX et d'IEF.....	99
Graphique 1 : Représentation évaluant l'activité du laboratoire de biochimie du CHU de Pontchaillou pour la recherche de synthèse intrathécale d'IgG dans le LCR du mois d'avril 2008 à fin décembre 2008.....	66
Graphique 2 : Répartition des patients (N = 432) selon les différentes cliniques.....	81

<u>Tableau 1</u> : Caractéristiques physico-chimiques comparées du plasma et du LCR.....	15
<u>Tableau 2</u> : Critères diagnostiques de SEP selon Mac Donald <i>et al</i>	41
<u>Tableau 3</u> : Causes les plus fréquentes d'apparition de bandes oligoclonales dans le LCR....	42
<u>Tableau 4</u> : Valeurs de référence des Igs sériques en fonction de l'âge.....	48
<u>Tableau 5</u> : Répartition du nombre de demandes de recherche de synthèse intrathécale d'IgG dans le LCR selon les services cliniques.....	67
<u>Tableau 6</u> : Procédure de dilution du LCR selon la concentration en IgG pour la technique d'IFIX.....	74
<u>Tableau 7</u> : Procédure de dilution du LCR selon la concentration en IgG pour la technique d'IEF.....	77
<u>Tableau 8</u> : Procédure de dilution du sérum selon la concentration en IgG du LCR pour la technique d'IEF.....	77
<u>Tableau 9</u> : Répartition des résultats possibles pour l'étude des performances d'un test biologique.....	85
<u>Tableau 10</u> : Répartition clinique des patients atteints ou non d'une altération de la BHE...	87
<u>Tableau 11</u> : Répartition des résultats de l'index de Link en fonction de la SEP.....	87
<u>Tableau 12</u> : Répartition des résultats de l'indice de Tourtelotte en fonction de la SEP.....	89
<u>Tableau 13</u> : Répartition des valeurs des indices de Link et de Tourtelotte en fonction des différents profils électrophorétiques et de la BHE.....	90
<u>Tableau 14</u> : Répartition des valeurs des index de Link et de Tourtelotte en fonction de la présence ou l'absence de synthèse intrathécale détectée par IEF.....	90
<u>Tableau 15</u> : Répartition des différents profils électrophorétiques d'IEF en fonction du diagnostic clinique.....	91
<u>Tableau 16</u> : Répartition des différents profils électrophorétiques obtenus par IEF et par IFIX en fonction des catégories cliniques.....	92
<u>Tableau 17</u> : Répartition des différents profils électrophorétiques obtenus par IEF et par IFIX en fonction du diagnostic de SEP.....	93
<u>Tableau 18</u> : Exemple de distribution des résultats pour le calcul du coefficient de concordance Kappa.....	94
<u>Tableau 19</u> : Répartition des résultats pour le calcul des concordances Kappa de l'IFIX et de l'IEF pour le diagnostic de SEP et pour la détection d'une synthèse intrathécale.....	95
<u>Tableau 20</u> : Répartition des résultats pour le calcul des concordances Kappa de l'IFIX et de l'IEF pour le diagnostic de "SEP + PI".....	96
<u>Tableau 21</u> : Performances des techniques électrophorétiques et des index de Link et de Tourtelotte pour le diagnostic de SEP.....	103
<u>Tableau 22</u> : Performances des index de Link et de Tourtelotte (Tourt.) en fonction de la détection d'une synthèse intrathécale par IEF et en fonction du diagnostic de SEP.....	105

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : acide aminé
AC : anhydrase carbonique
Ac : anticorps
ADEM : encéphalomyélite aiguë disséminée (Acute Disseminated EncephaloMyelitis)
Ag : antigène
AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique
ATP : adénosine tri-phosphate
BHE : barrière hémato-encéphalique
CH : Centre Hospitalier
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CL : chaîne légère
Cl⁻ : ion chlorure
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CO₂ : dioxyde de carbone
EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EBV : Epstein Barr virus
H₂CO₃ : acide carbonique
HCO₃⁻ : ion bicarbonate
HHV6 : human herpes virus 6
HIV : human immunodeficiency virus
HLA : Human Leukocyte Antigen
HTLV1 : human T cell leukemia virus type 1
IEF : isoélectrofocalisation
IFIX : immunofixation
Igs : immunoglobulines
IL : interleukine
INF γ : interféron γ
IRM : imagerie par résonance magnétique
K⁺ : ion potassium
LCR : liquide céphalo-rachidien
MAG : myelin-associated glycoprotein
MBP : protéine basique de la myéline (myelin basic protein)
MOG : myelin oligodendrocyte glycoprotein
Na⁺ : ion sodium
NORB : névrite optique rétrobulbaire
p : prévalence
PI : pathologie inflammatoire du SNC et du système nerveux périphérique hors SEP
PLP : protéine protéolipidique
PM : poids moléculaire
PNI : pathologie non inflammatoire du système nerveux
QA1b : rapport albumine
QIgG : rapport IgG
Se : sensibilité
SEP : sclérose en plaque
SNC : système nerveux central
Sp : spécificité
TGF β : transforming growth factor β
TNF α : tumor necrosis factor α
VPN : valeur prédictive négative
VPP : valeur prédictive positive

1. INTRODUCTION

1. INTRODUCTION.

La sclérose en plaque (SEP) est la pathologie neurologique chronique démyélinisante la plus fréquente de l'adulte jeune. Le diagnostic peut s'avérer difficile, or une prise en charge rapide des patients est nécessaire afin de retarder au mieux l'apparition du handicap neurologique irréversible. Le diagnostic repose sur des critères cliniques, radiologiques par imagerie par résonance magnétique (IRM) et biologiques par la mise en évidence d'une synthèse intrathécale. En effet, la SEP est caractérisée dans 95% des cas par la présence de bandes oligoclonales de type IgG dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et non retrouvées dans le sérum.

L'analyse du LCR est donc essentielle pour le diagnostic de la maladie et elle constitue un examen de choix selon les critères diagnostiques de Mac Donald *et al.* En 2005, une conférence de consensus a élaboré 12 recommandations pour cet examen biologique et la technique de référence pour la recherche de synthèse intrathécale est l'isoélectrofocalisation (IEF) couplée à une technique d'immunotransfert ou d'immunofixation. Cette méthode a été récemment commercialisée par le laboratoire Sébia® sur l'appareil semi-automatique Hydrasis Focusing sous forme de kit (HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING) et elle a été mise en place au laboratoire de biochimie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Pontchaillou en avril 2008 pour remplacer la technique d'immunofixation sensibilisée (IFIX) (HYDRAGEL 6 CSF de Sébia®).

Ce travail a pour but, dans un premier temps, d'évaluer au sein du laboratoire la technique d'isoélectrofocalisation pour la recherche de synthèse intrathécale d'IgG dans le cadre du diagnostic de SEP ou d'autres pathologies neurologiques, inflammatoires ou non et, de la comparer à la méthode d'immunofixation sensibilisée. Cette évaluation a été pratiquée sur 383 couples LCR/sérum dont les prélèvements ont été réalisés entre le mois d'avril 2008 et le mois de décembre 2008. L'étude comparative des deux méthodes électrophorétiques (IEF et IFIX) a été effectuée sur 62 couples LCR/sérum.

Un 2^{ème} aspect de notre étude a consisté à déterminer l'apport du logiciel d'aide au diagnostic Protis® pour le diagnostic de SEP. Cet outil disponible au laboratoire, mais non exploité jusqu'à présent, permet en effet une interprétation plus aisée des résultats quantitatifs pour le biologiste et le clinicien grâce au diagramme de Reiber.

Pour cela, l'ensemble de nos résultats qualitatifs a été systématiquement corrélé aux dosages de l'albumine et des IgG dans le LCR et dans le sérum ainsi qu'aux calculs des index de Link et de Tourtelotte par l'intermédiaire du logiciel. Pour apprécier la pertinence de ces différentes analyses, ces données ont été par la suite confrontées aux diagnostics cliniques établis par les différentes équipes médicales.

**2. PHYSIOLOGIE DU
LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN (LCR)
ET DE LA BARRIERE
HEMATO-ENCEPHALIQUE (BHE).**

2. PHYSIOLOGIE DU LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN (LCR) ET DE LA BARRIÈRE HEMATO-ENCEPHALIQUE (BHE).

2.1. Le LCR. (1- 4)

2.1.1. Structure des méninges et localisation anatomique du LCR.

Le système nerveux central (SNC) ou névraxe est constitué de l'encéphale et de la moelle épinière. L'encéphale est entièrement entouré par les os du crâne, et la moelle épinière par la colonne vertébrale. Ces deux structures sont protégées des traumatismes extérieurs et des modifications du milieu interne par la BHE et les méninges qui contiennent le LCR.

Les méninges englobent le système nerveux central (SNC) et elles sont constituées de trois feuillets qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur, la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère (Figure 1).

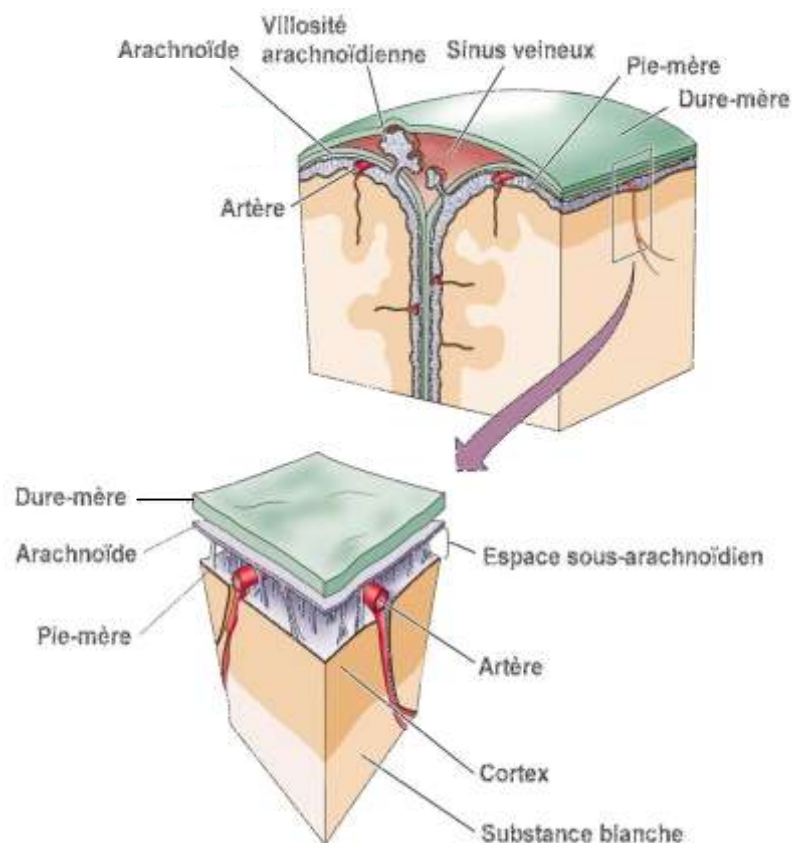


Figure 1 : Organisation des méninges (Extrait de <http://www.physiologie.staps.univ-mrs.fr>)

- la dure-mère est une membrane fibreuse et rigide qui adhère à la boîte crânienne pour protéger le cerveau et la moelle épinière. Au niveau du canal vertébral, la dure-mère est séparée de la colonne vertébrale par l'espace péri-dural et elle s'arrête en regard de la 2^{ème} vertèbre sacrée,
- L'arachnoïde est une fine enveloppe molle et avasculaire. Elle est constituée d'une couche cellulaire continue présentant de très nombreuses jonctions serrées,
- La pie-mère, très vascularisée, forme l'enveloppe des méninges la plus profonde. Elle est constituée de cellules aplaties pourvues de longs prolongements et adhère à la surface du névraxe. C'est entre la pie-mère et l'arachnoïde que se trouve le LCR, soit dans l'espace sous-arachnoïdien. (Figure 2). Cet espace est traversé par des trabéculations ou travées arachnoïdiennes qui attachent la pie-mère à la face interne de la membrane de l'arachnoïde (Figure 1).

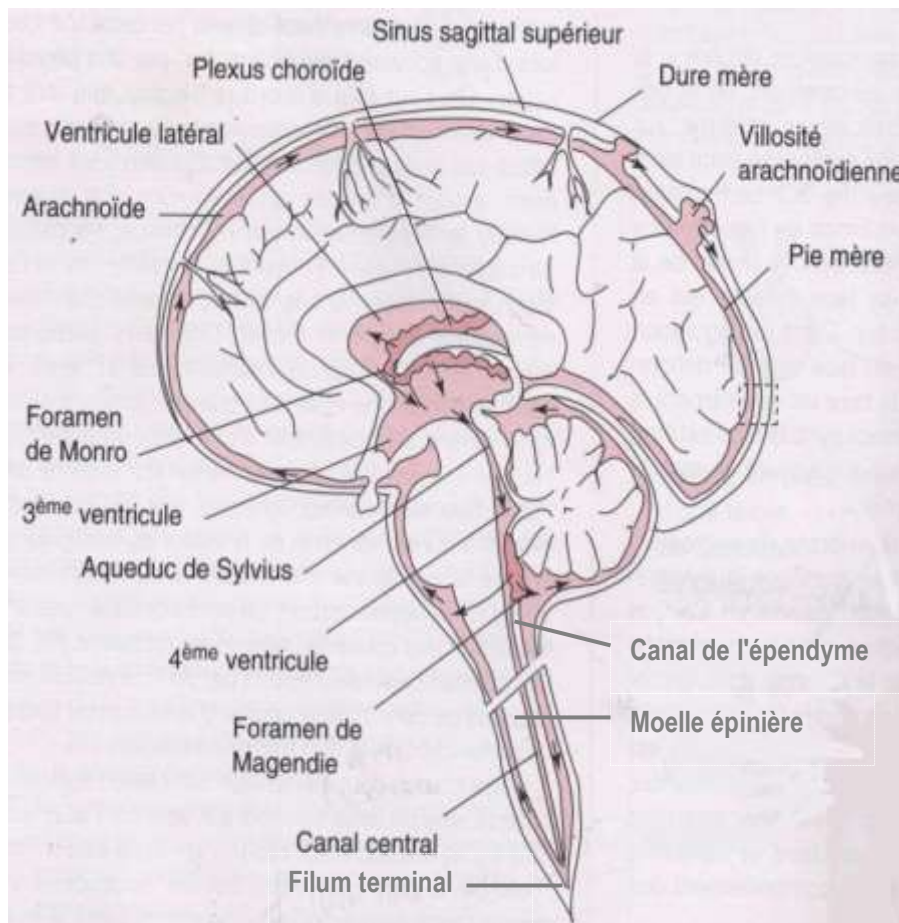


Figure 2 : Le système ventriculaire cérébral et ses relations avec l'espace sous arachnoïdien (La circulation du LCR est indiquée par les flèches) (2).

La moelle épinière se termine au niveau de la jonction entre la 1^{ère} et la 2^{ème} vertèbre lombaire. Elle est rattachée aux vertèbres par une structure de pie-mère modifiée, le filum terminal. L'espace situé sous la moelle épinière, contient du LCR et constitue une zone de sécurité pour la ponction lombaire.

Au niveau du SNC, le LCR remplit les ventricules latéraux, les 3^{ème} et 4^{ème} ventricules, le canal de l'épendyme et l'espace sous arachnoïdien. (Figure 2).

2.1.2. Composition du LCR.

Le LCR est un liquide limpide et incolore de pH 7,32 environ. A l'état physiologique, la cellularité est pauvre (3 à 5 lymphocytes par cm³). Le LCR présente une faible concentration protéique (~ 0,2 g/L) et la glycorachie correspond approximativement au 2/3 de la glycémie. Le tableau 1 précise certaines caractéristiques physico-chimiques du LCR et permet de les comparer à celles du plasma.

	Plasma	LCR
Na⁺	140 mmol/L	145 mmol/L
K⁺	4,0 mmol/L	3,0 mmol/L
Ca⁺⁺	2,30 mmol/L	1,14 mmol/L
Cl⁻	100 mmol/L	120 mmol/L
HCO₃⁻	26 mmol/L	22 mmol/L
pH	7,40	7,30
P CO₂	40 mm Hg	50 mm Hg
Protéines	72,0 g/L	0,23 g/L
Glucose	5,0 mmol/L	3,0 mmol/L

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques comparées du plasma et du LCR.

La stabilité de la composition du LCR permet de maintenir la composition du milieu extracellulaire des neurones et des cellules gliales.

2.1.3. Production du LCR.

Le volume total de LCR chez l'homme est de 100 à 150 cm³. Sa vitesse de formation est de 20 cm³ à l'heure, soit environ 500 cm³ par 24h. La pression normale est de 10 cm d'eau et une pression supérieure à 15 cm d'eau témoigne d'une hypertension intracrânienne.

2.1.3.1. Lieu de production.

La formation du LCR s'effectue essentiellement au niveau des plexus choroïdes, structures très vascularisées qui appartiennent aux ventricules cérébraux (ventricules latéraux et 4^{ème} ventricule) (Figure 2). Il est également produit, en plus faible proportion, dans les vaisseaux intraparenchymateux.

Les plexus choroïdes sont une différenciation du système pie-mère/capillaire. Ils forment d'épais cordons formés de villosités vasculaires logées dans un stroma conjonctif lâche. Ils produisent le LCR à partir du plasma par des mécanismes de filtration et de sécrétion.

Le LCR quitte le système ventriculaire par les espaces périvasculaires de Virchow-Robin pour rejoindre l'espace sous-arachnoïdien selon un flux pulsatile synchrone des battements artériels cérébraux (Figure 2).

2.1.3.2. Mécanismes de production.

Le moteur principal de la sécrétion du LCR est une pompe Na/K ATP dépendante qui intervient dans le transfert actif du sodium (Na⁺) du sang vers le LCR. La vitesse d'entrée du Na⁺ au pôle basal de la cellule est le facteur limitant le débit de la pompe.

La formation du LCR s'effectue de la manière suivante (Figure 3): le sodium (Na⁺) est tout d'abord échangé passivement suivant un gradient électrochimique au pôle basal de la cellule (TP1), puis il est rejeté de manière active par la pompe Na/K dans le LCR (pompe P1) tandis que les ions potassium (K⁺) sont réabsorbés dans la cellule choroïde. Le dioxyde de carbone (CO₂) joue également un rôle important au niveau des mécanismes de production du LCR. En effet, après diffusion cellulaire au niveau du pôle basal, il est hydraté pour former de l'acide carbonique (H₂CO₃). Ce dernier est scindé par une anhydrase carbonique (AC) pour produire des bicarbonates (HCO₃⁻) qui seront rejetés dans le LCR avec des ions chlorures (Cl⁻) par un mécanisme de transport actif (pompe P2). Cette action amène simultanément à l'échange d'un proton H⁺ contre du Na⁺ (TP1).

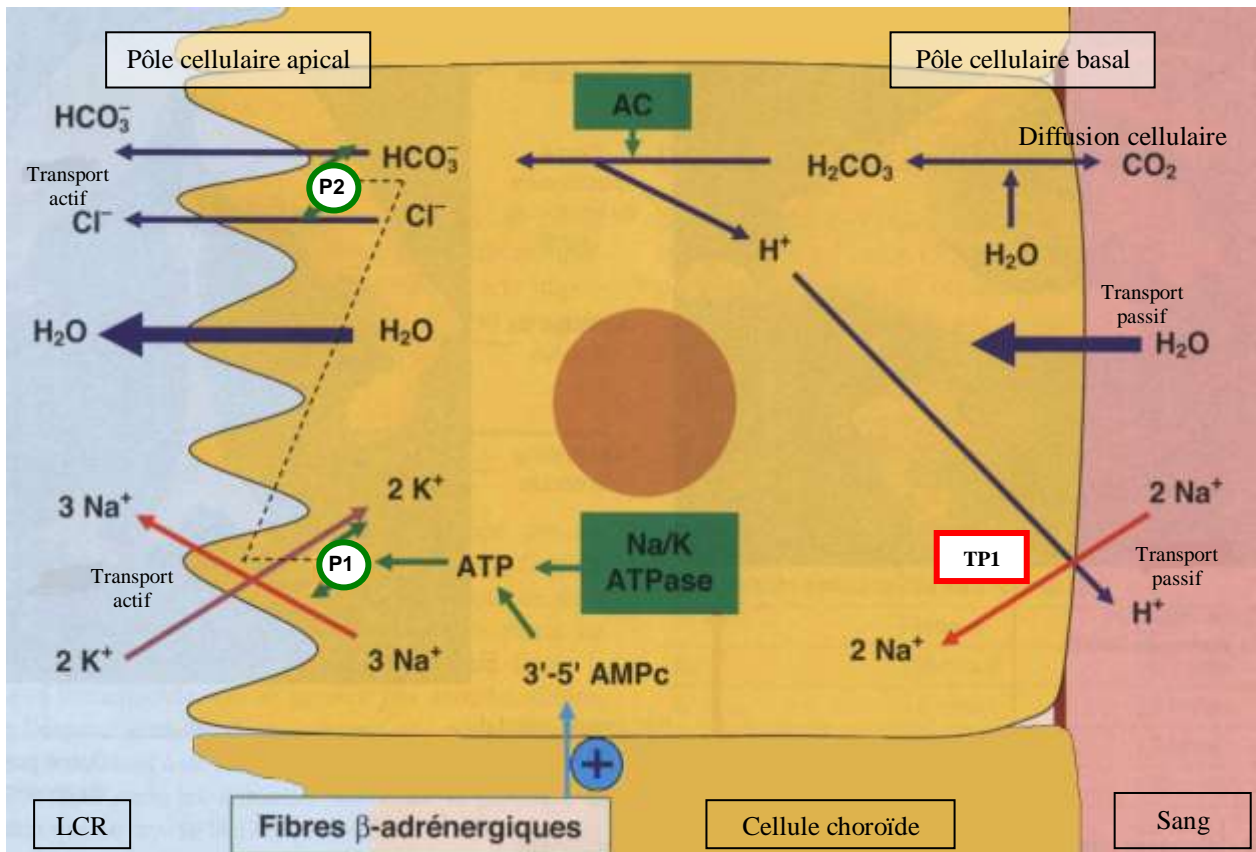


Figure 3 : Mécanisme de production du LCR dans la cellule choroïde (1).

La cellule choroïde rejette donc beaucoup d'ions au pôle apical le rendant très hypertonique ce qui attire l'eau vers le LCR qui emprunte de façon passive des aquaporines suivant un gradient osmotique.

En résumé, les plexus choroïdes secrètent un mélange de Na^+ , de Cl^- et de HCO_3^- , ce qui entraîne l'eau dans le LCR. D'autre part, ils réabsorbent du K^+ du LCR vers la cellule choroïde.

2.1.3.3. Régulation de la production.

Bien que la régulation de sécrétion du LCR soit encore mal comprise, la notion de stimulation du plexus choroïde par des fibres cholinergiques et adrénergiques est connue. (Figure 3). Cette action permet une élévation du taux de $3'-5'$ AMPc dans les cellules des plexus choroïdes, ce qui active la pompe à Na^+ , et donc augmente la sécrétion du LCR.

Les plexus choroïdes sont également impliqués dans la régulation de la composition de LCR, car ils forment une barrière efficace contre le passage passif des anions dans les 2 sens grâce à l'existence d'une pompe à anions (P2). Cette pompe se situe du côté apical de la cellule et son fonctionnement est couplé à celui de la pompe Na/K (P1). Cette faible perméabilité aux anions est capitale pour la régulation du pH du LCR.

En effet, les variations des bicarbonates (HCO_3^-) dans le sang ne sont pas suivies immédiatement de variations dans le LCR, ce qui protège le cerveau de variations de pH au cours des acidoses et alcaloses métaboliques aiguës. A l'inverse, le CO_2 passant très facilement la barrière, les acidoses et alcaloses respiratoires retentissent rapidement sur le pH du LCR, ce qui, à l'état normal, contribue à stimuler les centres respiratoires dans le sens d'une compensation.

2.1.4. Circulation du LCR.

Le LCR, secrété et régulé sur le plan métabolique par les plexus choroïdes, subit une circulation passive et lente, du lieu de production à son lieu d'élimination, avec un débit de $20 \text{ cm}^3/\text{h}$. Il est donc renouvelé trois fois par jour pour un volume total de 150 cm^3 .

Le LCR quitte les ventricules latéraux par les trous de Monro pour rejoindre le 3^{ème} ventricule. Il gagne par la suite le 4^{ème} ventricule en passant par l'aqueduc de Sylvius et il est réabsorbé par le système veineux, principalement dans le sinus veineux du cerveau à travers les villosités arachnoïdiennes. Il pénètre alors dans les espaces sous-arachnoïdiens par les orifices situés dans le 4^{ème} ventricule (les trous de Magendie et Luschka) pour circuler ensuite autour de l'encéphale et de la moelle épinière. (Figure 2).

La résorption du LCR a lieu au niveau des villosités arachnoïdiennes encore appelées granulations de Pacchioni. Ce sont des hernies de l'arachnoïde qui se situent dans les sinus veineux et qui agissent passivement comme des soupapes lors de différence de pression hydrostatique (0,5 à 5 cm d'eau) ou osmotique. Ainsi, les villosités arachnoïdiennes, qui constituent l'appareil de drainage, permettent de réguler le volume et la pression du LCR.

Lors d'augmentation de pression, les villosités s'ouvrent pour laisser échapper le LCR et éviter au tissu cérébral d'être soumis à de trop fortes pressions mécaniques.

2.1.5. Rôle du LCR.

Le LCR présente trois fonctions principales :

- Lors de chocs ou dans certaines positions (tête en bas), le LCR permet de protéger le SNC par son rôle d'amortisseur liquidien. Il forme une enveloppe liquidienne dans laquelle flotte l'encéphale et assure ainsi protection et soutien en diminuant le poids apparent du tissu nerveux,
- Le LCR maintient une pression correcte à l'intérieur de la boîte crânienne. Il agit comme un réservoir régulateur du volume encéphalique : si le volume du parenchyme cérébral ou celui du sang intracérébral augmente, le LCR est drainé ; au contraire, si le volume cérébral ou le volume sanguin diminuent, le volume de LCR augmente,
- Enfin, le LCR participe aux processus métaboliques cérébraux en assurant une fonction d'échange de substances. Le cerveau réalise donc la majorité de ses échanges avec le sang via la BHE.

2.1.6. Technique de prélèvement du LCR.

La principale technique de prélèvement du LCR est la ponction lombaire (Figure 4). Elle s'effectue au niveau de la partie inférieure du canal rachidien, dans le cul-de-sac dural situé sous la terminaison médullaire, dans l'espace entre la 4^{ème} et 5^{ème} vertèbre lombaire (L4L5) ou entre la 3^{ème} et la 4^{ème} (L3L4).

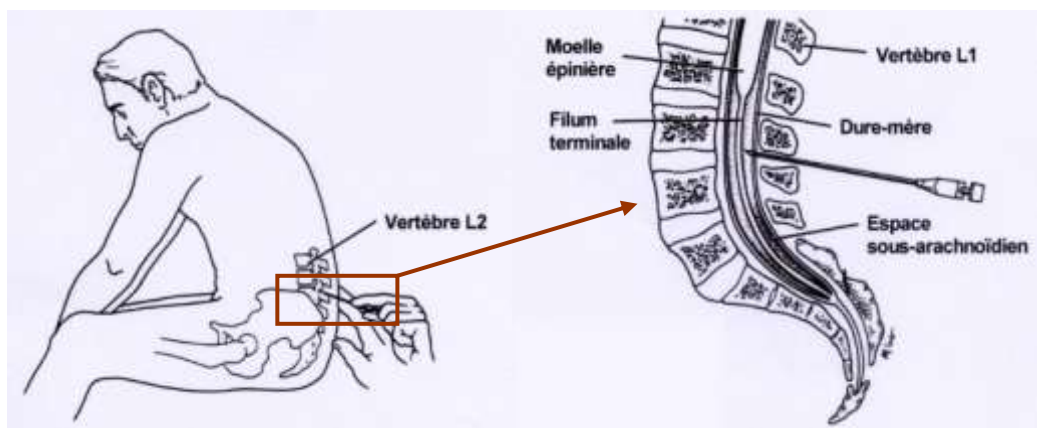


Figure 4 : Technique de prélèvement du LCR par ponction lombaire.

Le patient est assis ou allongé, le dos le plus rond possible afin de dégager le massif rachidien. Cet examen très simple ne connaît qu'une seule contre-indication mais elle est majeure : l'hypertension intracrânienne dont l'absence doit être systématiquement vérifiée au fond d'œil avant toute ponction. Le LCR est prélevé à l'aide d'une aiguille spécifique équipée d'un stylet pour freiner l'écoulement. Un tube par analyse est préconisé et l'envoi au laboratoire doit être le plus rapide possible.

2.2. La barrière hémato-encéphalique (BHE). (5)

La notion de BHE s'est imposée au début du 20^{ème} siècle lorsque certains physiologistes, tels Ehrlich, Biedl, Kraus, Lewandowsky et Goldmann, découvrirent que les colorants vitaux administrés par voie intraveineuse à des animaux d'expérience épargnaient le tissu cérébral, alors que celui-ci fixait les mêmes pigments injectés par voie sous-arachnoïdienne. L'apparition de la microscopie électronique dans les années 1950 a permis de démontrer que le cerveau était séparé du flux sanguin par une série de feuillets tout au long de l'arborescence vasculaire.

La BHE ne se résume pas à un obstacle anatomique s'opposant passivement au passage des substances indésirables de la circulation. Elle limite l'accès au tissu cérébral par l'action conjointe du renouvellement du LCR et de plusieurs systèmes actifs de transport sélectif.

2.2.1. Données anatomiques et morphologiques de la BHE.

Les deux entités fondamentales intervenant dans la structure de la BHE sont les cellules endothéliales des capillaires cérébraux et les cellules gliales également appelées neuroglie.

Le plasma sanguin irrigant le système nerveux central (SNC) est confiné à l'intérieur d'un endothélium continu dépourvu de fenestrations, et dont les cellules sont étroitement soudées entre elles par des jonctions serrées qui contrôlent le passage des substances provenant du sang. (Figure 5A). Les capillaires constituent une interface privilégiée où s'effectuent les échanges rapides entre le sang et le liquide extracellulaire du parenchyme cérébral ainsi que le passage des cellules immunitaires.

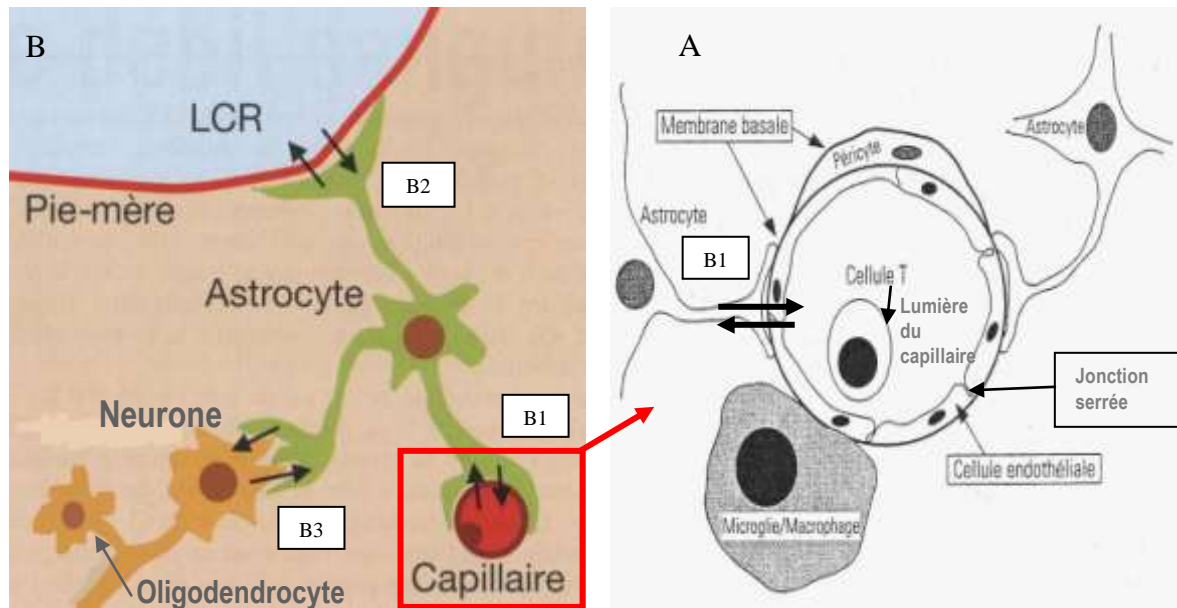


Figure 5 : Représentation schématique de la BHE. A : Principaux éléments cellulaires constituant la BHE (6) ; B : Echanges entre le LCR et les différentes barrières (1).

Les cellules gliales représentent près de 50% des cellules du SNC. Il en existe trois types : les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales. Les astrocytes établissent des échanges nutritifs entre les neurones et les vaisseaux sanguins. Les oligodendrocytes sont situés à proximité des neurones et ils permettent la production de la gaine de myéline favorisant la transmission de l'influx nerveux au niveau de l'axone. Les cellules microgliales appartiennent à la lignée des monocytes/macrophages. Elles possèdent des capacités de phagocytose, de présentation d'antigènes (Ag) et de chimiotactisme par production de cytokines. La neuroglie possède donc de multiples fonctions : support, nutrition, myélinisation, croissance, régénération et protection immunitaire du tissu nerveux.

L'endothélium des capillaires sanguins du SNC est enserré entre les prolongements des astrocytes qui s'appliquent tout le long de sa membrane basale. Cette construction, renforcée par les péricytes pris entre les couches de la membrane basale, permet d'assurer l'isolation et le soutien tant mécanique que métabolique des neurones considérés comme les cellules nobles du tissu cérébral. (Figure 5B).

Les fonctions vitales de protection et de nutrition du SNC sont assurées par la neuroglie et la circulation sanguine, soit directement par le réseau des capillaires cérébraux, soit indirectement par la voie du LCR via la BHE. Cette dernière est constituée d'un ensemble de 3 barrières : hémato-tissulaire, hémato-liquidienne et liquido tissulaire.

Il existe ainsi trois niveaux d'échange entre le sang et le parenchyme cérébral :

- La barrière B1 hémato-tissulaire sépare le sang du cerveau. Elle est formée par l'endothélium vasculaire des capillaires cérébraux constitué de jonctions serrées et de jonctions adhérentes qui forment la « zona occludens ». Ce dispositif est non fenêtré et il restreint le flux paracellulaire en bloquant les passages intercellulaires des molécules de grande taille et lipophiles. Le passage transcellulaire est de plus extrêmement limité par la rareté des vésicules endocytotiques. Enfin, cette restriction de passage moléculaire est également liée à la présence d'une membrane basale continue située sous l'endothélium et à une forte proportion de cellules gliales parfois totalement entourées de desmosomes. Ces dispositions cellulaires créent ainsi un obstacle supplémentaire aux substances pour accéder au SNC (Figure 5A et B),
- La barrière B2 hémato-liquidienne sépare le sang du LCR. Elle est constituée de cellules des plexus choroïdes qui produisent activement le LCR et de cellules des villosités arachnoïdiennes qui assurent sa résorption en fonction de la pression hydrostatique (Figure 5B),
- La barrière B3 liquido-tissulaire sépare le LCR du cerveau. Elle est formée de cellules épendymaires des plexus choroïdes et de cellules astrocytaires. Cette barrière permet l'élimination des déchets métaboliques pour protéger le SNC des éventuelles modifications du LCR et elle distribue les différents nutriments aux neurones (Figure 5B).

2.2.2. Mécanismes de transport des molécules au niveau des différentes barrières.

La BHE constitue un processus dynamique permettant au tissu nerveux de préserver une homéostasie stricte et vitale de son milieu extracellulaire (Figure 5B).

La diffusion libre d'une substance à travers la BHE dépendra de sa capacité de diffusion dans la phase lipidique de la membrane plasmique (Figure 6). Ce passage dépend de quatre facteurs : la lipophilie de la molécule dans son état non dissocié, la dissociation ionique au pH plasmatique (seule la forme non dissociée peut diffuser à travers les membranes cellulaires), la liaison aux protéines plasmatiques et le poids moléculaire (PM).

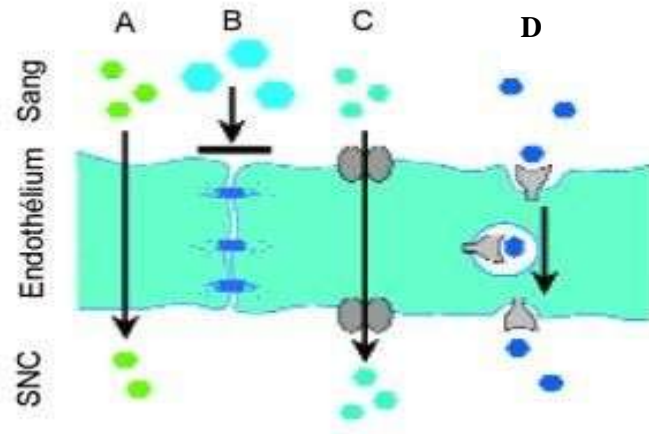


Figure 6 : Différents types d'échange intervenant à travers les cellules endothéliales du SNC.
 A : Perméation de petites molécules lipophiles ; B : Arrêt des molécules hydrophiles ou de grande taille ; C : Captation par transport facilitée ; D : Endocytose médiée par des récepteurs.

La perméabilité de la BHE est donc grande pour les molécules liposolubles ainsi que pour l'oxygène et le dioxyde de carbone qui la traversent par simple diffusion (Figure 6A). Elle est en revanche plus faible pour le glucose et les acides aminés (AA) qui nécessitent la présence de protéines transporteuses au niveau des membranes luminale et basale des cellules endothéliales. (Figure 6C). Les cellules endothéliales ne laissent pas passer librement les ions car elles sont dotées de mécanismes permettant une régulation de la composition ionique du milieu extracellulaire cérébral. Les espaces interendothéliaux liés par des jonctions serrées permettent de bloquer la diffusion de substances et tout échange avec le cerveau s'effectue par l'intermédiaire des membranes de la cellule endothéliale et du cytoplasme (Figure 6B). Les ions potassium (K^+) qui jouent un rôle de neurotransmetteur sont transportés activement du milieu extracellulaire cérébral vers le sang uniquement via un système de transport présent au niveau de la membrane basale des cellules endothéliales (pompe Na/K ATP). D'autres ions tels que le fer ou le magnésium peuvent traverser la BHE par des mécanismes d'endocytose et de récepteur spécifique (Figure 6D).

Ainsi, deux fonctions interviennent dans le maintien de cette homéostasie : l'imperméabilité des jonctions serrées vis-à-vis du K^+ et la présence d'une pompe Na/K ATP au niveau du pôle basal de la membrane plasmique endothéliale qui va capter le K^+ du milieu extracellulaire cérébral.

2.3. Eléments de neuro-immunologie. (6)

2.3.1. Modifications de l'état immunitaire et protéique du SNC.

Il n'existe aucune défense immunitaire au sein du SNC du fait de son isolement du milieu circulant par la BHE, de l'absence de cellules présentatrices d'Ag et d'expression spontanée de molécules HLA (Human Leukocyte Antigen). Ainsi, un nombre de cellules supérieur à $5/\text{cm}^3$ indique l'existence d'une pathologie intrathécale.

Une modification de la protéinorachie peut être due à 5 mécanismes différents :

- Une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-liquidienne, le plus souvent secondaire à une réaction inflammatoire, provoque un passage important de protéines sériques dans le LCR. Ce phénomène de transsudation plasmatique induit ainsi une élévation de l'albumine, des α 2-globulines, de la β -transferrine et des immunoglobulines (Igs) au niveau du LCR,
- Une diminution du flux du LCR dans le cul-de-sac lombaire entraîne une augmentation du temps d'échange avec les vaisseaux méningés. Ce processus, appelé également « bloc spinal » provoque une équilibration des concentrations protéiques entre le sang et le LCR ce qui entraîne une modification de la composition protéique du LCR,
- La synthèse intrathécale d'une protéine normalement absente du SNC est un phénomène pathologique. Elle a lieu suite à un franchissement de la BHE par des cellules immunitaires, surtout de type lymphocytaire. Ce phénomène a été décrit dès 1942 par Kabat qui avait observé chez des patients atteints de neurosyphilis et de SEP, une élévation de gammaglobulines au sein du LCR sans augmentation de l'albumine, pourtant de plus faible PM (7),
- Un processus destructif du tissu nerveux, tel que, les accidents vasculaires ischémiques et hémorragiques, la maladie de Creutzfeld Jacob, les encéphalites herpétiques ou la compression tumorale de la moelle, peut lyser des cellules nerveuses. Ce phénomène entraîne ainsi une libération dans le LCR de protéines constitutives du cytoplasme ou des membranes des cellules neuronales et gliales. Six types distincts de protéines spécifiques, dont la protéine basique de la myéline, sont retrouvés à des concentrations importantes lors de pathologies de la substance blanche telle que la sclérose en plaque,

- La consommation intrathécale d'une protéine par catabolisme local peut modifier la protéinorachie mais il s'agit d'une situation rare. En 1984, il a été décrit une diminution de la fraction C9 du complément suite à la formation du complexe d'attaque de la membrane chez des patients atteints de sclérose en plaque (8).

2.3.2. Généralités sur le processus de présentation des antigènes dans le SNC.

La présentation d'Ag permettant d'induire une réaction immunitaire, s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules ; il s'agit des molécules CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) encore appelées molécules HLA. Ces récepteurs sont dits de classe I ou II et leur présence au sein du SNC dépend du type de cellules présentatrices d'Ag et du milieu environnant. Les molécules CMH de classe I sont reconnues par des lymphocytes cytotoxiques CD8 qui induisent une fois activés, une apoptose cellulaire (réponse dite de type Th1). Les molécules CMH de classe II sont reconnues par les lymphocytes CD4 qui provoquent une réponse immunomodulatrice et humorale médiée par les lymphocytes B (réponse Th2).

Un système nerveux sain exprime peu de molécules CMH par l'action bloquante des neurones ; ceux-ci inhibent en effet l'expression de ces molécules de classe I et II sur les cellules gliales environnantes. Ainsi, la mort électrique des neurones par destruction myélinique lors des SEP, s'accompagne de l'arrêt de cette répression et de l'expression de molécules CMH de classe II sur les cellules microgliales et de classe I sur les neurones.

Les lymphocytes T sont activés au niveau du tissu lymphoïde par des cellules spécifiques qui leur présentent l'Ag responsable de l'inflammation. Ce contact provoque l'augmentation de l'expression des récepteurs des cytokines sur la membrane des cellules T qui sont alors attirées vers le site inflammatoire par l'action chimiotactique de ces dernières.

2.3.3. Mécanismes d'adhésion et de migration des cellules immunitaires dans le SNC.

Très peu de cellules immunes passent la BHE et c'est seulement lors d'une inflammation que certaines cellules sont capables de s'immiscer vers le cerveau. Les mécanismes de reconnaissance cellulaire lors d'affections neuro-immunologiques sont une étape essentielle au passage des cellules immunitaires au travers des différentes barrières

sang-cerveau et sang-cellule nerveuse. Ce passage s'effectue en 3 étapes : adhésion, roulement puis migration transcellulaire (Figure 7).

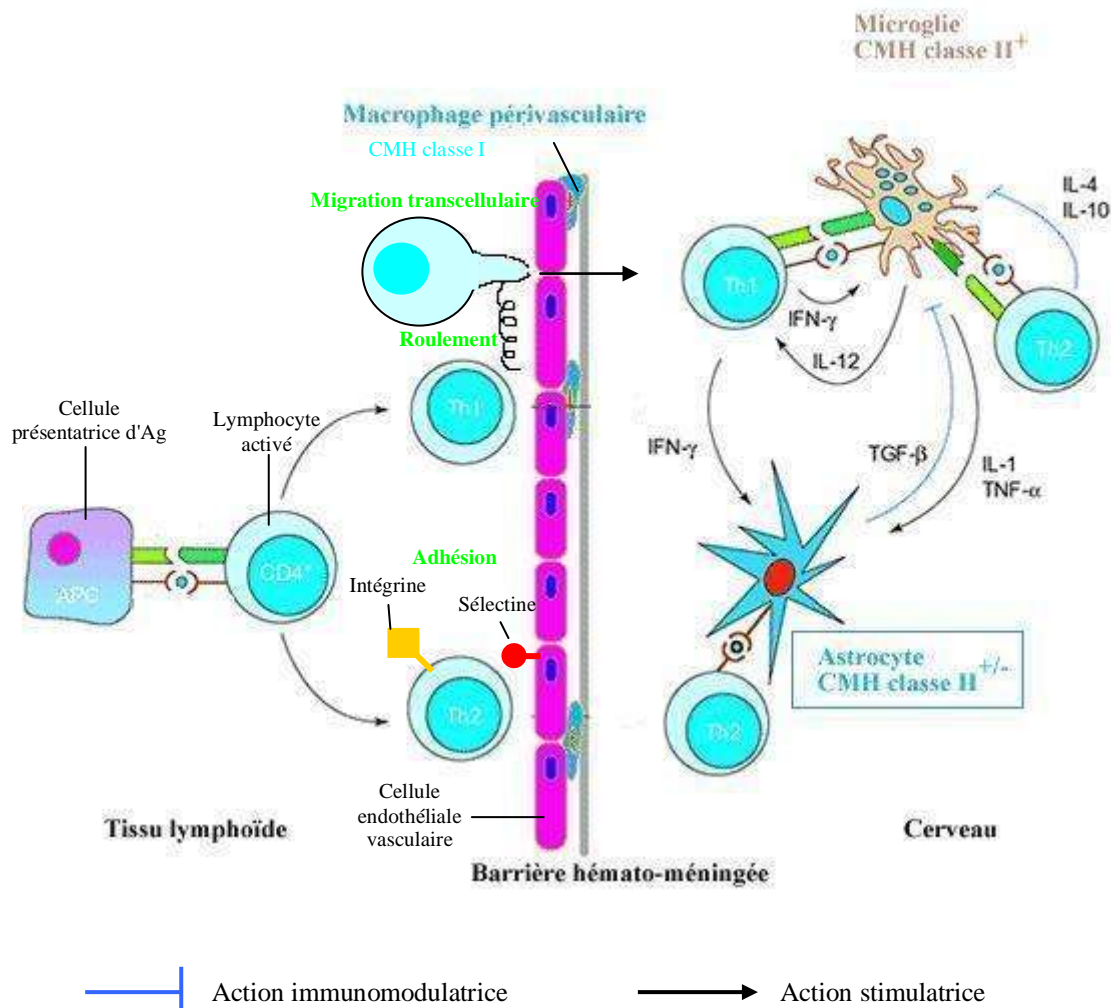


Figure 7 : Mécanismes d'adhésion et de reconnaissance cellulaire au niveau du SNC (9).

Les intégrines présentes à la surface des lymphocytes activés vont tout d'abord interagir avec les sélectines présentes à la surface des cellules endothéliales vasculaires. Il s'en suit un phénomène de roulement le long de l'endothélium qui est stimulé par les propriétés chimiotactiques des cytokines libérées au niveau du site inflammatoire. Ces contacts cellulaires favorisent ainsi les interactions entre les cellules endothéliales et les lymphocytes ce qui induit la transmigration cellulaire de ces derniers par aplatissement entre les cellules de la paroi vasculaire cérébrale (Figure 7).

Selon les cytokines présentes dans le milieu environnant, il se produit une différenciation des lymphocytes en cellules Th effectrices ce qui induit une réponse

immunitaire de type Th1 ou Th2. Une réponse Th1 stimule la production de cytokines pro-inflammatoires et cytotoxiques : interféron γ (IFN γ), tumor necrosis factor α (TNF α), Interleukine 2 (IL2). Une réponse Th2 libère des cytokines immunomodulatrices et stimulantes des lymphocytes B : IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL13 et TGF β (transforming growth factor β).

2.3.4. Rôle des cytokines lors des réactions immunitaires.

Les cytokines sont des polypeptides, elles sont aussi bien produites par les cellules immunitaires présentes sur le site inflammatoire lors de réponse de type Th1 ou Th2, que par les cellules résidentes du SNC (astrocytes, cellules microgliales...).

Ces molécules possèdent des propriétés de chimiotactisme et elles permettent également d'influencer la réponse immunitaire. Lors de pathologie inflammatoire ou infectieuse, ces substances (IFN γ , TNF α lors de réponse Th1) activent les macrophages et les astrocytes qui détruiront la gaine de myéline par l'intermédiaire du système du complément.

Cependant, des cytokines, telles que l'IL4, IL10 ou le TGF β , possèdent des propriétés immunomodulatrices et sont donc capables de contrôler la réaction immunitaire en supprimant par exemple, le processus auto-immun induit par les lymphocytes T (Figure 7).

2.3.5. Modèles expérimentaux pour l'étude des maladies neuro-immunologiques démyélinisantes. (6)

En 1885, Pasteur mit au point le vaccin contre la rage dont l'homogénat était issu de moelle épinière de lapin infecté par le virus. Ces premières découvertes ont permis d'établir des modèles animaux expérimentaux à partir d'homogénat de cerveau pour l'étude des pathologies démyélinisantes du SNC.

Pour les recherches concernant la sclérose en plaque, il s'agit de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

L'EAE est considérée comme le prototype d'une maladie auto-immune à médiation cellulaire spécifique d'un organe et un modèle animal des maladies inflammatoires démyélinisantes du cerveau.

Il existe trois formes distinctes :

- l'EAE aiguë et l'EAE hyperaiguë qui sont assimilées respectivement à l'encéphalite aiguë disséminée (ADEM) et à leuco-encéphalite hémorragique aiguë de Hurst,
- l'EAE chronique avec rémissions qui ressemble à la forme évoluant par poussées de la sclérose en plaque.

Pour établir ce modèle expérimental, des protéines intervenant dans la structure du tissu cérébral, telles que, la protéine basique de la myéline (myelin basic protein ou MBP), la protéine protéolipidique (PLP), la protéine S-100 des astrocytes, sont injectées par voie sous-cutanée à des souris, rats ou cobayes. Dans certains cas, des cellules spécifiques dirigées contre la MBP ou la PLP peuvent être directement injectées aux animaux pour induire une EAE qui présente alors une plus forte composante inflammatoire.

La protéine injectée est alors prise en charge par des cellules présentatrices d'Ag qui la présentent à leur surface par l'intermédiaire de molécules HLA de classe II. La protéine est alors dite apprêtée et est présentée aux lymphocytes T CD4.

Une fois activés, les lymphocytes franchissent la BHE, reconnaissent le peptide de l'hôte et exercent leur effet délétère en induisant une inflammation et la destruction de la myéline.

Ce modèle a permis de mettre en évidence un changement de reconnaissance antigénique lors de l'évolution de la maladie. Ainsi, une destruction myélinique, provoquée au début de la maladie par des lymphocytes activés par la protéine MBP, peut être amplifiée par la reconnaissance de nouveaux Ag par les cellules immunitaires. La réponse lymphocytaire est alors étendue à d'autres antigènes tels que la PLP ce qui favorise la progression de la maladie.

Ces découvertes permettent d'étudier les variabilités d'évolution de la sclérose en plaque, mais également de développer de nouvelles approches thérapeutiques, génétiques et immunologiques. De nombreuses questions restent néanmoins toujours en suspens.

3. LA SCLEROSE EN PLAQUE (SEP).

3. LA SCLEROSE EN PLAQUE (SEP).

3.1. Structure et fonctions de la fibre myélinisée. (6)

3.1.1. Données morphologiques.

La myéline est une structure complexe d'aspect spiralée qui permet une liaison intime entre l'axone et la cellule gliale. Elle est constituée d'une alternance de lignes denses majeures qui sont scellées par la dimérisation de la protéine basique de la myéline (MBP), et de lignes intrapériodiques où se retrouvent les domaines extracellulaires de la protéine protéolipidique (PLP) dans la myéline centrale.

Ces dispositions membranaires contribuent à la fonction de jonctions spécialisées de la gaine de myéline qui optimisent la transmission et ainsi la conduction rapide de l'influx nerveux (Figure 8).

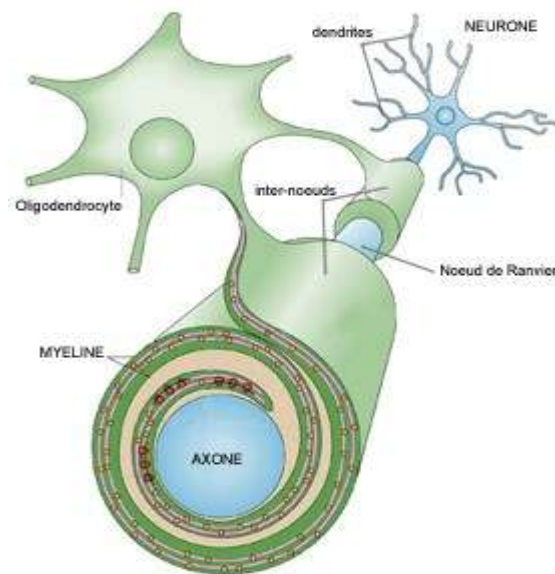


Figure 8 : Représentation schématique de la gaine de myéline et de son association avec l'axone et la cellule gliale.

La myéline est une structure fragile qui peut être le point d'impact de maladies génétiques ou dégénératives telles que la SEP.

3.1.2. Fonctions de la myéline du SNC.

La principale fonction de la fibre myélinisée est sa capacité d'isolant électrique ce qui explique sa richesse en lipides (cholestérol, phospholipides et glycolipides) et sa faible teneur en eau. Il existe également de nombreuses protéines au sein de la myéline, dont les fonctions sont très diversifiées.

Les deux grandes familles majoritaires, qui représentent 80% de la structure protéique de la myéline, sont les MBP et les PLP. Les MBP permettent une interaction avec les lipides acides tandis que les PLP stabilisent la fibre myélinisée.

Un grand nombre de protéines dites mineures existent en plus faible proportion. Il s'agit entre autres, de la myelin-associated glycoprotein (MAG) dont les produits issus de sa protéolyse sont retrouvés dans le LCR des patients atteints de SEP, de la myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) qui appartient à la superfamille des immunoglobulines, des protéines de Wolfgram.

La myéline assure ses fonctions grâce aux interactions inter-lipides, inter-protéines et lipides-protéines. La myélinisation par segments de l'axone et la présence de nœuds de Ranvier dépourvus de myéline et riche en canaux sodiques voltage-dépendants, permettent la conduction saltatoire de l'influx nerveux le long des axones myélinisés. Les protéines de la myéline peuvent faire l'objet d'une attaque auto-immune dans les maladies démyélinisantes. Ainsi, les MOG, MBP, PLP sont reconnues comme auto-antigènes cibles dans la SEP et cette reconnaissance contribue au phénomène de démyélinisation. Tout processus de démyélinisation augmente le temps nécessaire pour activer les canaux sodiques. Ce retard de dépolarisation de membrane entraîne alors une diminution de la vitesse de conduction et de transmission de l'influx nerveux à la cellule suivante.

3.2. Données épidémiologiques.

La SEP est la plus fréquente des maladies inflammatoires chroniques démyélinisantes de l'adulte jeune (entre 20 et 40 ans) avec une prédominance féminine (sex ratio de 1,5 à 2/1) (10). L'incidence globale de la maladie au niveau mondial, révisée par Alonso et al en juillet 2008, sur ces 40 dernières années, est de 3,6 cas pour 100 000 personnes-années pour les femmes et de 2 pour les hommes (11).

En 1980, Kurtzke avait observé que la prévalence de la maladie augmentait dans chaque hémisphère en partant de l'équateur vers les pôles (13).

Cette distribution a permis de décrire 3 zones de prévalence :

- Les zones de forte prévalence (> à 30 pour 100 000 habitants). Elles se situent au dessus de 40° de latitude nord et de 30° latitude sud,
- Les zones de moyenne prévalence (entre 5 et 30 pour 100 000 habitants). Elles correspondent au sud de l'Europe, aux Etats-Unis, au pourtour méditerranéen et à l'Australie,
- Les zones de faible prévalence (< à 5 pour 100 000 habitants). Elles se trouvent en Asie et en Afrique.

La race caucasienne paraît plus exposée à la maladie que les noirs d'origine africaine, les asiatiques, les aborigènes d'Australie ou les esquimaux.

Les études de migration de population montrent que les adolescents migrant avant l'âge de 15 ans acquièrent la prévalence du pays d'accueil contrairement aux migrants adultes qui conservent la prévalence du pays d'origine.

En France, plus de 70 000 personnes sont touchées par cette maladie. Durant ces 40 dernières années, de nombreuses études ont montré une nette augmentation de l'incidence de la SEP notamment chez la femme. Une synthèse de ces différents travaux, réalisée par Debouverie *et al* en 2007, estime l'incidence de la maladie entre 4,1 et 9,12 pour 100 000 habitants et une prévalence entre 65 et 125 pour 100 000 habitants (12). Il existe un gradient progressif très net évoluant du sud-ouest au nord-est et les régions les plus touchées sont l'Alsace, la Lorraine, la Champagne-Ardenne, la Picardie, le Nord-Pas de Calais et la Franche-Comté (Figure 9).

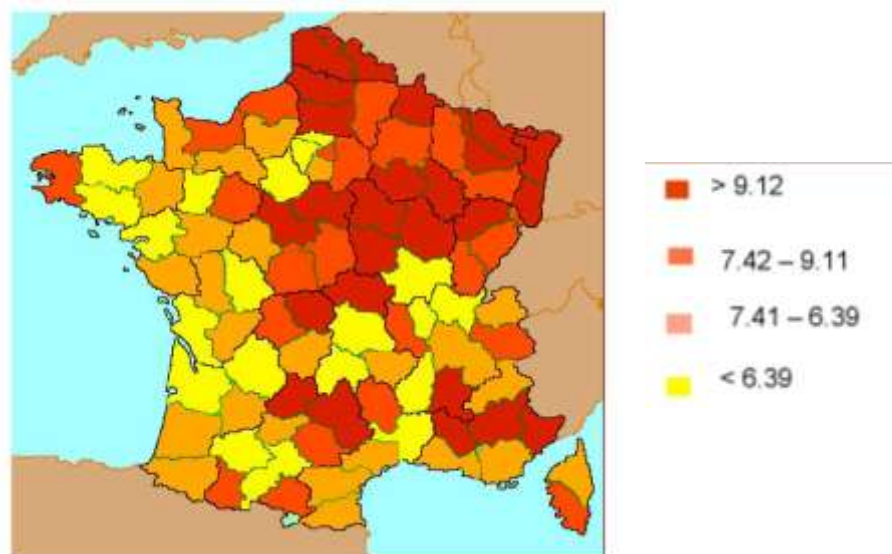


Figure 9 : Taux d'incidence standardisée pour 100 000 personnes en France (donnée CNAM 1999) (12).

Bien que l'étiologie de la maladie ne soit pas encore connue, la SEP demeure une pathologie multifactorielle dont les facteurs génétiques, environnementaux, virologiques ou immunologiques pourraient expliquer la répartition inégale de la maladie dans le monde.

3.3. Définition anatomopathologique de la SEP.

La SEP est une pathologie chronique démyélinisante dont le mécanisme inflammatoire et auto-immun détruit la myéline. Ce phénomène aboutit progressivement à une atteinte axonale qui constitue la cause principale du handicap neurologique irréversible.

En 1868, le professeur Charcot publia le premier cas de SEP après avoir autopsié le cerveau d'une jeune femme atteinte de dysarthrie, mouvements oculaires anormaux et tremblements. Il observa des cicatrices cérébrales caractéristiques qu'il dénomma "plaques".

La SEP est principalement définie par des critères anatomopathologiques (14):

- La présence de lésions inflammatoires démyélinisantes aiguës appelées "plaques". Ces atteintes apparaissent de manière successive pendant l'évolution de la maladie et sont définitives. Elles sont disséminées dans la substance blanche du SNC ce qui explique la diversité des signes cliniques,
- Une perte oligodendrocytaire suite au processus immuno-induit. Dans la SEP aiguë, la démyélinisation est associée à une destruction extensive d'autres cellules tissulaires tels que les oligodendrocytes. Pourtant, un grand nombre de ces cellules semble rester disponible pour permettre une remyélinisation rapide,
- Une altération de la BHE et une infiltration de cellules inflammatoires à disposition périvasculaire qui apparaissent au début de la maladie,
- Une perte axonale corrélée avec l'activité inflammatoire, qui s'observe au cours de l'évolution de la maladie,
- Une gliose réactionnelle (processus de prolifération et/ou d'hyperplasie des cellules microgliales et des astrocytes) qui apparaît au dernier stade de la maladie. Cette atteinte a permis de donner le nom de "sclérose" à la maladie.

Deux grandes associations, la "Multiple Sclerosis International Federation" (MSIF) et la "National Multiple Sclerosis Societies of the USA and Canada" (NMSS), ont établi des critères de classification des types de plaques observées au cours de la SEP afin de classer en 4 catégories les lésions observées et de déterminer l'activité de la maladie :

- Les plaques aiguës correspondent à la présence d'une inflammation et d'un infiltrat de macrophages contenant des débris récents de myéline,
- Les plaques chroniques actives diffèrent des plaques aiguës par l'absence de produits de dégradation récents de la myéline au sein des macrophages,
- Les plaques chroniques inactives correspondent à la présence de produits de dégradation récents de la myéline sans infiltrats périvasculaires inflammatoires,
- Les "shadow plaques" représentent un processus de remyélinisation, associé à une absence d'infiltrats inflammatoires et de produits de dégradation de la myéline.

3.4. Physiopathologie de la SEP. (15)

La SEP est une maladie d'une très grande complexité aussi bien d'un point de vue clinique qu'anatomopathologique.

Elle est caractérisée par une dissociation axono-myélinique dont le processus pathologique est la destruction de la gaine de myéline avec un maintien de la continuité axonale au sein des foyers de démyélinisation. Cependant, l'atteinte axonale, responsable du handicap neurologique permanent, peut survenir secondairement au phénomène de démyélinisation après des années d'évolution.

Le processus inflammatoire, dont l'origine n'est pas encore connue, met en jeu des lymphocytes T ciblant les Ag de la myéline. Des clones lymphocytaires autoréactifs sont activés dans le sang circulant par des cellules présentatrices d'Ag. Ils traversent la BHE pour pénétrer dans le SNC et induire la réaction inflammatoire. Les cellules infiltrantes et les cellules résidentes du SNC sécrètent des cytokines et autres médiateurs de l'inflammation qui participent au recrutement cellulaire.

Ces réactions immunitaires aboutissent à la destruction myélinique responsable du blocage de la conduction nerveuse et des signes cliniques observés lors des phases de poussée de la maladie.

La diminution de transmission de l'influx nerveux a été décrite dès 1868 par Charcot : l'axone démyélinisé voit son nombre de canaux sodiques voltage dépendant diminuer, ce qui induit la formation d'un bloc de conduction (dysfonctionnement de l'activité électrique). L'hyperexcitabilité des axones démyélinisés est responsable de l'apparition de symptômes, pouvant être temporaires ou à l'inverse continus, tels que sensations de picotements, fourmillements, douleurs lors de certains mouvements.

Les manifestations de poussées peuvent être suivies par des phases de rémissions qui témoignent de la restauration de la fonction nerveuse au niveau des axones altérés. Les rémissions peuvent être dues à deux mécanismes : l'apparition de nouveaux canaux sodiques voltage dépendant au niveau de l'axone atteint ou la remyélinisation spontanée effectuée par des oligodendrocytes endogènes. Cependant, dans certains cas, ces nouveaux canaux sodiques ne restaurent pas complètement l'influx nerveux et une augmentation de la température corporelle (stress, fièvre ou exercices physiques) provoque une aggravation des signes neurologiques ; ceci caractérise le syndrome d'Uhthoff. Ce symptôme doit son nom à un neurologue allemand qui décrit en 1890, l'apparition de diplopie transitoire après un exercice physique chez plusieurs patients atteints de SEP. En effet, la dégradation de la myéline rend l'axone plus sensible aux changements de température et engendre une mauvaise transmission de l'influx nerveux. Une diminution de la température corporelle stoppe les signes cliniques.

Au niveau des plaques de démyélinisation aiguës ou chroniques actives, la réaction inflammatoire est dominée par l'infiltration de lymphocytes T et de macrophages. Les plaques chroniques inactives sont caractérisées par un infiltrat de plasmocytes. La présence de plasmocytes, d'IgG et de fractions du complément évoque la destruction de la myéline et des oligodendrocytes par l'intermédiaire d'auto-Ac et de l'activation de la cascade du complément.

La réponse humorale médiée par les lymphocytes T CD4 est illustrée par la présence d'une synthèse intrathécale d'Ac qui est le témoin de l'infiltration lympho-plasmocytaire.

Les mécanismes pathologiques de la SEP restent encore inconnus à ce jour. Cependant, les modèles expérimentaux animaux et les réponses thérapeutiques aux immunosuppresseurs ont permis de proposer deux hypothèses concernant l'origine de la maladie : - La première objective un début périphérique de la SEP qui repose sur la présence de cellules autoréactives dirigées contre des épitopes myéliniques dans le sang des patients. Deux théories sont ainsi exploitées : les Ag d'un agent infectieux provoqueraient une réaction croisée avec les Ag du soi de l'hôte (mimétisme moléculaire), ou l'activation non spécifique des cellules autoréactives lors d'un processus inflammatoire quelconque. - La deuxième hypothèse impliquerait une atteinte primitive du SNC avec une mise en jeu secondaire du système immunitaire. Un processus d'apoptose oligodendrocytaire ferait suite à une infection latente d'origine virale ou toxique. L'immunité naturelle précéderait la réponse adaptative activant les lymphocytes T autoréactifs.

3.5. Etiopathogénie de la SEP. (16)

Les origines étiologiques de la SEP sont très nombreuses mais hypothétiques. Seul le mécanisme auto-immun responsable de la destruction myélinique est connu à ce jour.

La présence de facteurs génétiques a pu être fortement évoquée par de nombreuses études épidémiologiques et il semblerait que la susceptibilité de la maladie soit contrôlée par plusieurs gènes. Par exemple, l'expression de certains gènes codant la région HLA, présents sur le chromosome 6, pourrait constituer un facteur de prédisposition à la maladie ; il a été démontré qu'il existait un lien significatif entre la présence de l'allèle HLA-DRB1*1501 au niveau du locus HLA-DR2 et la SEP. Cependant, leur responsabilité dans le développement de la maladie ne serait que de 10 à 60% et les mécanismes exacts impliquant ces derniers dans la physiopathologie de la SEP ne sont pas encore connus (17, 18).

Les formes familiales représentent 10 à 15% des cas. La prévalence de la maladie chez un apparenté d'un patient atteint de SEP est variable, elle est plus élevée entre frères et sœurs (4%), comparé aux parents (2,75%) ou aux autres apparentés (2%). Des jumeaux homozygotes présentent un risque de 38% de développer la maladie si l'un des deux est atteint. Cette prédisposition n'est pas liée à une transmission génétique de la maladie, mais elle traduit une prédisposition génétique particulière à développer une réaction immunitaire à l'agent pathogène.

L'influence des facteurs environnementaux dans la SEP a été mise en évidence à la suite d'études sur l'incidence de la maladie en fonction de l'âge et de la migration des populations : la prévalence varie suivant un gradient nord-sud ; la migration vers une zone de faible prévalence avant l'âge de 15 ans apporte le risque du pays d'accueil ; le niveau socio-économique du pays influencerait la susceptibilité de la maladie. Par ailleurs, la pollution, l'industrialisation et le mode de vie faciliteraient le développement de pathologies auto-immunes ou allergiques. Ainsi, la prévalence de la SEP en Asie est faible mais est plus importante au Japon, pays d'Asie le plus industrialisé.

La responsabilité des agents infectieux, viraux ou bactériens, dans le déclenchement de la maladie n'a pas encore été élucidée. Les recherches se portent plus particulièrement sur des virus responsables d'infection latente avec réactivation, tels HHV6 (herpès virus humain 6), le virus de la rougeole, les rétrovirus, l'EBV (Epstein Barr virus). Le phénomène de mimétisme moléculaire serait à l'origine du déclenchement de la destruction myélinique en

provoquant une réponse immunitaire dirigée contre le soi en réponse à un agent infectieux pour lequel il existe une homologie de séquence protidique avec la myéline.

3.6. Evolution de la SEP.

La SEP est une pathologie d'une importante variabilité tant au niveau de la symptomatologie, que de l'évolution et du pronostic. Elle est caractérisée par des phases de poussées et de progression qui permettent d'identifier différents profils évolutifs.

3.6.1. Les phases cliniques de poussées et de progression.

Une poussée apparaît de manière subaiguë en quelques heures à quelques jours. Elle atteint une phase de plateau suivie d'une récupération plus ou moins complète. D'un point de vue clinique, les poussées doivent durer au moins 24h et être séparées d'un minimum de 30 jours. Elles peuvent correspondre à l'apparition ou à la réapparition de symptômes, ainsi qu'à l'aggravation de symptômes déjà existants.

3.6.2. Les types évolutifs de la SEP. (19)

Il existe trois formes cliniques principales : récurrente rémittente, secondairement progressive et progressive primaire (Figure 10A) :

- SEP récurrente rémittente : cette atteinte, observée chez 85% des patients apparaît surtout en début de maladie et se traduit par l'apparition de poussées alternées par des phases de rémissions. Les épisodes d'anomalies neurologiques sont sans conséquence et l'état du patient revient à la normale à la fin de la poussée. A ce stade, des plaques multifocales d'âges différents sont observées à n'importe quel niveau du SNC et le syndrome inflammatoire est dominant,
- SEP secondairement progressive : cette forme est retrouvée chez la majorité des patients atteints de SEP récurrente rémittente évoluant depuis de nombreuses années (10 à 20 ans). Les poussées présentent une aggravation progressive avec des séquelles neurologiques irréversibles dues à une perte axonale,
- SEP à forme progressive primaire : cette atteinte est de progression permanente et il n'y a pas d'alternance de poussées et de rémissions. Elle est observée dans 10% des cas de SEP débutante et se caractérise d'un point de vue anatomopathologique par la mort des oligodendrocytes associée à la disparition de différentes protéines de la myéline.

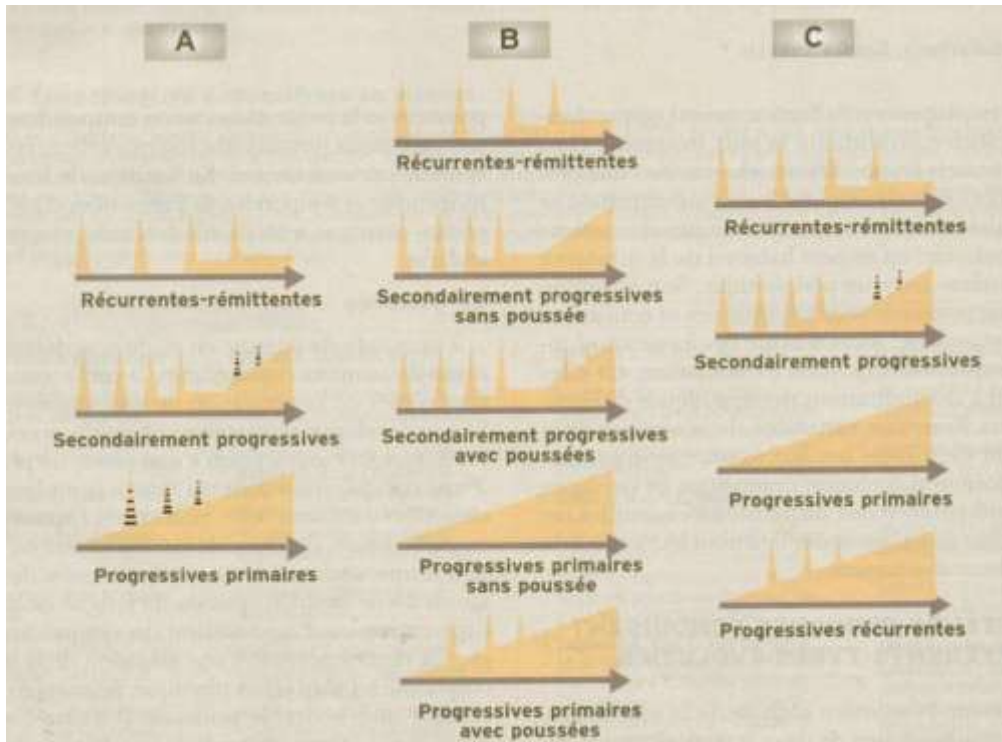


Figure 10 : Classification des types évolutifs de la SEP. A : les trois types principaux ; B : les cinq types détaillés ; C : la classification internationale de Lublin et Reingold (1996) (19).

Ces trois principales formes cliniques peuvent être subdivisées en cinq autres sous types distincts selon l'existence ou non de poussées lors des périodes de progression. (Figure 10B). A la suite d'un consensus en 1996, Lublin et Reingold ont établi une nouvelle classification désormais utilisée pour classer les formes de SEP. Elle distingue en plus des trois principaux types, la forme progressive récurrente. Elle correspond à une aggravation neurologique progressive et régulière ponctuée de poussées aiguës avec ou sans rémission ultérieure (20). Cette atteinte est retrouvée chez 5% des malades. (Figure 10C).

3.6.3. L'évolution d'ensemble de la SEP.

La symptomatologie clinique observée au cours des SEP est très variée.

La maladie reste cependant caractérisée par différentes phases : l'apparition des premiers signes cliniques neurologiques, la 2^{ème} poussée et la progression secondaire.

- Le début de la maladie se présente sous une forme récurrente rémittente (85% des patients) ou sous forme progressive d'emblée (15% des cas). Les formes récurrentes rémittentes présentent une prédominance féminine (2 femmes pour 1 homme) contrairement aux formes progressives primaire dont le sex ratio est

voisin de 1. La maladie apparaît entre 20 et 40 ans dans 70% des cas et un diagnostic de SEP après 55 ans doit être posé avec précaution. Les signes cliniques d'une SEP débutante sont multiples du fait de l'atteinte aléatoire de la substance blanche. Il s'agit essentiellement de troubles moteurs, sensitifs, sphinctériens ou sexuels. La névrite optique rétrobulbaire (NORB) isolée est un signe très évocateur mais non spécifique du diagnostic de SEP. Elle est observée chez 20% des patients. Enfin, les troubles cognitifs tels le phénomène d'Uhthoff, la fatigue, la perturbation de l'attention et de la mémoire peuvent également être observés dans la sémiologie initiale de la SEP,

- La 2^{ème} poussée survient dans les deux premières années chez 50% des patients présentant initialement une forme récurrente rémittente. Ce délai n'est influencé ni par l'âge ni par le sexe des patients et il peut être prédit en visualisant l'apparition de nouvelles lésions inflammatoires du SNC sur un 2^{ème} cliché IRM (imagerie par résonance magnétique) réalisé 3 mois après le 1^{er},
- La progression secondaire apparaît après 15 à 19 ans d'évolution de phase récurrente rémittente. Cependant, plus les symptômes de SEP débutante s'expriment tardivement dans la vie du malade et plus le délai de passage à la forme progressive secondaire est écourté. A ce stade, la perte axonale dépasse les systèmes de compensation du SNC et la présence d'un handicap neurologique pendant plus de 6 mois est considéré comme irréversible.

De nombreuses cohortes internationales ont été constituées afin de décrire la SEP. La plus importante reste la cohorte lyonnaise qui comprend 1844 patients inclus progressivement de 1957 à 1997 (21, 22). Cette étude a ainsi permis d'évaluer les différents critères de bon pronostic de la maladie qui sont : un âge de début précoce, le sexe féminin, une névrite optique inaugurale, une phase initiale récurrente rémittente et l'apparition d'une 2^{ème} poussée après plus de 2 ans de rémissions. Cette cohorte a également permis d'estimer les délais d'atteinte des différents stades d'aggravation du handicap neurologique : ils s'observent après 8, 20 puis 30 ans d'évolution et la survie globale des patients est estimée à 40 ans environ.

3.7. Diagnostic positif de la SEP. (23)

Le diagnostic de SEP est fondé sur la notion de dissémination spatiale et temporelle des lésions neurologiques inflammatoires. La dissémination dans l'espace implique la présence d'au moins deux lésions de la substance blanche du SNC. La dissémination dans le

temps correspond à l'apparition d'une 2^{ème} poussée au moins 1 mois après la première ou l'apparition de nouvelles lésions à l'IRM au moins 3 mois après le premier cliché.

Différents examens sont indispensables afin de poser le diagnostic et surtout lorsque la maladie présente une forme atypique ; il s'agit de l'examen neurologique, l'IRM cérébrale, les potentiels évoqués dont les anomalies apportent un élément de dissémination spatiale et l'analyse biochimique du LCR.

3.7.1. L'IRM cérébrale.

L'IRM est l'outil primordial pour mettre en évidence la dissémination des lésions au sein de la substance blanche lors du diagnostic de SEP. La plupart des lésions cérébrales telles les plaques inflammatoires actives de SEP sont responsables d'une augmentation du contenu tissulaire en eau. L'IRM est très sensible à ce paramètre (24).

Il existe cependant de nombreux paradoxes entre la clinique et les images observées à l'IRM cérébrale de patients atteints de SEP. De nouvelles méthodes en cours de développement permettraient de visualiser différents types d'atteinte tissulaire, globale et focale dès le stade précoce de la maladie. La place de ces techniques dans le diagnostic et le suivi des SEP reste à déterminer (25).

3.7.2. L'analyse biologique du LCR.

L'absence de signes neurologiques de dissémination temporelle et/ou spatiale peut rendre le diagnostic de SEP difficile. L'analyse du LCR s'avère être un outil diagnostique extrêmement fiable qui comprend plusieurs paramètres : protéinorachie, cytorachie, recherche de synthèse intrathécale et calcul de l'index IgG.

- La protéinorachie peut être augmentée dans 25% des cas sans dépasser 1 g/L,
- La cytorachie révèle le plus souvent 4 à 20 cellules mononuclées par mm³ (essentiellement lymphocytaires),
- Une synthèse intrathécale, définie par la présence de bandes oligoclonales d'IgG dans le LCR, non retrouvées dans le sérum, est présente chez 95% des patients atteints de SEP (26). La dernière conférence de consensus en 2005 préconise une technique d'isoléctrofocalisation couplée à une immunodétection (immunotransfert ou immunofixation) pour la mise en évidence d'une synthèse intrathécale dans le LCR, reflet d'une réaction inflammatoire chronique au sein du SNC (27),

- L'index des IgG est le rapport des quotients : $(\text{IgG}_{\text{LCR}}/\text{IgG}_{\text{sérum}}) / (\text{Alb}_{\text{LCR}}/\text{Alb}_{\text{sérum}})$. Ces calculs permettent d'établir le pourcentage d'IgG naturellement transsudées dans le LCR et le pourcentage d'IgG synthétisées localement. Un résultat supérieur à 0,7 témoigne d'une synthèse intrathécale. Cependant, ce calcul ne peut pas être employé seul du à sa sensibilité inférieure à 70% (26, 28).

3.7.3. Les critères diagnostiques de la SEP.

L'importante variabilité des signes cliniques observés en cas de SEP débutante rend difficile un diagnostic précoce de la maladie. Des conférences de consensus ont ainsi permis la mise en place de critères diagnostiques précis basés sur les examens cités précédemment. En 1983, les critères établis par Poser *et al* permettaient de distinguer 5 types de SEP définies ou probables ; le patient devait obligatoirement avoir présenté deux épisodes de poussées pour conclure au diagnostic définitif de SEP (29). Les progrès de l'IRM ont permis une révision importante des critères de Poser *et al* par Barkhof en 1997, par Mac Donald *et al* en 2001 (30) (Tableau 2).

Clinique (nombre de poussées)	Nombre de régions touchées à l'IRM	Compléments nécessaires pour le diagnostic
2 ou plus	2 ou plus	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun (éliminer les diagnostics différentiels).
2 ou plus	1	<ul style="list-style-type: none"> • Dissémination dans l'espace démontrée à l'IRM OU • Association d'anomalies biologiques du LCR (synthèse intrathécale) et de 2 lésions ou plus en IRM.
1	2 ou plus	<ul style="list-style-type: none"> • Dissémination dans le temps par l'IRM
1	1	<ul style="list-style-type: none"> • Dissémination dans l'espace par l'IRM OU • Anomalies biologiques du LCR et 2 lésions ou plus à l'IRM et dissémination dans le temps par l'IRM.
0 (début progressif)	1	<ul style="list-style-type: none"> • Anomalies biologiques du LCR ET • Dissémination dans l'espace par l'IRM ET • Dissémination dans le temps par l'IRM ou une progression sur 1 an minimum.

Tableau 2 : Critères diagnostiques de SEP selon Mac Donald *et al* (30).

Cette dernière recommandation a été simplifiée par l'équipe de Polman *et al* en 2005 (31). Elle inclut la réalisation de deux IRM à 3 mois d'intervalle ce qui permet de confirmer le diagnostic de SEP par l'apparition de nouvelles lésions à la 2^{ème} IRM cérébrale. Une 2^{ème} poussée n'est donc plus nécessaire pour conclure au diagnostic et les formes probables ou possibles de SEP n'existent plus.

3.8. Diagnostic différentiel de la SEP. (6, 23)

Les signes cliniques neurologiques, le profil oligoclonal des IgG dans le LCR et les images observées à l'IRM cérébrale ne sont pas spécifiques de la SEP (32). Les problèmes diagnostiques se posent principalement au début de la maladie ou lors d'évolution particulière telle que la forme progressive primaire. Ainsi, devant une suspicion de SEP, il est nécessaire d'éliminer d'autres pathologies infectieuses, auto-immunes ou tumorales à l'aide d'examen complémentaires tels, les sérologies, les biopsies cérébrales ou les dosages de vitamines.

De nombreuses pathologies peuvent présenter une synthèse intrathécale et elles sont généralement distinguées de la SEP par l'examen clinique, l'IRM et les analyses sérologiques. Le tableau 3 répertorie les différentes causes d'apparition de bandes oligoclonales dans le LCR non retrouvées dans le sérum.

Pathologies	Incidence de présence d'un profil oligoclonal dans le LCR (en %)
Adrénoleucodystrophie	100
Panencéphalite subaigüe sclérosante	100
SEP	95
Neuro-syphilis	95
Neuro-maladie de Lyme	80
Neuro-sida, myélopathie à HTLV	80
Cysticercose	80
Trypanosomose	80
Syndrome de Guillain-Barré	60
Ataxie téléangiectasie	60
Maladie de Harada	60
Neuro-lupus érythémateux systémique	50
Neuro-sarcoïdose	40
Neuro-Behçet	20
Méningite aiguë	<5
Encéphalite aiguë	<5
Tumeur cérébrale, lymphome	<5

Tableau 3 : Causes les plus fréquentes d'apparition de bandes oligoclonales dans le LCR.

D'un point de vue clinique, les atteintes diffuses, localisées ou progressives du SNC peuvent présenter les mêmes troubles que la SEP. Elles doivent donc faire l'objet d'une recherche systématique. Il est également important de distinguer la SEP de formes frontières non incluses dans les critères de classification actuels.

Une atteinte diffuse du SNC évoluant par poussées peut être en rapport avec certaines vascularites (lupus érythémateux disséminé, périartérite noueuse), maladie de Behçet, sarcoïdose, ou maladie de Gougerot-Sjögren. Les résultats des données sérologiques ou auto-immunes ainsi que la présence d'un syndrome inflammatoire dans le sang avec une rupture de la BHE sont des arguments en faveur de ces pathologies (34).

Une atteinte localisée du SNC évoluant par poussées peut être retrouvée lors de tumeurs cérébrales ou médullaires, de lymphome primitif du SNC, de malformations vasculaires médullaires et du tronc cérébral, et d'affections cérébro-vasculaires. L'IRM permet de différencier ces différentes pathologies.

Une atteinte progressive du SNC peut être la cause d'une affection dégénérative (paraplégie spastique héréditaire), d'une sclérose combinée par carence en vitamine B12, d'une atteinte infectieuse (myélopathie à HTLV-1, maladie de Lyme, myélopathie à HIV, neurosyphilis) ou d'une affection métabolique héréditaire (adrénoleucodystrophie). Ces maladies peuvent présenter les mêmes anomalies à l'IRM que la SEP ainsi que des bandes oligoclonales d'IgG dans le LCR. Le diagnostic s'effectue à la suite de dosages de marqueurs spécifiques ou d'analyses sérologiques.

Dans les formes frontières, il n'existe habituellement pas de synthèse intrathécale dans le LCR et le diagnostic se porte essentiellement sur l'IRM ou sur les données anatomopathologiques (6). La maladie de Marburg, décrite en 1906 par Otto Marburg, est une atteinte fatale en quelques mois et se caractérise par une aggravation progressive sans poussée. Contrairement à la SEP classique, la destruction de la myéline survient de façon simultanée dans toutes les zones affectées. La sclérose concentrique de Balo, décrite en 1928 par le Dr Joseph Balo, est une forme présentant des lésions concentriques au niveau de la substance blanche des hémisphères cérébraux et caractérisée par une alternance de bandes démyélinisées et saines ou remyélinisées. La neuromyéélite optique de Devic se traduit par une névrite optique et une myélite transverse dont les séquelles apparues après les poussées, sont plus sévères que dans la SEP. Ceci est lié à la présence de lésions démyélinisantes et nécrosantes dans la substance blanche ou la substance grise de la moelle épinière et au niveau

des nerfs optiques. La sclérose diffuse myélinoclastique ou maladie de Schilder est une pathologie démyélinisante aiguë qui touche les deux hémisphères cérébraux. L'évolution est progressive avec une extension de l'atteinte neurologique et une atteinte axonale omniprésente. L'encéphalomyélite aiguë disséminée doit impérativement être dissociée de la SEP. Elle correspond à un processus de démyélinisation brutale faisant suite à une vaccination ou à une infection (33).

3.9. Le réseau SEP Bretagne.

La complexité de la SEP implique une prise en charge précoce du malade. L'association Neuro-Bretagne, présidée par le Pr Gilles EDAN, Neurologue au CHU de Rennes, a permis la mise en place du réseau SEP-Bretagne en octobre 2004 dont le centre référent est la clinique de la SEP à Rennes.

Ce réseau assure une collaboration des professionnels médicaux (médecins généralistes, neurologues, rééducateurs, ophtalmologistes, psychiatres) et paramédicaux (kinésithérapeutes, infirmiers, assistants sociaux) autour du patient.

Ses actions sont multiples sur la région, celles-ci sont résumées sur le prospectus délivré aux personnes atteintes de SEP à l'accueil du service de Neurologie. (Figure 11)

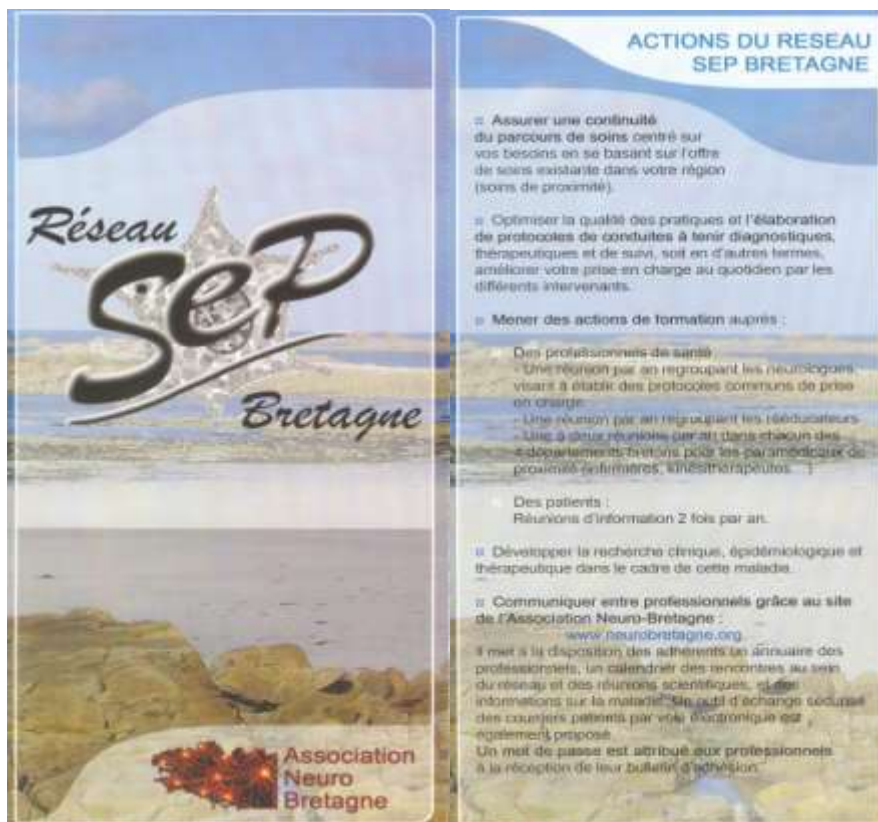


Figure 11 : Brochure du réseau SEP Bretagne

**4. ANALYSE BIOCHIMIQUE DU LCR
DANS LE CADRE D'UNE RECHERCHE
DE SYNTHÈSE INTRATHECALE
POUR LE DIAGNOSTIC DE SEP.**

4. ANALYSE BIOCHIMIQUE DU LCR DANS LE CADRE D'UNE RECHERCHE DE SYNTHÈSE INTRATHÉCALE POUR LE DIAGNOSTIC DE SEP.

4.1. Introduction.

L'exploration biochimique du LCR est l'examen de choix pour démontrer la présence d'une synthèse intrathécale d'Igs lors de maladies inflammatoires du SNC. La comparaison du profil électrophorétique du LCR à celui du sérum permet de mettre en évidence une production locale d'Igs et une inflammation au sein du SNC, éléments clés du diagnostic de SEP.

Deux types d'analyses sont utilisés pour cette recherche : une analyse quantitative immunochimique et une analyse qualitative électrophorétique.

La méthode quantitative nécessite les dosages des protéines totales, de l'albumine et des Igs dans le sérum et dans le LCR. La synthèse intrathécale est démontrée à l'aide de formules mathématiques et de diagrammes où les résultats obtenus pour le patient sont comparés à ceux de la population générale. Les méthodes qualitatives sont plus sensibles et elles permettent de détecter la présence d'un profil oligoclonal des Igs dans le LCR du patient non retrouvé dans le sérum. Pour le diagnostic de SEP, une électrophorèse des protéines sériques peut être effectuée en parallèle pour montrer l'absence de syndrome inflammatoire ou de gammopathie.

4.2. Exploration biochimique quantitative du LCR.

4.2.1. Dosage de l'albumine.

4.2.1.1. Les différentes techniques de dosage et les valeurs normales.

Le dosage de l'albumine peut être réalisé à l'aide de deux techniques différentes : les méthodes immunochimiques (immunoturbidimétrie, immunonéphélométrie) et les méthodes colorimétriques (vert de bromocrésol, rouge de bromocrésol...).

Les techniques de dosage colorimétriques sont rapides, automatisées et reproductibles. Elles sont cependant soumises à de nombreuses interférences telles que la présence de lipides, de bilirubine ou de salicylé. Les méthodes immunochimiques sont plus coûteuses mais très spécifiques.

Les valeurs de l'albumine varient peu selon la méthode de dosage utilisée : l'albuminémie est comprise entre 42 et 55 g/L pour les hommes et entre 37 et 53 g/L pour les femmes. Les valeurs usuelles de l'albuminorachie varient de 145 à 250 mg/L.

4.2.1.2. Evaluation et signification du rapport albumine : Qalb.

La synthèse de l'albumine est strictement hépatique et il n'existe aucun mécanisme de production ou de catabolisme au niveau du SNC. Toute augmentation de l'albuminorachie est donc considérée comme le résultat d'une modification de la BHE entraînant un phénomène de transsudation (35).

Le Qalb est le rapport de la concentration en albumine du LCR sur la concentration en albumine sérique, exprimées dans les mêmes unités. Ce quotient permet d'évaluer l'état de la BHE.

Il varie en fonction de l'âge du patient : la perméabilité de la BHE diminue de la naissance à la première année de vie puis s'élève au-delà de 41 ans (36, 37).

- Nouveau-nés : $Qalb < 28.10^{-3}$,
- 1 à 40 ans : $Qalb < 5.10^{-3}$,
- 41 à 60 ans : $Qalb < 8.10^{-3}$,
- Plus de 60 ans : $< 9.10^{-3}$.

En 1993, Blennow a étudié le rapport QAlb de 105 personnes en bonne santé âgées de 18 à 88 ans. Ce travail a permis de mettre en évidence une augmentation du QAlb après 45 ans sans différence significative entre hommes et femmes. Cette altération "physiologique" de la BHE après 45 ans pourrait être liée à une diminution de production du LCR ou à un processus d'athérosclérose des petits vaisseaux cérébraux (38).

Au cours des SEP, le QAlb est normal ou faiblement augmenté tout en restant inférieur à 20.10^{-3} . Un $QAlb > 50.10^{-3}$ est surtout observé lors de méningite purulente ou d'encéphalite herpétique.

En 1996, Liebsch (39) compara le rapport QAlb et les images IRM de 48 malades en rechute de SEP et de 30 patients atteints de SEP stable. Cette étude avait mis en évidence une augmentation significative du QAlb et du nombre de lésions observées à l'IRM uniquement chez les patients en rechute. Les plaques actives présentes au sein de la substance blanche s'accompagnaient d'une atteinte de l'intégrité des vaisseaux siégeant à proximité de celles-ci. Cette modification de perméabilité vasculaire expliquerait l'augmentation du rapport QAlb.

4.2.2. Dosage des IgG, M et A.

4.2.2.1. Les différentes techniques de dosage et les valeurs usuelles.

Les IgG, M et A peuvent être dosées à l'aide de techniques d'immunoprécipitation en milieu liquide qui regroupent l'immunonéphélométrie et l'immunoturbidimétrie. Ces deux techniques sont les plus utilisées en routine. Elles sont onéreuses mais présentent l'avantage d'être automatisées, précises et très reproductibles (40).

Les valeurs usuelles des Igs sériques varient en fonction de l'âge. Elles sont présentées dans le tableau 4 :

	0 à 3 mois	3 mois à 1 an	Adulte
IgA (g/L)	0 – 0,2	0,15 – 1,1	0,7 - 4
IgM (g/L)	0,05 – 0,3	0,15 - 1	0,4 – 2,3
IgG (g/L)	7 - 16	2,5 - 5	7 - 16

Tableau 4 : Valeurs de référence des Igs sériques en fonction de l'âge (40).

Les valeurs normales des Ig G, M et A dans le LCR sont respectivement de 20 à 40 mg/L, de 0 à 0,45 mg/L et de 0 à 3 mg/L.

4.2.2.2. Intérêt de l'analyse biologique des IgM et des IgA dans le LCR.

En 2000, Reiber montrait que l'analyse biologique quantitative des IgG combinée à celles des IgM et des IgA pouvait aider au diagnostic des SEP. La majorité des malades présentaient un index IgG élevé qui était associé à un index IgM et IgA positif chez respectivement 25% et 9% des patients. Selon Reiber, une recherche de synthèse intrathécale d'IgM ou d'IgA pourrait être préconisée devant un index IgG négatif et un diagnostic de SEP suspecté (37).

L'analyse des IgM et des IgA reste cependant un examen de 2^{ème} intention et seul le calcul d'index IgG du LCR est réalisé en pratique courante.

Une autre étude menée en 2008 par Madrioli suggérait l'utilisation d'un index pronostic incluant la détection de bandes oligoclonales à IgM par isoélectrofocalisation. Cet indice appelé MPI (multifactorial prognostic index) englobe 3 critères : (41)

- Le délai écoulé entre la 1^{ère} et la 2^{ème} poussée,
- les symptômes observés en début de maladie,
- la présence ou non de bandes oligoclonales à IgM dans le LCR.

Ainsi, un délai court entre 2 poussées, l'apparition de troubles moteurs en début de maladie et la présence d'un profil oligoclonal des IgM dans le LCR constitueraient un facteur de mauvais pronostic avec le risque de développer une SEP sévère. A l'inverse, si le patient présentait à la phase initiale de la maladie des troubles sensitifs sans profil oligoclonal des IgM dans le LCR, le pronostic était plus favorable.

4.2.3. Dosage des chaînes légères (CL) libres d'Igs.

Le dosage des CL Kappa (κ) et Lambda (λ) s'effectue essentiellement par des techniques d'immunonéphélométrie et d'immunoturbidimétrie avec des antisérums spécifiques des CL (libres ou totales). Pour les CL totales, l'antisérum reconnaît un site des CL directement accessible lorsque celles-ci sont liées aux chaînes lourdes d'Igs. Pour les CL libres, l'antisérum est dirigé contre un site, correspondant à une région masquée des chaînes légères, qui ne devient accessible que lorsque celles-ci ne sont pas liées aux chaînes lourdes.

Dès 1970, Link et Zettervall observèrent une augmentation du rapport κ/λ des IgG dans le LCR de patients atteints de SEP alors que celui-ci était normal dans d'autres pathologies neurologiques telles la neurosyphilis, le syndrome de Guillain-Barré, les méningites ou les accidents vasculaires cérébraux (AVC) (42).

En 1991, Sindic *et al* démontrèrent que la présence de bandes oligoclonales de CL libres Kappa était plus fréquemment retrouvée que celles de CL libres Lambda dans le LCR de patients atteints de SEP. Parmi 48 malades, 92% présentaient un profil oligoclonal à CL libres Kappa, 83% à IgG et 69% à CL libres Lambda (43).

La détection de bandes oligoclonales de CL libres a également été étudiée par Krakauer *et al* en 1998 sur 237 patients. Dans ce groupe de malades, 50 étaient atteints de SEP, 69 de SEP probables et 118 présentaient une maladie non inflammatoire du SNC. Dans le LCR des patients atteints de SEP, il avait été retrouvé des bandes oligoclonales d'IgG, de Kappa libre

et de Lambda libre dans respectivement 92%, 92% et 86% des cas. Les profils oligoclonaux de type Lambda paraissent moins spécifiques pour le diagnostic de SEP car ils avaient été observés dans 8% des cas de maladies non inflammatoires du SNC contre 3% pour les IgG et les Kappa libres (44).

Cette étude et celle menée par Jenkins *et al* en 2001 suggèrent donc de rechercher des bandes oligoclonales de type IgG Kappa dans le LCR de patients dont le diagnostic de SEP est suspecté. Cette recherche permettrait d'augmenter la sensibilité des techniques de détection de synthèse intrathécale (45).

Enfin, la présence de profils oligoclonaux des CL libres de type Kappa dans le LCR de malades atteints de SEP a été décrite par Goffette *et al* en 2004. Cette étude incluait 33 patients dont le diagnostic de SEP était suspecté et qui ne présentaient pas de bandes oligoclonales IgG dans leur LCR. Un profil oligoclonal Kappa libre était retrouvé chez 18 patients (soit 54%) et 6 d'entre eux avaient des clichés IRM compatibles avec une SEP (46).

En 1998, Mehta *et al* ont étudié la présence de CL libres dans les urines de patients atteints de SEP. Bien que ce travail n'ait pas été concluant pour les formes progressives de la maladie, il a pu être démontré que dans le cas des formes récurrentes-rémittentes, les concentrations de CL libres urinaires de type Kappa étaient plus élevées en phase de poussées que pendant les phases de rémissions. Le dosage urinaire des CL libres constituerait ainsi un bon marqueur pour évaluer l'activité de la maladie et l'efficacité d'un traitement. De plus, cet examen présente l'avantage de ne pas être invasif et de pouvoir être réalisé régulièrement (47, 48).

4.2.4. Les différentes formules de détection de synthèse intrathécale.

La synthèse intrathécale d'IgG peut être évaluée à l'aide de formules mathématiques qui sont transposables aux IgM et aux IgA.

4.2.4.1. Index IgG ou index de Link. (49, 50)

$$\text{Index IgG} = \frac{\text{IgG}_{\text{LCR}}}{\text{IgG}_{\text{sérum}}} \times \frac{\text{Alb}_{\text{sérum}}}{\text{Alb}_{\text{LCR}}}$$

Les concentrations de l'albumine et des IgG sont exprimées en mg/L dans le LCR et en g/L dans le sérum. Les valeurs normales de cet index varient entre 0,3 et 0,7.

Un index supérieur à 0,7 témoigne d'une synthèse intrathécale d'IgG (36). Les valeurs seuils des index IgM et IgA sont respectivement de 0,061 et de 0,34.

4.2.4.2. *Le log index.* (51, 52)

Le log index est l'expression logarithmique de l'index de Link et les différentes concentrations de l'équation sont exprimées dans les mêmes unités que pour l'index IgG.

$$\text{Log index} = \text{Ln} \left[\frac{\text{IgG}_{\text{LCR}}}{\text{IgG}_{\text{sérum}}} \times \frac{\text{Alb}_{\text{sérum}}}{\text{Alb}_{\text{LCR}}} \right] + 1$$

Pour le log index, les valeurs normales varient de 0,16 à 0,52.

4.2.4.3. *Formule de Tourtelotte.* (50, 52, 53).

Cette formule détermine la synthèse des IgG en mg/24h (soit IgG tourt) et toutes les concentrations sont exprimées en mg/dL.

$$\text{IgG tourt} = \left[\left(\text{IgG}_{\text{LCR}} - \frac{\text{IgG}_{\text{sérum}}}{369} \right) - \left(\text{Alb}_{\text{LCR}} - \frac{\text{Alb}_{\text{sérum}}}{230} \right) \times \left(\frac{\text{IgG}_{\text{sérum}}}{\text{Alb}_{\text{sérum}}} \right) \times 0,43 \right] \times 5$$

Le quotient 369 correspond au rapport normalement obtenu entre les concentrations des IgG dans le sérum et dans le LCR. De la même manière, le quotient 230 est le rapport de l'albuminémie et de l'albuminorachie.

Les termes $(\text{IgG}_{\text{LCR}} - (\text{IgG}_{\text{sérum}} / 369))$ et $(\text{Alb}_{\text{LCR}} - (\text{Alb}_{\text{sérum}} / 230))$ expriment la différence de concentration obtenue en IgG ou en albumine dans le LCR par rapport à celle attendue.

Le terme $(\text{IgG}_{\text{sérum}}/\text{Alb}_{\text{sérum}})$ est un facteur de correction où il est supposé que les IgG et l'albumine traversent la BHE mole à mole. Le coefficient 0,43 correspond au rapport des PM de l'albumine et des IgG.

Enfin, le facteur 5 est le volume de LCR en dL formé en 24h.

La valeur normale se situe entre -9,9 et +3,3 mg/24h et une synthèse intrathécale est définie par IgG tourt supérieur à + 3,3 mg/24h.

4.2.4.4. Formule de Schuller. (50, 54, 55)

Cette formule détermine la synthèse intrathécale des IgG en mg/L soit SI IgG. Les unités des concentrations de l'albumine et des IgG du LCR sont en mg/L. Celles des IgG sériques sont en g/L.

$$SI \text{ IgG} = \text{IgG}_{\text{LCR}} - \left[30 + \left(\frac{(\text{Alb}_{\text{LCR}} - 240) \times \text{IgG}_{\text{sérum}}}{60} \right) \right]$$

$$SI \text{ IgG} = \text{IgG}_{\text{LCR}} - \left[30 + (\text{IgG Transsudées}) \right]$$

Le chiffre 30 correspond à la concentration normale moyenne des IgG du LCR et le chiffre 240, à la limite supérieure de la concentration de l'albumine du LCR. Le quotient 60 fait référence à la transsudation ; en effet, selon Schuller *et al* quand l'albumine augmente de 60 mg/L dans le LCR, les IgG transsudées augmentent de 10 mg/L soit environ 0,1% de la concentration en IgG sérique.

A partir de cette équation, toute valeur SI IgG positive montre la présence d'une synthèse intrathécale.

4.2.4.5. Formule et diagramme de Reiber. (35)

Cette formule détermine la fraction d'IgG, M ou A synthétisée localement au niveau du SNC en mg/L (soit IgX(loc)) et toutes les concentrations sont exprimées en mg/L.

$$\text{IgX}(\text{loc}) = \left[\text{QIgX} - \left(\frac{a}{b} \times \sqrt{(\text{Qalb}^2 + b^2)} + c \right) \right] \times \text{IgX}_{\text{sérum}}$$

Dans cette formule, les valeurs QIgX et QAlb représentent les rapports des concentrations des Igs et de l'albumine entre le LCR et le sérum. Les déterminants a/b, b² et c varient selon la classe d'Igs employée dans l'équation.

Reiber a établi une formule à partir d'un grand nombre d'observations, et montre que les rapports QIgG, QIgM et QIgA varient de manière hyperbolique avec le rapport QAlb. Il a ainsi créé un diagramme permettant de déterminer directement la fraction d'Igs synthétisée localement au niveau du SNC en positionnant le QIgX en ordonnée et le QAlb en abscisse sur une échelle logarithmique. Le Qlim est défini à partir d'un grand nombre d'observations et il

correspond aux index IgG, M ou A les plus élevés en dehors de toute synthèse intrathécale. Au-delà de cette limite, il existe une probabilité importante de détecter une synthèse intrathécale. (Figure 12)

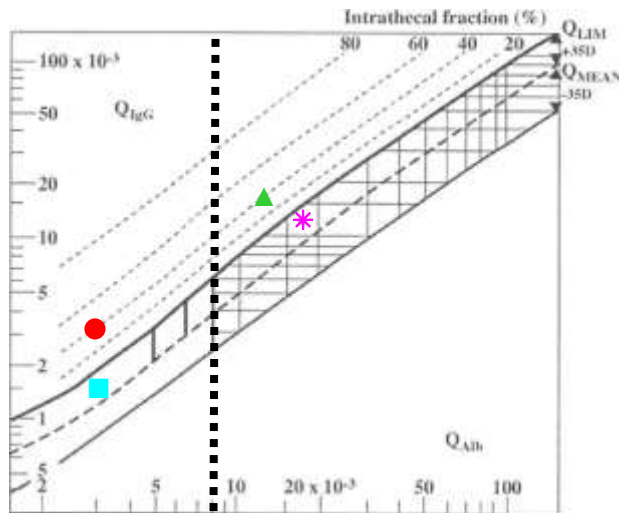


Figure 12 : Représentation logarithmique de la relation hyperbolique existant entre le rapport QIgG et le rapport QAlb selon la formule de Reiber (35, 36).

L'exploitation du diagramme nécessite de tracer au préalable une droite parallèle à l'axe des ordonnées et qui coupe l'axe des abscisses au niveau de la valeur limite normale du rapport QAlb en fonction de l'âge du patient. Ainsi, toutes les valeurs se situant à droite de cette limite mettent en évidence une altération de la BHE.

Pour une personne de 45 ans, la valeur limite normale du rapport QAlb est de 8.10^{-3} (.....). Les différentes positions sur le diagramme (Figure 12) permettent ainsi de mettre en évidence : une légère altération de la BHE avec détection d'une synthèse intrathécale (\blacktriangle), une détection de synthèse intrathécale sans altération de la BHE (\bullet), une légère altération de la BHE sans détection de synthèse intrathécale ($*$) et enfin, une absence de synthèse intrathécale avec une BHE normale (\blacksquare).

4.2.4.6. Formule de Blennow. (52)

La formule de Blennow définit la production intrathécale d'IgG en mg/L (soit IgGprod). Les concentrations de l'albumine et des IgG sont exprimées en mg/L dans le LCR et en g/L dans le sérum.

$$\text{IgG}_{\text{prod}} = \text{IgG}_{\text{LCR}} - \left[\frac{0,51 \times \text{Alb}_{\text{LCR}} \times \text{IgG}_{\text{sérum}}}{\text{Alb}_{\text{sérum}}} \right]$$

IgG_{prod} est la concentration en IgG dans le LCR moins la concentration en IgG du LCR attendue par diffusion au travers de la BHE. Le facteur 0,51 correspond au ratio des IgG et de l'albumine normalement transsudées au travers de la BHE.

Toute valeur positive obtenue à l'aide de la formule de Blennow témoigne de la présence d'une synthèse intrathécale.

4.2.4.7. Performances des formules.

Deux études menées par Blennow en 1993 (50) et en 1994 (52) avaient montré l'influence de l'atteinte de la BHE, évaluée par le QAlb , sur les résultats obtenus par les formules de Reiber, Schuller, Tourtelotte, Log IgG index, index de Link et IgG_{prod} .

La formule de Reiber sous-estimerait les index à cause de la relation hyperbolique des rapports QIgG et QAlb .

La formule de Schuller sous-estimerait également ces résultats suite à l'utilisation de constantes inadaptées et à l'absence de la valeur de l'albumine sérique dans l'équation. Schuller (55) avait montré en 1987 que l'albumine sérique était un facteur indépendant de la synthèse intrathécale et qu'il n'existait pas de corrélation entre l'albuminémie et l'albuminorachie ou les IgG du LCR. Donc selon cet auteur, l'inclusion de l'albumine sérique dans l'équation constituerait un risque de fausse positivité.

Selon Blennow (50), la formule de Tourtelotte utiliserait également des constantes inexactes qu'il modifia dans son étude (soit $\text{Tourt}_{\text{mod}}$) :

$$\text{Tourt mod} = \left[\left(\text{IgG}_{\text{LCR}} - \frac{\text{IgG}_{\text{sérum}}}{391} \right) - \left(\left(\text{Alb}_{\text{LCR}} - \frac{\text{Alb}_{\text{LCR}}}{199} \right) \times \left(\frac{\text{IgG}_{\text{sérum}}}{\text{Alb}_{\text{sérum}}} \right) \times 0,51 \right) \right] \times 5$$

Les quotients modifiés 391 et 199 correspondent respectivement aux rapports des concentrations normalement obtenus des IgG et de l'albumine entre le LCR et le sérum. Le facteur 0,43 est corrigé en 0,51 et il reflète le rapport des IgG et de l'albumine transsudées au travers de la BHE dans les conditions normales.

Cette modification a été apportée à partir d'une étude portant sur 125 individus en bonne santé, 106 patients atteints de SEP et 1072 malades (hors SEP) pour lesquels il n'existait

aucune bande d'IgG dans le LCR. Sur ces 1072 malades, 389 présentaient une altération de la BHE. Les résultats obtenus démontraient l'absence d'influence de la BHE sur la détection de synthèse intrathécale.

Les travaux de Blennow *et al* montraient que les formules Log IgG index, index de Link et IgGprod restaient les principales équations à utiliser pour une recherche de synthèse intrathécale ; une altération de la BHE n'influencerait pas les résultats et le risque de rendre des faux positifs serait minoré par rapport à l'utilisation des formules de Reiber, Schuller et Tourtelotte.

En pratique courante, notamment au laboratoire de biochimie du CHU de Pontchaillou, c'est l'index IgG qui est surtout employé.

De plus, cet index présente d'autres fonctions ; il peut par exemple être utilisé pour mettre en évidence une synthèse intrathécale d'Igs spécifiques dirigés contre des Ag viraux dans le LCR. Un index positif des Igs dirigés contre la rougeole, la rubéole et la varicelle a été démontré dans les années 90 par les équipes de Sindic (56) et Felgenhaeur (57). En 2005, Petereit *et al* étudièrent pendant environ 9 ans l'index d'Igs spécifiques de la rougeole chez 70 patients atteints de SEP. Ainsi, 75% des malades ayant de graves séquelles neurologiques suite à la maladie, présentaient un index Igs spécifique de la rougeole élevé. Cette étude apportait ainsi un élément nouveau sur l'apport de cet index dans le suivi et le pronostic de la SEP (58).

Les formules mathématiques utilisées pour caractériser une synthèse intrathécale d'IgG ne permettent cependant pas une détection totalement fiable de cette synthèse si elles sont utilisées seules. Selon les auteurs, la mise en évidence d'une production locale d'Igs dans le LCR grâce à ces formules n'est observée que dans 65 à 80% des cas de SEP. Ces outils apportent néanmoins un argument supplémentaire en faveur d'une synthèse intrathécale lorsque la mise en évidence de bandes oligoclonales est démontrée par des techniques qualitatives.

4.2.5. Les logiciels d'aide au diagnostic Protis® et SEPP®.

La firme Siemens® (ex Dade Behring®) commercialise deux logiciels d'aide au diagnostic pour la recherche de synthèse intrathécale : il s'agit de Protis® et SEPP®.

Ces outils permettent d'optimiser l'exploitation des résultats lors de l'exploration biologique du LCR. Ils calculent un index à l'aide des formules de Link, Tourtelotte ou Schuller puis ils positionnent les résultats du patient sur un diagramme selon son âge et son sexe en générant un commentaire.

Le logiciel Protis® utilise le diagramme de Reiber décrit précédemment (Cf. "Formule et diagramme de Reiber" chapitre 4.2.4.5.) et le logiciel SEPP®, le diagramme de Fateh-Moghadam qui n'est qu'une modification du diagramme de Reiber. Il définit 7 zones de probabilité de synthèse intrathécale et/ou de dysfonctionnement de la BHE. (Figure 13)

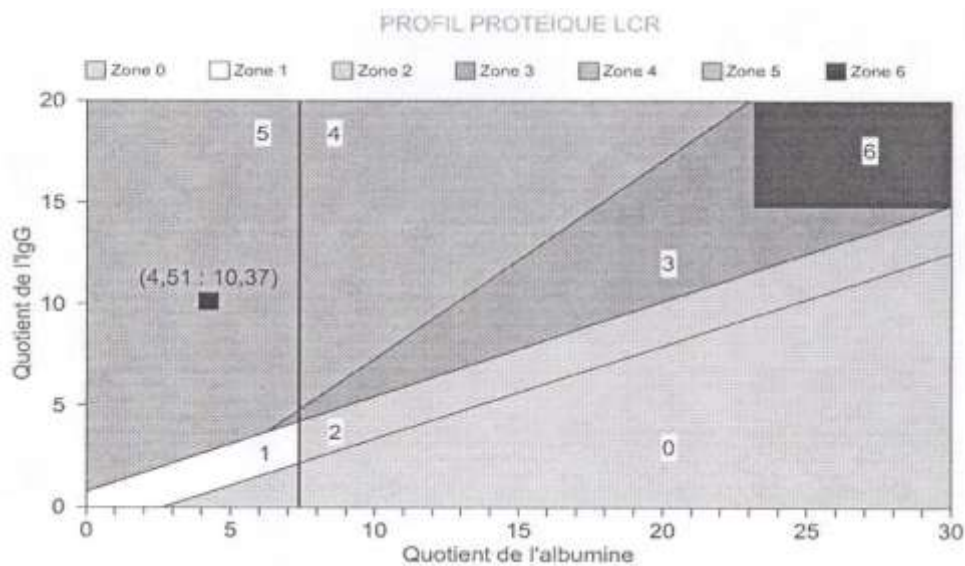


Figure 13 : Représentation schématique du diagramme de Fateh-Moghadam (36, 59).

Les différentes zones décrivent la présence ou non d'une altération de la BHE plus ou moins associée à une synthèse intrathécale : la zone 0 met en évidence une possible erreur méthodologique lors des différentes analyses ; la zone 1 ne caractérise aucune anomalie du LCR, la zone 2 suggère une légère altération de la BHE ; les zones 3 et 4 montrent une importante altération de la BHE avec une synthèse intrathécale d'Igs ; la zone 5 décrit une synthèse intrathécale d'Igs sans altération de la BHE ; enfin, la zone 6 montre un effondrement de la BHE rendant difficile l'interprétation de l'index IgG.

Les logiciels SEPP® et Protis® génèrent un graphique qui peut permettre au clinicien de mieux visualiser les résultats quantitatifs. Bien que les techniques quantitatives soient moins sensibles et spécifiques que les techniques qualitatives, elles informent rapidement le clinicien sur l'existence éventuelle d'une synthèse intrathécale qu'il pourra corréler aux résultats de l'IRM, des potentiels évoqués ou à la clinique.

Selon une étude réalisée par Gillain *et al* sur 270 patients, les sensibilités et spécificités respectives du logiciel SEPP® sont de 87% et 83% et celles du logiciel Protis®, de 76% et 97%. SEPP® serait plus sensible que Protis® mais il donnerait plus de faux positifs lors de contamination sanguine. SEPP® détecterait 75% de synthèse intrathécale contre 68% pour Protis® chez des patients présentant des bandes oligoclonales IgG dans leur LCR (36).

4.3. Exploration biochimique qualitative du LCR.

En 1935, Katzenelbogen mit en évidence une augmentation des gammaglobulines dans le LCR de patients atteints de SEP et non dans le sérum à l'aide d'une électrophorèse sur papier filtre (60).

Les électrophorèses haute résolution apparurent en 1950 ce qui permit d'améliorer fortement les performances analytiques de ces techniques. Depuis, de nombreuses méthodes ont été développées afin de mettre en évidence un profil anormal des immunoglobulines dans le LCR. L'isoélectrofocalisation reste à ce jour la technique la plus sensible et la plus spécifique.

4.3.1. Les électrophorèses conventionnelles.

4.3.1.1. Principe de l'électrophorèse et réalisation. (61)

Le phénomène d'électrophorèse désigne le déplacement d'une molécule chargée sous l'influence d'un champ électrique créé entre une anode (+) et une cathode (-), en veine liquide ou sur un support solide.

La vitesse de migration des molécules dépend de plusieurs paramètres :

- la charge globale de la molécule qui est influencée par le pH et la force ionique du milieu,
- la taille des particules,
- les différents facteurs liés au support (électroendosmose, potentiel de flux, effet Joule).

Les électrophorèses sur gel d'agarose sont les techniques les plus utilisées à ce jour. Ce support est préféré aux gels d'agar, d'acétate de cellulose, de polyvinyle ou de polyacrylamide qui est plus toxique et moins facilement manipulable (62).

Les électrophorèses sur gel d'agarose présentent de plus l'avantage d'être facilement réalisables à l'aide de kits prêts à l'emploi contenant gels, tampons et colorants.

La coloration des protéines après fractionnement électrophorétique, peut être effectuée avec des colorants acides (bleu ou violet de Coomassie, cristal violet, noir amide ou rouge Ponceau). Le seuil de détection de ces techniques de révélation est de l'ordre de 80 mg/L à 1,5 g/L d'IgG et il est par conséquent nécessaire de concentrer au préalable les LCR dont la concentration en IgG est inférieure au seuil minimal de détection (les IgG du LCR varient de 20 à 40 mg/L) (62).

La coloration des protéines peut également être réalisée à l'aide des ions argent Ag^{2+} qui se combinent aux résidus aminés. Cette technique apporte l'avantage de travailler sur du LCR non concentré mais sa durée de réalisation et son manque de reproductibilité la rende peu utilisée en pratique courante (63).

4.3.1.2. Interprétation des électrophorèses.

L'interprétation des électrophorèses dans le cadre de recherche de profils oligoclonaux des immunoglobulines nécessite une migration en parallèle du LCR et du sérum du patient qui doivent contenir la même concentration de protéines (64).

Une synthèse intrathécale sera caractérisée par la présence d'au moins deux bandes surnuméraires au niveau de la zone des gammaglobulines du LCR (65, 66).

Six profils électrophorétiques sont définis : profil normal ; profil transsudatif avec une zone de gammaglobulines homogène ; profil transsudatif avec une zone des gammaglobulines hétérogène (présence de bandes oligoclonales) ; profil oligoclonal avec des bandes surnuméraires dans la zone des gammaglobulines du LCR ; profil monoclonal avec des bandes identiques dans le LCR et le sérum ; profil d'interprétation difficile nécessitant une immunorévélation de la zone des gammaglobulines.

Cette technique reste peu sensible et peu spécifique pour le diagnostic de SEP. Elle est de plus d'interprétation difficile.

4.3.2. Les techniques d'immunofixation.

4.3.2.1. Principe de l'immunofixation.

L'immunofixation est une technique d'immunoprécipitation en gel. Sur les gels sont prédéfinies des pistes de migration électrophorétique sur lesquelles sont déposés les

échantillons. Après séparation électrophorétique des constituants du LCR (concentré ou non) et/ou du sérum, les différentes pistes sont incubées en présence d'antisérums spécifiques.

Deux procédures analytiques peuvent être réalisées :

- a - Technique en 2 temps : Analyse électrophorétique du couple LCR/sérum puis immunofixation sur le LCR à l'aide d'antisérums spécifiques (62, 67). Le LCR et le sérum sont tout d'abord analysés par une technique électrophorétique (Cf. "Les électrophorèses conventionnelles" chapitre 4.3.1.) afin de comparer les deux profils. Le LCR concentré est ensuite déposé sur 6 pistes en parallèle. La première permet d'obtenir le profil électrophorétique du LCR sans l'application d'antisérums spécifiques ; les cinq autres pistes apportent la caractérisation des éventuelles bandes présentes dans la zone des gammaglobulines à l'aide de différents antisérums marqués par une enzyme : anti-chaînes lourdes (α , μ et γ) et anti-chaînes légères (kappa totale et lambda totale). Les protéines sont révélées après l'ajout d'un substrat enzymatique chromogénique.
- b - Technique en 1 temps : Immunofixation à l'aide d'antisérums spécifiques après séparation électrophorétique du couple LCR/sérum (64). Le LCR et le sérum du patient sont déposés en parallèle. Ils contiennent les mêmes concentrations protéiques. L'antisérum spécifique d'une chaîne lourde (généralement anti- γ) ou d'une chaîne légère est ensuite appliqué. Cet antisérum est le plus souvent marqué par une enzyme (peroxydase) qui sera révélée par un substrat enzymatique chromogénique. Cette technique peut être semi-automatisée par l'utilisation d'un kit d'immunofixation prêt à l'emploi (HYDRAGEL 6 CSF SEBIA®) et elle présente une bonne praticabilité (68).

4.3.2.2. Interprétation des immunofixations.

L'utilisation d'antisérum spécifique permet une meilleure identification des bandes d'immunoglobulines et limite l'apparition d'artéfacts comme sur les électrophorèses qui pouvait amener à conclure à tort à un profil oligoclonal (62).

Dans la procédure (a), la technique d'immunofixation sur le LCR est réalisée après l'observation d'un profil électrophorétique différent au niveau de la zone des gammaglobulines du LCR et non retrouvé dans le sérum. Une synthèse intrathécale est démontrée par l'apparition de bandes au niveau des chaînes lourdes et/ou des chaînes légères d'immunoglobulines (69).

Dans la procédure (b), la migration des couples LCR/sérum en parallèle montre une synthèse intrathécale lorsqu'il y a la présence d'au moins une bande monoclonale dans le LCR non retrouvée dans le sérum ou lorsqu'il existe un décalage de migration entre les IgG du LCR et les IgG du sérum (67).

Les techniques d'immunofixation présentent respectivement une sensibilité et une spécificité de 90% et 94% pour la recherche de synthèse intrathécale (68).

4.3.3. Les techniques d'isoélectrofocalisation.

L'utilisation de technique de focalisation électrique visant à démontrer la présence d'un profil oligoclonal des immunoglobulines dans le LCR a été mentionnée pour la première fois en 1965 par Laterre (70).

Depuis la dernière conférence de consensus de 2005, cette analyse est devenue le "gold standard" pour la détection de synthèse intrathécale (27). Cette technique présente respectivement une sensibilité et une spécificité de 95% et 99% pour le diagnostic de synthèse intrathécale (68).

4.3.3.1. Principe de l'isoélectrofocalisation.

L'isoélectrofocalisation est une méthode de séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique. Le point isoélectrique (pI) ou potentiel hydrogène isoélectrique (pHi) est défini comme étant le pH pour lequel la charge d'une molécule est nulle.

Cette technique nécessite au préalable la création d'un gradient de pH au sein du support à l'aide d'ampholytes (mélange de petites molécules très mobiles formées de plusieurs groupements aminés et carboxyliques). Sous l'influence d'un champ électrique très élevé, les ampholytes acides sont attirés vers le pôle anodique et les ampholytes alcalins, vers le pôle cathodique. Il se crée ainsi un gradient de pH qui augmente de l'anode à la cathode (61). La gamme de pH et le voltage utilisés varient en fonction du type de protéines à séparer.

Les protéines déposées migrent selon leur charge vers l'anode ou la cathode au sein du gradient de pH jusqu'à ce qu'elles focalisent à l'endroit où le pH est égal à leur propre pHi, c'est-à-dire qu'elles ne migrent plus quand leur charge nette est nulle. Ceci permet ainsi d'obtenir des fractionnements très précis.

4.3.3.2. Les supports utilisés.

L'isoélectrofocalisation peut être mise en œuvre de deux façons :

- soit en milieu liquide dans une colonne,
- soit en milieu solide sur un gel de polyacrylamide (71-73) ou d'agarose (26, 65, 68, 74, 75).

L'isoélectrofocalisation en milieu solide est une technique plus utilisée en pratique courante. La performance des gels d'agarose et de polyacrylamide est identique pour la recherche de profils oligoclonaux dans le LCR (75). Cependant, le gel de polyacrylamide est toxique et présente plus de difficultés techniques (27, 74).

4.3.3.3. Techniques de révélation des protéines.

La coloration des gels peut être réalisée à l'aide du bleu de Coomassie (75) ou des ions argent (76). Afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité des techniques d'isoélectrofocalisation, d'autres procédures de révélation ont été développées, transfert sur membrane avec immunomarquage (26, 68, 74) ou immunofixation (75, 77) qui permettent ainsi l'analyse de LCR non concentré.

Les techniques d'immunomarquage peuvent être réalisées à l'aide d'antisérums le plus souvent marqués par une enzyme (phosphatase alcaline (68) ou peroxydase (65)) ou par le système avidine-biotine. L'immunofixation nécessite l'utilisation d'antisérum anti-chaînes lourdes des IgG (anti- γ) couplé à une enzyme (généralement la peroxydase) (77).

Dans les deux cas, la révélation du complexe s'effectue grâce à l'ajout d'un substrat enzymatique chromogénique.

4.3.3.4. Interprétations des isoélectrofocalisations.

Il s'agit de comparer les profils du LCR et du sérum (64). La recherche de synthèse intrathécale par isoélectrofocalisation se définit par la présence d'au moins deux bandes dans le LCR et non retrouvées dans le sérum.

Une bande unique supplémentaire dans le LCR, et absente à la même position dans le sérum correspondant, évoque une suspicion de synthèse intrathécale et pourra nécessiter un nouveau prélèvement de contrôle selon les résultats obtenus à l'IRM ou aux potentiels évoqués.

Le consensus international distingue 5 types de profils des IgG (27) (Figure14) :

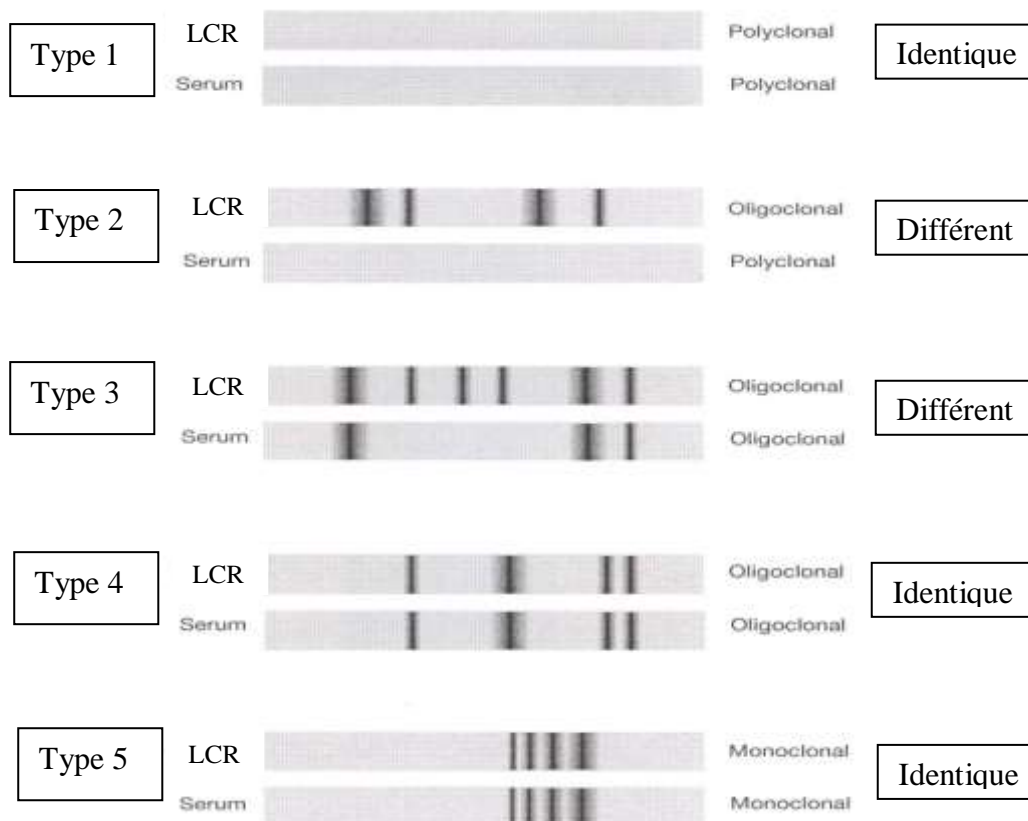


Figure 14 : Représentations des 5 types de profils observés dans le LCR et le sérum (77).

- **Type 1** : type normal qui correspond à une absence de bandes dans le LCR et dans le sérum.
- **Type 2** : profil oligoclonal dans le LCR non retrouvé dans le sérum ce qui prouve une synthèse intrathécale.
- **Type 3** : profil oligoclonal dans le LCR et dans le sérum avec des bandes surnuméraires dans le LCR ; signe d'une synthèse intrathécale dans une réaction immunitaire systémique.
- **Type 4** : bandes identiques dans le LCR et dans le sérum (image en miroir) résultant d'une filtration passive d'IgG du sang vers le LCR sur fond de processus immunitaire systémique sans synthèse intrathécale d'IgG.
- **Type 5** : une paraprotéine (immunoglobuline monoclonale) est dissociée en plusieurs bandes très voisines à la focalisation isoélectrique qui sont retrouvées dans le LCR et dans le sérum. Il n'y a pas de synthèse intrathécale d'IgG.

Les types 2 et 3 traduisent une synthèse intrathécale d'IgG.

A l'inverse, les types 4 et 5 reflètent un phénomène d'hyperimmunisation systémique périphérique. Le type 4 est généralement observé au cours d'infections chroniques et de maladies inflammatoires systémiques. Le type 5 met en évidence une immunoglobuline monoclonale et il est observé dans les gammopathies monoclonales dites bénignes (MGUS) ou malignes (Maladie de Kahler ou de Waldenström).

Il est à noter que le nombre de bandes observées dans un profil oligoclonal ne corrèle pas obligatoirement avec la sévérité ou le pronostic de la SEP. Pour cette raison, le nombre de bandes ne doit pas être pris en compte afin d'éviter toute fausse interprétation (77, 78, 79).

4.3.3.5. Recommandations sur la technique d'isoélectrofocalisation pour la recherche de synthèse intrathécale selon le consensus de 2005.

L'isoélectrofocalisation couplée à un immunotransfert est considérée comme la technique de référence pour la mise en évidence d'un profil oligoclonal de LCR depuis les conférences de consensus de 1994 (80) et 2005 (27).

Douze recommandations concernant l'analyse du LCR pour le diagnostic de SEP ont été établies lors du consensus : (27)

- 1- L'isoélectrofocalisation couplée à l'immunodétection (transfert ou immunofixation) est la technique la plus informative et la plus fiable pour la recherche de synthèse intrathécale.
- 2- Cette analyse peut être appliquée à des prélèvements de LCR non concentré. Le LCR et le sérum doivent être évalués en parallèle pour permettre la comparaison des deux profils.
- 3- Le LCR et le sérum doivent être analysés aux mêmes concentrations d'IgG pour permettre une bonne comparaison des profils.
- 4- L'utilisation de contrôle négatif et de contrôle positif avec les échantillons à analyser est conseillée.

- 5- Le compte rendu de l'analyse qualitative doit être basé sur l'un des 5 profils types décrits précédemment.
- 6- Une certaine expérience de la technique est nécessaire aux biologistes pour interpréter les différents profils.
- 7- Les neurologues doivent prendre en considération toutes les autres analyses effectuées sur le LCR (par exemple : cytorachie, protéinorachie, glycorachie...).
- 8- Dans certains cas, l'immunodétection de chaînes légères kappa ou lambda peut être réalisée devant un profil oligoclonal des IgG douteux.
- 9- Une 2^{ème} ponction lombaire pourra être réalisée s'il existe une forte suspicion clinique de SEP et que le profil oligoclonal des IgG du LCR est négatif, douteux ou ne révèle qu'une seule bande.
- 10- Les techniques d'analyse quantitatives constituent un complément informatif et elles ne se substituent pas aux méthodes qualitatives qui sont beaucoup plus sensibles et spécifiques.
- 11- En cas d'utilisation d'équations mathématiques non linéaires pour la recherche de synthèse intrathécale, il faut s'assurer d'une absence d'altération de la BHE évaluée par le rapport albumine QAlb.
- 12- Les laboratoires effectuant l'analyse des LCR doivent posséder leur propre contrôle de qualité interne. Les contrôles de qualité externe sur le plan national ne sont pas commercialisés en France. En effet, l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) ne délivre pas ces contrôles compte tenu d'une trop faible proportion de laboratoire français effectuant ces analyses.

5. MATERIELS ET METHODES.

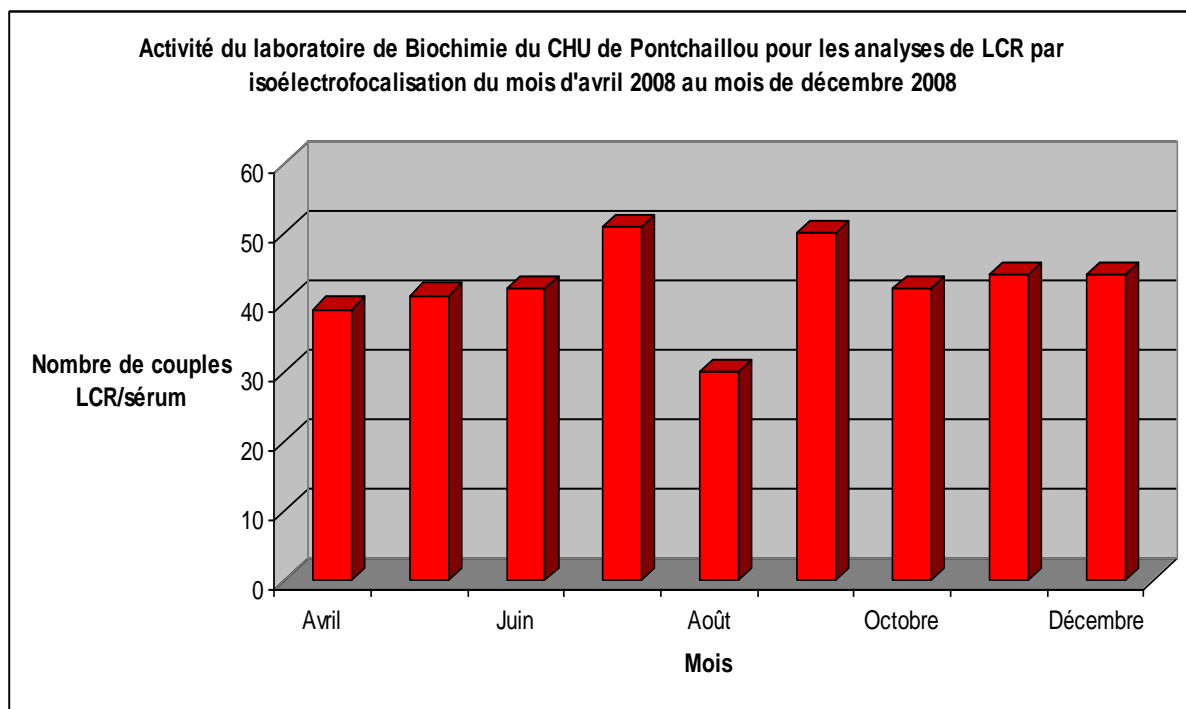
5. MATERIELS ET METHODES.

5.1. Les patients.

5.1.1. Description du groupe d'étude.

L'inclusion des patients a débuté en avril 2008 lors de la mise en place de la technique d'isoélectrofocalisation pour l'analyse du profil des IgG dans le LCR au laboratoire de biochimie du CHU de Pontchaillou. Elle s'est poursuivie jusqu'à fin décembre 2008.

Lors de cette période, 383 couples LCR/sérum ont été analysés soit environ 43 analyses par mois (Graphique 1).



Graphique 1 : Représentation graphique évaluant l'activité du laboratoire de Biochimie du CHU de Pontchaillou pour la recherche de synthèse intrathécale d'IgG dans le LCR du mois d'avril 2008 à fin décembre 2008.

Ces prélèvements ont été effectués chez 371 patients : huit patients ont bénéficié de 2 analyses et deux patients en ont eu 3. Ce groupe d'étude est constitué de 206 femmes et de 165 hommes avec un sex-ratio femme/homme de 1,25. Le patient le plus jeune était âgé de 2 ans et le plus âgé, de 87 ans. L'âge moyen était de 46,6 ans tout sexe confondu avec un écart type de 18,37.

Les demandes d'analyse de LCR pour la recherche de synthèse intrathécale provenaient dans 66,8% des cas du service de Neurologie du Pr EDAN, neurologue au CHU de Pontchaillou (tableau 5).

SERVICES CLINIQUES	NOMBRE DE DEMANDES
Neurologie	256
Envoi de laboratoires extérieurs (CH de Saint-Malo et CH de Fougères)	71
Ophtalmologie	16
Médecine interne	15
Nourrissons/Pédiatrie Grands enfants/Accueil pédiatrique	9
Maladies infectieuses	4
Accueil médecine	2
Unités soins et traitements	2
Neurochirurgie	2
Cancérologie	2
Réanimation	1
Pneumologie	1
Maternité	1
ORL	1
TOTAL	383

Tableau 5 : Répartition du nombre de demandes de recherche de synthèse intrathécale d'IgG dans le LCR selon les services cliniques.

Lors de cette étude, 61 autres patients ont été inclus afin de réaliser une analyse rétrospective permettant de comparer la technique d'immunofixation précédemment utilisée au laboratoire et celle d'isoélectrofocalisation.

Il s'agit de 18 patients dont les couples LCR/sérum avaient été analysés en 2006 au laboratoire par la technique d'immunofixation HYDRAGEL 6 CSF de Sébia® et de 43 patients dont le LCR et le sérum avaient été analysés par cette même technique au laboratoire du Centre Hospitalier (CH) de Saint-Brieuc. Ces prélèvements étaient ensuite envoyés au laboratoire de Biochimie de Rennes dans le cadre de ce travail, lorsque le diagnostic de SEP était suspecté ou que la présence d'une synthèse intrathécale était douteuse.

Cette étude rétrospective permet donc l'analyse de 62 couples LCR/sérum (un patient a bénéficié de 2 analyses). Ces 61 patients sont répartis en 34 femmes et 27 hommes (sex-ratio femme/homme de 1,26). L'âge moyen est de 45,4 ans tout sexe confondu (écart type = 13,88) avec un âge minimum de 19 ans et un maximum de 88 ans.

Au total, cette étude comprend 445 couples LCR/sérum dont les prélèvements ont été réalisés chez 432 patients. Ces patients se répartissent en 240 femmes et 192 hommes (sex-ratio femme/homme de 1,25).

5.1.2. Les prélèvements.

La comparaison des profils des IgG du LCR et du sérum est obligatoire et nécessite que le LCR et le sérum soient prélevés le même jour.

Le LCR est recueilli par ponction lombaire dans un tube stérile, et le sang par ponction veineuse dans un tube sec. Les prélèvements (le LCR est un liquide précieux) doivent être amenés le plus rapidement possible au laboratoire à température ambiante.

Le tube sec est centrifugé à 3700 tours/minute (3000 g) pendant 10 minutes puis, le sérum est décanté. Le tube de LCR est aliquoté en microtubes puis centrifugé à 8000 tours/minute (6800 g) pendant 10 minutes afin d'éliminer la présence éventuelle d'hématies. Ces échantillons sont ainsi conservés une semaine entre 2 et 8°C ou congelés à -80°C.

Un volume minimum de 450 µL de LCR et de sérum est nécessaire afin de réaliser l'ensemble des analyses.

5.1.3. Classification clinique des patients.

Les dossiers cliniques des différents patients inclus dans ce travail ont été étudiés. Ceux-ci ont permis de classer le groupe d'étude en 4 catégories :

- La catégorie "SEP" regroupe deux sous-types : les patients atteints de SEP et ceux dont le diagnostic est fortement suspecté. Le premier sous-type réunit les critères diagnostiques de dissémination temporelle et spatiale de Mc Donald *et al* (30). En revanche, les patients inclus dans le deuxième sous-type ne présentaient que les signes de dissémination spatiale. Les résultats de la 2^{ème} IRM pour conclure ou non à une SEP n'étaient pas encore obtenus à l'issue de ce travail.
- La catégorie "Pathologie inflammatoire du SNC et du système nerveux périphérique hors SEP" (soit PI) englobe un grand nombre de pathologies : les infections du système nerveux d'origine bactérienne, virale, parasitaire ou auto-

immunes ; les tumeurs ; les neurosarcoïdoses ; les myélites ; les polyneuropathies ou les polyradiculonévrites.

- La catégorie "Pathologie non inflammatoire du système nerveux" (soit PNI) englobe les pathologies dégénératives (démence, Alzheimer, Parkinson) et vasculaires (accident vasculaire cérébral, accident ischémique transitoire). Les états de mal épileptique, les migraines, les hémopathies, les douleurs lombaires, les troubles psychologiques ou les malaises vagues sont également inclus dans ce groupe.
- La catégorie "Syndrome isolé" regroupe 3 sous-types différents : les patients qui présentaient un syndrome neurologique inexpliqué et/ou isolé ; ceux dont le dossier clinique n'avait pas été retrouvé ; enfin ceux dont les prélèvements venaient d'hôpitaux extérieurs et dont le diagnostic n'a pu être obtenu.

5.2. Analyses effectuées au laboratoire de biochimie du CHU de Pontchaillou.

Au laboratoire, les analyses quantitatives comprennent les dosages des protéines totales, de l'albumine et des IgG dans le sérum et dans le LCR. Les dosages des Ig A et M sériques sont également effectués mais ils ne seront pas abordés dans ce chapitre.

Les analyses qualitatives font appel à deux types de technique qui seront détaillés dans ce travail : immunofixation et isoélectrofocalisation sur les appareils Hydrasis Focusing Sébia®

5.2.1. Les dosages.

5.2.1.1. Dosages des protéines sériques totales.

Au laboratoire le dosage des protéines totales sériques s'effectue sur l'automate Olympus AU 2700® avec le réactif "Total protein" Olympus®. Le dosage est basé sur le principe de Biuret par réaction de photolorimétrie : les protéines et les polypeptides comprenant un minimum de deux liaisons peptidiques réagissent avec les ions cuivriques en solution alcaline et forment un complexe de couleur violette (81).

L'absorbance du complexe à 540 nm est directement proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon.

La calibration s'effectue avec le calibrateur "System calibrator" Olympus® qui est un sérum humain modifié de concentration connue en différents métabolites, ions et enzymes. Ce

réactif est fourni sous forme lyophilisée. Une calibration doit être effectuée à chaque changement de réactif et en cas de mauvais résultat des contrôles de qualité interne. La réaction est linéaire pour une concentration comprise entre 30 et 120 g/L de protéines totales. Les valeurs usuelles du laboratoire sont comprises entre 60 et 83 g/L.

Les contrôles de qualité internes sont réalisés quotidiennement. Ils peuvent être renouvelés après un changement de réactif ou une calibration.

Le contrôle "Liquid unassayed multiquant" de Biorad® existe en trois niveaux (valeurs basses, normales et hautes). Il est constitué de sérum non titré permettant ainsi de surveiller la précision des tests réalisés en laboratoire.

Un autre type de contrôle interne, le "Liquichek immunology control" de Biorad®, comportant également 3 niveaux, est utilisé une à deux fois par semaine. Contrairement au précédent, il est constitué de sérum humain titré

Le contrôle de qualité externe est un contrôle Randox® qui est réalisé une fois par semaine et qui permet de visualiser le résultat obtenu par rapport à d'autres laboratoires au niveau national.

5.2.1.2. Dosages des protéines totales du LCR.

Au laboratoire, le dosage des protéines totales du LCR s'effectue sur Olympus AU 2700® avec le réactif "Urinary/CSF protein" Olympus®. Le dosage est réalisé par une technique photolorimétrique. Le réactif contient du rouge de pyrogallol et du molybdate de sodium qui se combinent pour former un complexe rouge. Ce complexe présente une absorbance maximale à 470 nm et il se lie aux protéines pour former un complexe violet qui possède alors une absorbance maximale à 600 nm. La concentration en protéines de l'échantillon est ainsi proportionnelle à l'absorbance mesurée à 600 nm (82).

La calibration s'effectue avec le calibrateur "Urinary/CSF Protein calibrator" Olympus®. La réaction est linéaire pour une concentration comprise entre 0,01 et 2g/L. Les valeurs usuelles de la protéinorachie au laboratoire sont comprises entre 0,15 et 0,4 g/L.

Les contrôles de qualité interne des protéines totales du LCR sont réalisés avec le kit "Liquichek urine chemistry control" de Biorad® qui possède deux niveaux de contrôle. Ils sont passés sur Olympus AU 2700® en début de journée puis après chaque changement de réactif ou après une nouvelle calibration.

5.2.1.3. Dosage de l'albumine sérique.

Le dosage de l'albumine s'effectue sur Olympus AU 2700® avec le réactif "Microalbumin" Olympus®. Le réactif "Microalbumin" est habituellement utilisé pour doser l'albumine dans les urines et dans le LCR, liquides où les concentrations sont beaucoup plus faibles que dans le sérum. Afin d'obtenir une meilleure sensibilité que par la technique colorimétrique classique au vert de bromocrésol, principalement pour des valeurs basses d'albumine sérique, le paramétrage du test a été modifié sur l'automate pour rendre le dosage possible dans le sérum.

Il s'agit d'un test immunoturbidimétrique. L'antigène à doser réagit de manière spécifique avec les Ac anti-albumine humaine contenus dans le réactif. Cette réaction génère des immun-complexes insolubles dont l'absorbance est directement proportionnelle avec la concentration en albumine de l'échantillon (83).

Les calibrateurs et les contrôles de qualité sont les mêmes que ceux utilisés pour les protéines totales sériques. (Cf. "Dosage des protéines totales sériques" chapitre 5.2.1.1.) Les limites de linéarité pour cette technique sont de 15 à 60 g/L et les valeurs normales du laboratoire sont comprises entre 35 et 50 g/L.

5.2.1.4. Dosage des IgG sériques, de l'albumine et des IgG du LCR.

Ces dosages s'effectuent sur l'automate BNII de Siemens® (ex Dade Behring®). Cet appareil est un système multiparamétrique d'analyse par néphélométrie à source laser. Le laser émet une radiation à 840 nm et il fournit une source lumineuse à la fois énergétique et monochromatique qui atteint une cuve de mesure contenant les Ag de l'échantillon (Albumine ou IgG à doser) mis en contact avec une quantité constante d'Ac spécifique.

Les complexes Ag-Ac ainsi formés diffusent la lumière qui sera alors observée et mesurée dans un angle compris entre 13 et 24° par rapport à la lumière incidente. Le signal lumineux est converti en signal électrique qui est directement proportionnel à la concentration en Ag (Figure 15) (84).

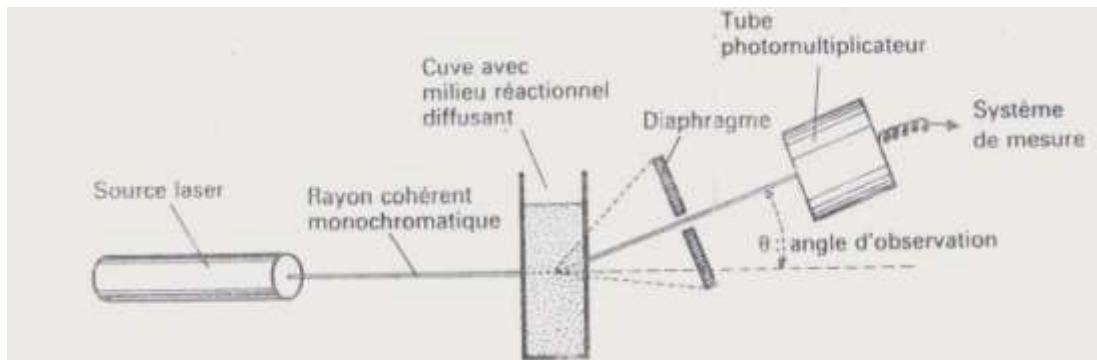


Figure 15 : Représentation d'un appareil à néphélométrie à source laser (61).

Les réactifs utilisés sont :

Pour l'albumine du LCR, le "N Antisérum anti-albumine humaine" de Siemens®. Il s'agit d'un réactif prêt à l'emploi constitué de sérum liquide d'origine animale produit par immunisation de lapin avec de l'albumine humaine hautement purifiée.

Pour les IgG du sérum et du LCR, le "N Antisérum anti-IgG humaines" de Siemens®. Il est constitué d'Igs anti-IgG, obtenues après immunisation de lapin avec des IgG humaines hautement purifiées.

Les valeurs usuelles utilisées au laboratoire sont les suivantes :

- Albuminorachie : de 100 à 240 mg/L,
- IgG sérique : de 6,1 à 14 g/L,
- IgG LCR : de 20 à 40 mg/L.

La calibration du BNII pour ces différents dosages est réalisée avec le calibrateur "N/T Standard proteins" de Siemens®. Il est préparé à partir de sérums humains et est présenté sous forme lyophilisée.

Les contrôles internes sont analysés systématiquement sur le BNII deux fois par jour puis après chaque changement de réactif ou lors d'une nouvelle calibration.

Les contrôles pour les IgG sériques sont "Biorad® Immunology" composés de 3 niveaux qui sont passés alternativement. Les contrôles "Biorad® Spinal Fluid" de niveau 1 et 2 sont utilisés pour les dosages des IgG et de l'albumine du LCR.

Les contrôles de qualité externe Randox® "Riquas specific proteins" sont réalisés tous les 15 jours.

5.2.1.5. Expression des analyses quantitatives au laboratoire.

Lors de la lecture des plaques d'isoélectrofocalisation, les biologistes analysent en parallèle les résultats des différents dosages obtenus, le rapport QAlb et l'index de Link. Les concentrations sériques sont exprimées en g/L et celles du LCR en mg/L.

Au laboratoire de biochimie du CHU de Pontchaillou, toute augmentation de la protéinorachie ou du rapport QAlb est considérée comme une altération de la BHE. Les valeurs usuelles du QAlb du laboratoire sont les suivantes :

- de 0 à 20 ans : $< 0,4.10^{-2}$,
- de 21 à 40 ans : $< 0,6.10^{-2}$,
- de 41 à 60 ans : $< 0,8.10^{-2}$.

L'index IgG ou index de Link est calculé au laboratoire et est rendu positif pour une valeur supérieure à 0,65.

5.2.2. Les analyses qualitatives.

Le laboratoire de Biochimie est équipé d'un système semi-automatique Hydrasis Focusing de Sébia® (Ref. 1212) permettant de réaliser les isoélectrofocalisations des couples LCR/sérum à l'aide du kit HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING.

La technique d'immunofixation (HYDRAGEL 6 CSF) peut également être effectuée sur ce même appareil et elle est encore réalisée au laboratoire de biochimie du CH de Saint-Brieuc.

5.2.2.1. Immunofixation HYDRAGEL 6 CSF SEBIA®. (85)

5.2.2.1.1. Principe.

Cette technique s'effectue en deux étapes :

- Electrophorèse des protéines sur gel d'agarose,
- immunoprécipitation des IgG avec des Ac anti-IgG conjugués à la peroxydase.

Le LCR et le sérum d'un même patient sont déposés en parallèle sur le gel d'agarose afin de comparer les profils des IgG et de pouvoir mettre en évidence une synthèse intrathécale.

Ce kit permet la migration de 6 couples LCR/sérum sur le même gel et aux mêmes concentrations en IgG. La révélation enzymatique permet d'augmenter la sensibilité de détection des profils oligoclonaux des IgG par rapport aux colorations protéiques classiques ce qui autorise l'utilisation de LCR non concentré.

5.2.2.1.2. Mode opératoire.

- Réactifs et matériels nécessaires.

- Kit "HYDRAGEL 6 CSF" de Sébia® contenant entre autre gels d'agarose prêts à l'emploi, tampons, réactifs et accessoires à usage unique (Ref. 4851)
- Antisérums anti-IgG PER Sébia® : Igs totales de mammifères anti-IgG humaines conjuguées à la peroxydase (Ref. 4743).
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 110 volumes.
- Masque CSF Sébia® qui permet de délimiter les 12 pistes du gel pour appliquer l'antisérums et masque 2 Sébia® qui permet la révélation enzymatique de la plaque (Ref. 1262).

- Préparation des échantillons.

Une concentration à 10 mg/L d'IgG dans le LCR et dans le sérum est préconisée pour cette technique. Pour le LCR, les dilutions à réaliser sont décrites dans le tableau 6:

Concentration en IgG en mg/L (soit A)	LCR (µL)	Diluant échantillon (µL)
> 20	10	A-10
De 20 à 16	20	2A-20
De 15 à 11	30	3A-30
< 11	20	0

Tableau 6 : Procédure de dilution du LCR selon la concentration en IgG pour la technique d'IFIX.

Pour le sérum, soit B (en mg/L) la concentration en IgG. Une première dilution au 1/20^e est réalisée et à 2 µL de cette prédilution, sont ajoutées [(B/100) – 2] µL de diluant échantillon.

- Migration et immunofixation.

Quinze microlitres de chaque échantillon sont déposés dans les puits de l'applicateur (Figure 16 A). Après 15 minutes en chambre sèche, le chariot porte-électrodes, un gel d'agarose et l'applicateur sont ensuite positionnés sur l'appareil (Figure 16 B, C et D). Une migration est ensuite effectuée pendant 20 min à 20Watts.

Après la migration, l'antisérum est appliqué pendant 10 minutes à 20°C sur la plaque à l'aide du masque adéquate (Figure 16 E et F).

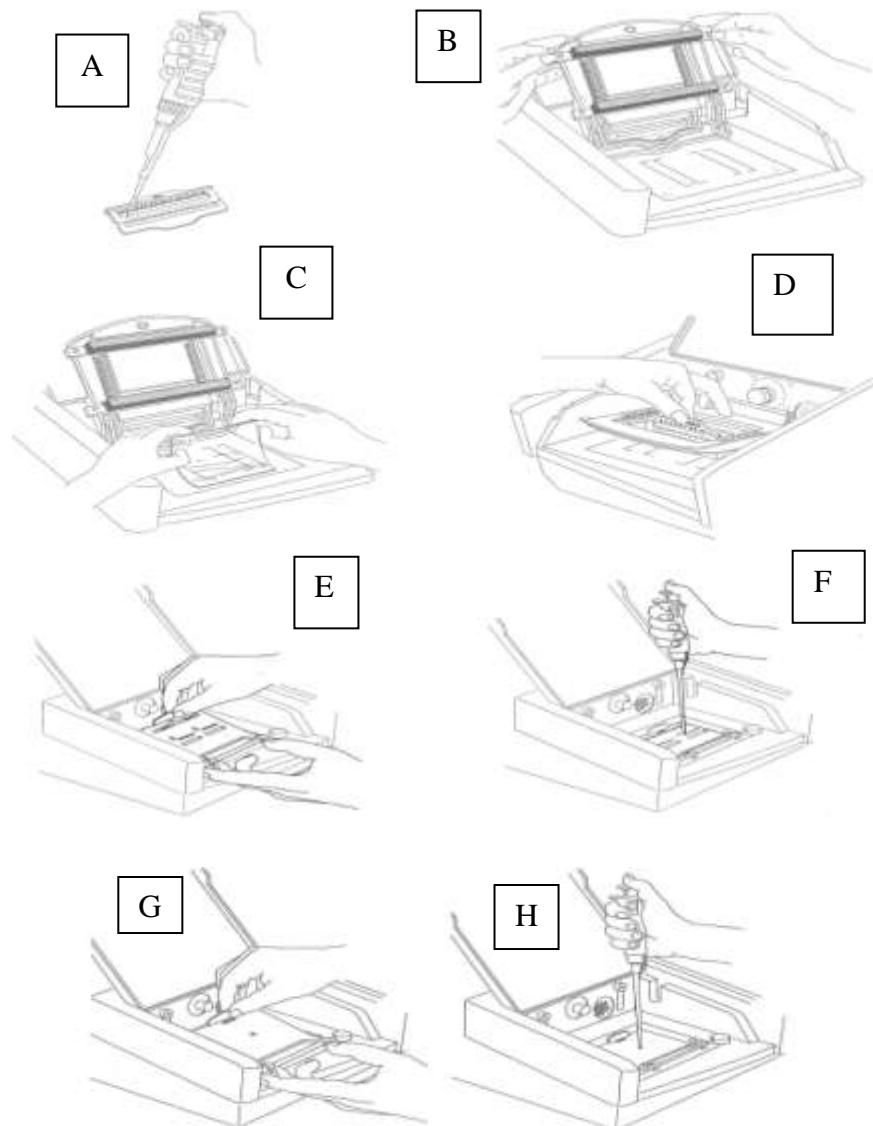


Figure 16 : Mode opératoire de la technique d'immunifixation du LCR sur Hydrasys Sébia®. A : Dépôt des échantillons ; B : Mise en place du chariot porte-électrodes ; C : Mise en place du gel ; D : Mise en place de l'applicateur ; E : Mise en place du masque CSF Sébia® ; F : Dépôt des antisérums ; G : Mise en place du masque 2 CSF et H : Application du révélateur enzymatique (85).

- Révélation du gel

La solution de révélation enzymatique composée de TTF3 dilué et de H₂O₂, est appliquée sur le gel pendant 15 minutes à 30°C (figure 16 G et H). Le gel est enfin séché à 50°C pendant 3 minutes.

5.2.2.1.3. Performance de la technique.

Cette technique dure 2h30 hors étape de préparation de dilution des échantillons.

La lecture de la plaque de migration s'effectue à l'œil nu et elle peut être facilitée à l'aide d'un négatoscope.

Une synthèse intrathécale correspond à un profil différent des IgG dans le LCR c'est-à-dire présence d'une ou plusieurs bandes d'Igs non visualisées dans le sérum ou décalage de migration des IgG.

Trois types de profils électrophorétiques peuvent être observés :

- Profil en faveur d'une synthèse intrathécale : le profil du LCR présente au moins une bande qui n'est pas retrouvée dans le sérum.
- Profil douteux : Le profil de migration polyclonal du LCR est "décalé" et est plus anodique ou cathodique tandis que celui du sérum est polyclonal. On suspecte une synthèse intrathécale.
- Profil n'étant pas en faveur d'une synthèse intrathécale : les profils du LCR et du sérum sont superposables (polyclonaux, monoclonaux ou oligoclonaux).

5.2.2.2. Isoélectrofocalisation **HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING** **SEBIA®**. (77)

5.2.2.2.1. Principe.

Cette technique s'effectue en 3 étapes :

- Préfocalisation du gel contenant les ampholytes afin de créer un gradient de pH,
- isoélectrofocalisation des protéines du LCR et du sérum,
- immunofixation avec un antiserum anti-IgG conjugué à la peroxydase.

De la même façon que pour la technique Immunofixation HYDRAGEL 6 CSF de Sébia®, des échantillons de LCR et de sérum sont déposés en parallèle sur le gel, ce qui permet l'analyse simultanée de 9 couples LCR/sérum. Au laboratoire de biochimie du CHU de Pontchaillou, deux pistes sont réservées à un contrôle positif.

Cette technique est en accord avec les différentes recommandations de la dernière conférence de consensus pour la recherche de synthèse intrathécale : isoélectrofocalisation des IgG suivie d'une immunofixation, dépôt de LCR non concentré et concentrations identiques en IgG du sérum et du LCR (27).

5.2.2.2.2. Mode opératoire.

- Réactifs et matériels nécessaires.

- Kit "HYDRAGEL 9 ISOFOCUSING" de Sébia® contenant entre autre, gels d'agarose prêts à l'emploi, tampons, réactifs et accessoires à usage unique (Ref. 4355).
- Antisérums anti-IgG PER Sébia® : Igs totales de mammifères anti-IgG humaines conjuguées à la peroxydase (Ref. 4743).
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 110 volumes.
- Masque dynamique Sébia® qui permet d'appliquer l'antisérum sur la totalité du gel et masque rehydratant CSF Sébia® pour le dépôt du révélateur enzymatique (Ref. 1258).

- Préparation des échantillons.

La concentration de dépôt recommandée est de 20 mg/L d'IgG. La technique peut néanmoins être réalisée pour des concentrations comprises entre 10 et 20 mg/L.

Pour le LCR, les dilutions à réaliser sont décrites dans le tableau 7 :

Concentration en IgG du LCR en mg/L (soit A)	Quantité de LCR	Quantité de diluant échantillon CSF
> 20	20	A-20
≤ 20	20	0

Tableau 7 : Procédure de dilution du LCR selon la concentration en IgG pour la technique d'IEF.

Pour le sérum, une première dilution est effectuée au 1/10^e. Une quantité de diluant échantillon, dont les modalités de calcul sont décrites dans le tableau 8, est ensuite ajoutée à 2 µL de cette prédilution en fonction de la concentration des IgG du LCR.

Concentrations des IgG du LCR (mg/L)	Diluant échantillon en µL (Soit B la concentration des IgG sériques)
> 20	(B/100) - 2
< 20	$\left(\frac{\text{IgG}_{\text{sérum}} \text{ (mg/L)}}{\text{IgG}_{\text{LCR}} \text{ (mg/L)}} \times \frac{2}{10} \right) - 2$

Tableau 8 : Techniques de dilution du sérum selon la concentration en IgG du LCR pour la technique d'IEF.

- Préfocalisation-migration-immunofixation.

Une prémigration est effectuée à 1000 volts pendant 6 minutes et 30 secondes à 20°C. Cette étape permet de créer un gradient de pH au sein du gel.

Parallèlement, les échantillons et le contrôle sont déposés sous un volume de 10 µL au niveau des puits de l'applicateur. La migration est alors effectuée à 1000 volts à 20°C pendant 45 minutes.

A la fin de la migration, l'antisérum est appliqué uniformément sur le gel à l'aide du masque dynamique (Figure 17 A à F). L'incubation dure 10 minutes à 20°C.

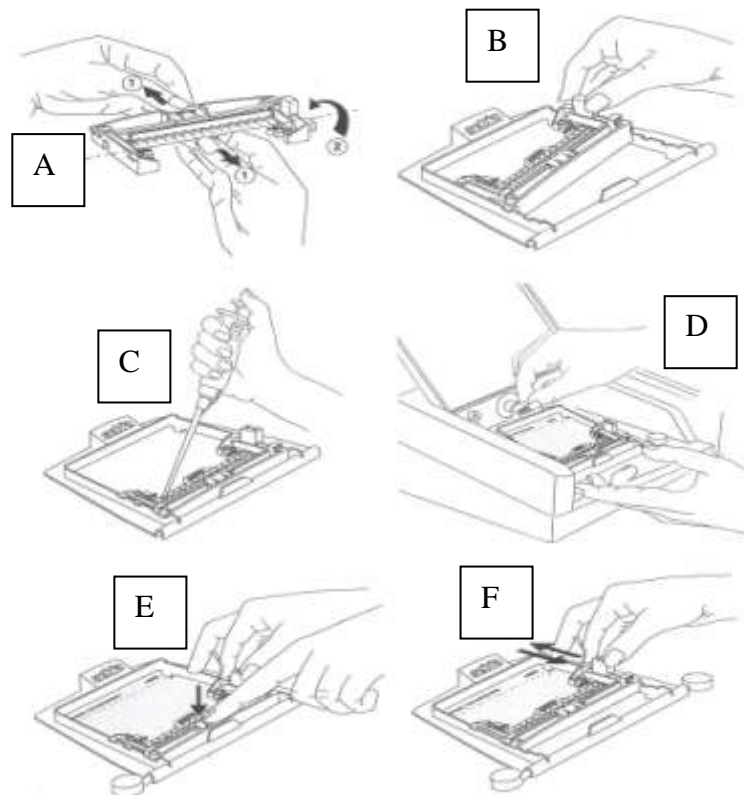


Figure 17 : Mode opératoire de l'application de l'antisérum pour la technique d'isoélectrofocalisation du LCR de Sébia®. A et B : mise en place de la barrette antisérum sur le masque dynamique ; C : dépôt des échantillons ; D : application du masque dynamique sur le gel ; E : dépôt de l'antisérum ; F : application de l'antisérum sur l'ensemble du gel avec le masque dynamique (77).

- Révélation du gel.

La solution de révélation enzymatique, composée de TTF3 dilué et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), est appliquée sur l'ensemble du gel de la même manière que pour la technique HYDRAGEL 6 CSF. L'incubation dure 15 minutes à 30°C (Figure 16 A et B).

5.2.2.2.3. *Performance de la technique.*

Cette technique dure 3h plus le temps de préparation des échantillons.

De la même façon que la technique d'immunofixation, le diagnostic de synthèse intrathécale ne peut être démontré qu'après la comparaison des profils électrophorétiques des IgG dans le LCR et dans le sérum. La lecture de la plaque se fait à l'œil nu et elle peut être facilitée à l'aide d'un négatoscope.

Contrairement à une migration électrophorétique classique, la séparation par isoélectrofocalisation des IgG est plus résolutive et elle permet de mettre en évidence pour une même immunoglobuline plusieurs bandes distinctes : ainsi, la disposition très proche de plusieurs bandes caractérise la présence d'une immunoglobuline monoclonale (Cf. Figure 14 type 5). Une synthèse intrathécale est définie par la présence d'un minimum de deux bandes dans le LCR non retrouvées dans le sérum. La présence d'une bande unique dans le LCR et absente du sérum ne fera que suspecter une synthèse intrathécale.

L'interprétation des plaques d'isoélectrofocalisation n'est pas fondamentalement différente de celle des immunofixations. Les profils sont également divisés en 3 groupes :

- Profil en faveur d'une synthèse intrathécale : le profil du LCR présente au moins deux bandes qui ne sont pas retrouvées dans le sérum.
- Profil douteux : Le profil des IgG du LCR est peu différent du profil des IgG sériques. On suspecte une synthèse intrathécale d'IgG.
- Profil n'étant pas en faveur d'une synthèse intrathécale : les profils du LCR et du sérum sont superposables (polyclonaux, monoclonaux ou oligoclonaux).

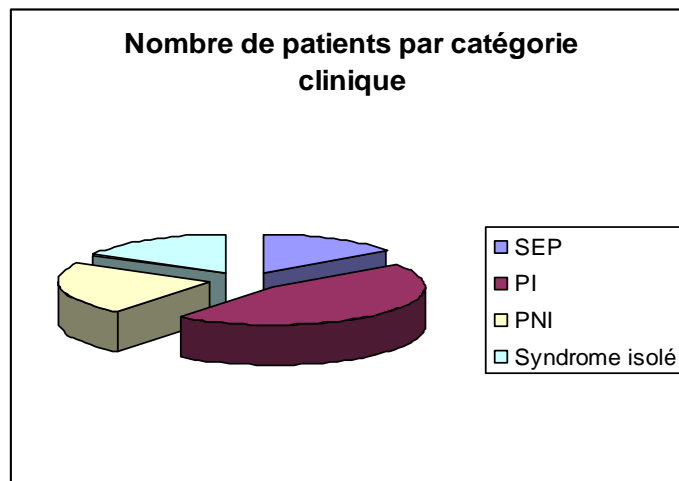
6. RESULTATS.

6. RESULTATS.

6.1. Résultats cliniques.

Cette étude porte sur 445 couples LCR/sérum dont les prélèvements ont été réalisés chez 432 patients. La répartition clinique, décrite au chapitre "Classification clinique des patients" (Cf. "Classification clinique des patients" chapitre 5.1.3.) permet d'obtenir les résultats suivants (Graphique 2) :

- 66 patients en catégorie "SEP",
- 194 patients en catégorie "Pathologie inflammatoire du SNC et du système nerveux périphérique hors SEP" (soit PI),
- 97 patients en catégorie "Pathologie non inflammatoire du système nerveux" (soit PNI),
- 75 patients en catégorie "Syndrome isolé".



Graphique 2 : Répartition des patients (N = 432) selon les différentes catégories cliniques.

Une attention particulière est portée pour la catégorie "SEP" : elle est composée de 44 femmes et de 22 hommes (sex-ratio femme/homme à 2).

Pour les femmes, l'âge moyen est de 38,63 ans avec un écart type de 12,33. L'âge minimum est de 17 ans et, l'âge maximum de 60 ans. Pour les hommes, l'âge moyen est de 38,55 ans (écart type de 10,45) avec un âge minimum de 19 ans et, un âge maximum de 59 ans.

Au total, l'âge moyen pour la catégorie " SEP" est de 38,60 ans avec un écart type de 11,64.

6.2. Résultats des dosages.

Les dosages biochimiques de 43 des couples LCR/sérum ont été réalisés au CH de Saint-Brieuc. Les méthodes de dosage sont identiques à celles réalisées au laboratoire de biochimie du CHU de Rennes ; seuls les appareils d'analyse sont différents. Nous étudierons donc l'ensemble des résultats obtenus à partir des deux laboratoires sans distinction particulière.

6.2.1. Protéïnorachie.

La valeur de la protidémie ne permet pas d'évaluer l'état de la BHE. Ce chapitre ne fera donc référence qu'aux résultats des dosages de la protéïnorachie.

La valeur moyenne est de 0,55 g/L \pm 0,40. La valeur minimum est de 0,14 g/L et la valeur maximum de 4,71 g/L.

Seulement un patient avait une légère hypoprotéïnorachie (0,14 g/L).

Une hyperprotéïnorachie a été retrouvée chez 241 patients ce qui témoigne d'une altération de la BHE. Le rapport QAlb est cependant plus représentatif de l'intégrité de la BHE donc seul ce résultat sera pris en compte dans ce travail afin d'évaluer la BHE du patient.

6.2.2. Albumine.

6.2.2.1. Albuminémie.

La valeur moyenne de l'albuminémie est de 41,25 g/L \pm 3,58 avec une valeur minimale de 26,60 g/L et une valeur maximale de 52 g/L.

Vingt-sept patients avaient une hypoalbuminémie et 2 patients avaient une légère hyperalbuminémie.

6.2.2.2. Albuminorachie.

La valeur moyenne de l'albuminorachie est de 328,91 mg/L \pm 268,34. L'albuminorachie la plus basse est de 63 mg/L et, la plus élevée de 3050 mg/L.

Une hypoalbuminorachie a été retrouvée chez 9 patients et, une hyperalbuminorachie chez 242 patients.

6.2.2.3. Rapport QAlb.

La valeur moyenne est de $0,81.10^{-2} \pm 0,69.10^{-2}$. La valeur la plus basse est de $0,15.10^{-2}$ et, la plus élevée de $7,66.10^{-2}$.

Les valeurs normales du rapport QAlb varient en fonction de l'âge. Ainsi, 187 patients tous âges confondus avaient une altération de leur BHE. Quarante-deux patients inclus dans le groupe "SEP" ne présentaient pas d'altération de la BHE. Les 23 autres malades avaient une altération de la BHE modérée avec un rapport QAlb inférieur à 2.10^{-2} , valeur seuil retrouvée dans la littérature (36, 37).

6.2.3. IgG.

6.2.3.1. IgG sériques.

La valeur moyenne des IgG sériques est de 10,62 g/L (écart type de 3,97) avec une valeur minimale de 2,70 g/L et une valeur maximale de 67,20 g/L.

Une hypogammaglobulinémie a été retrouvée chez 24 patients et 39 patients ont présenté une hypergammaglobulinémie.

6.2.3.2. IgG du LCR.

La valeur moyenne des IgG du LCR est de 52,19 mg/L avec un écart type de 66,51. La plus faible valeur est de 7 mg/L et, la plus élevée de 780 mg/L.

Cinquante-neuf patients avaient une concentration d'IgG dans le LCR inférieure à 20 mg/L et, 184 avaient une concentration supérieure à 40 mg/L.

6.3. Résultats des index de Link et de Tourtelotte.

6.3.1. Utilisation du logiciel d'aide au diagnostic Protis®.

Le laboratoire de biochimie du CHU de Pontchaillou est équipé du logiciel Protis® qui peut être directement connecté au néphélémètre BNII® et éviter ainsi des erreurs lors de la saisie des résultats. Cependant, lors de ce travail, la saisie des renseignements relatifs aux patients (nom, prénom, date de naissance et sexe) et des résultats des différents dosages (IgG et albumine sérique et dans le LCR) a été réalisée manuellement.

Ce logiciel analyse ensuite les résultats, calcule l'index de Link et de Tourtelotte et positionne les résultats du patient sur le diagramme de Reiber. (Figure 18)

Un commentaire prédéfini est généré automatiquement. Il décrit la présence, l'absence ou la suspicion de synthèse intrathécale en fonction des résultats des différents index et de l'état de la BHE évaluée par le rapport QAlb. Le logiciel n'émet aucune conclusion en cas d'altération trop importante de la BHE qui pourrait entraîner une surestimation des valeurs des index de Link ou de Tourtelotte.

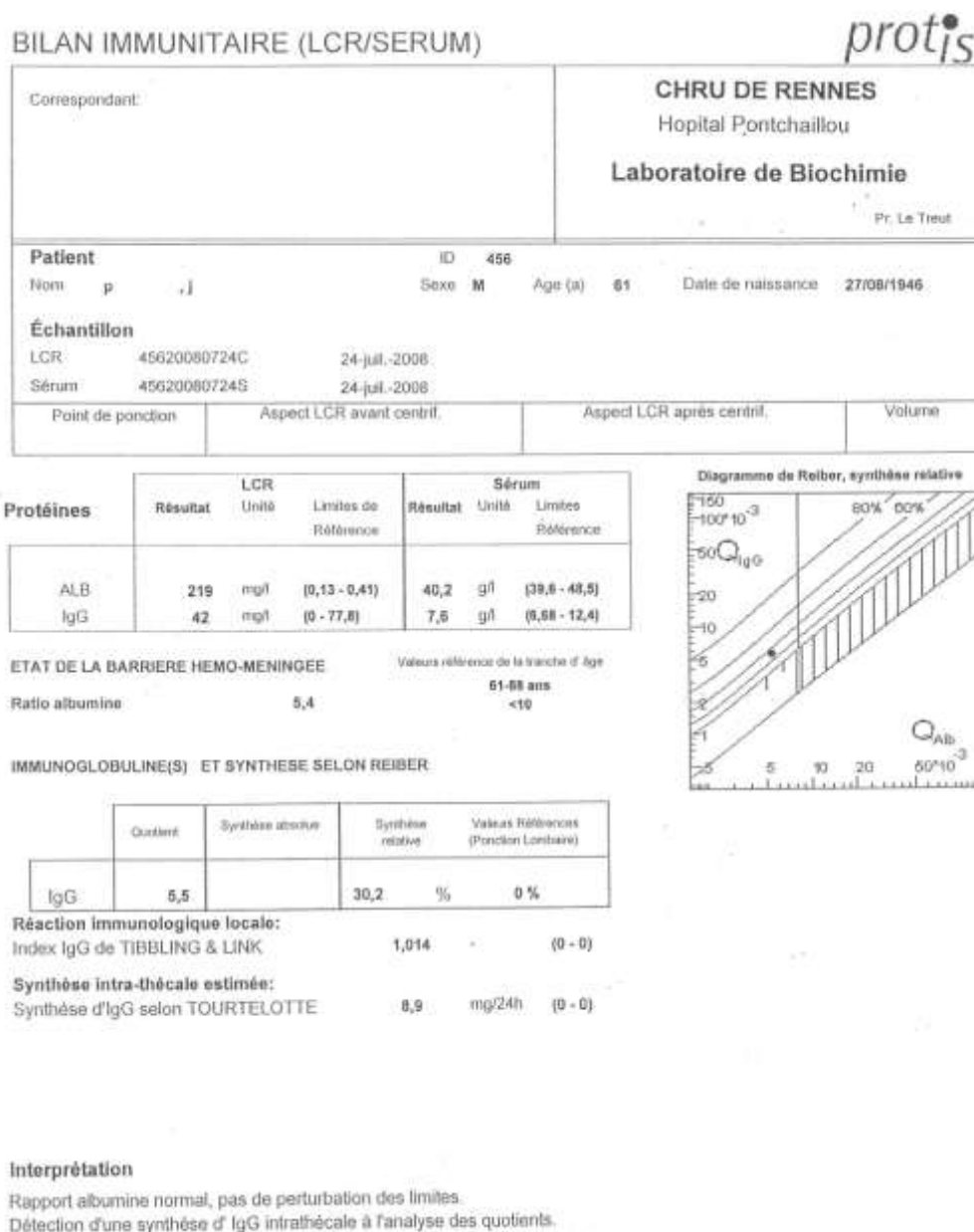


Figure 18 : Exemple de compte rendu généré par le logiciel Protis® pour l'analyse biochimique quantitative des couples LCR/sérum.

6.3.2. Rappels des méthodes d'évaluation des tests biologiques à visée diagnostique. (86)

Les performances et la validité d'un test dépendent de 4 principaux critères ; la sensibilité (Se), la spécificité (Sp), la valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN) :

- La sensibilité définit la probabilité qu'un test soit positif si la maladie est présente,
- la spécificité définit la probabilité qu'un test soit négatif chez une personne non atteinte de la maladie,
- la VPP est définie par la probabilité que la maladie soit présente lorsque le test est positif. Le risque d'erreur correspond à la valeur $1-VPP$,
- la VPN est définie par la probabilité que la maladie soit absente lorsque le test est négatif. Le risque d'erreur est estimé à $1-VPN$.

Le tableau 9 montre les résultats possibles lors de la mesure de la validité d'un test. La valeur "a" exprime le nombre de malades avec un test positif (vrais positifs) ; la valeur "b", le nombre de personnes non malades avec un test positif (faux positifs) ; la valeur "c", le nombre de malades avec un test négatif (faux négatifs) et, la valeur "d", le nombre d'individus non malades avec un test négatif (vrais négatifs).

	Malades	Non malades
Test positif	a	b
Test négatif	c	d

Tableau 9 : Répartition des résultats possibles pour l'étude des performances d'un test biologique (86).

La sensibilité et la spécificité sont calculées de la manière suivante:

- $Se = a / (a+c)$
- $Sp = d / (d+b)$

Contrairement aux résultats de sensibilité et de spécificité, les valeurs prédictives dépendent de la prévalence (p) de la maladie. Lorsque la représentativité de l'échantillon comparée à la population n'est pas certaine, le calcul de ces critères repose alors sur le théorème de Bayes qui utilise la sensibilité et la spécificité déterminées sur l'échantillon et la prévalence de l'affection à diagnostiquer. Les équations utilisées pour calculer la VPP et la VPN sont les suivantes :

$$- \text{VPP} = \frac{\text{Se} \times p}{(\text{Se} \times p) + ((1 - \text{Sp}) \times (1 - p))}$$

$$- \text{VPN} = \frac{\text{Sp} \times (1 - p)}{(\text{Sp} \times (1 - p)) + ((1 - \text{Se}) \times p)}$$

6.3.3. Analyse de l'index de Link.

L'index de Link est calculé à l'aide l'équation suivante :

$$\text{Index IgG} = \frac{\text{Ig}_{\text{GLCR}}}{\text{Ig}_{\text{Sérum}}} \times \frac{\text{Alb}_{\text{sérum}}}{\text{Alb}_{\text{LCR}}}$$

Au laboratoire de Rennes, une synthèse intrathécale est définie par un index supérieur à 0,65.

6.3.3.1. Répartition des index de Link en fonction du contexte clinique.

Un index de Link supérieur à 0,65 a été retrouvé chez 89 patients (soit 20%) dont :

- 48 dans la catégorie "SEP",
- 36 dans la catégorie "PI",
- 2 dans la catégorie "PNI",
- 3 dans la catégorie "Syndrome isolé".

Ainsi, selon ces résultats, l'index de Link détecte une synthèse intrathécale dans 72,7% des cas de SEP suspectée ou confirmée, dans 18,5% des cas de pathologies inflammatoires du SNC et périphérique et, dans 2% des cas de pathologies non inflammatoires du système nerveux.

6.3.3.2. Répartition des index de Link en fonction de la BHE.

Parmi les 432 patients, 187 ont une altération de leur BHE soit 42,3%. Le tableau 10 résume la répartition de ces 187 patients en fonction des différents groupes cliniques :

	SEP (N = 66)	PI (N = 195)	PNI (N = 97)	Syndrome isolé (N = 75)	TOTAL (N = 432)
BHE altérée	23	104	30	30	187
BHE normale	43	91	67	45	245

Tableau 10 : Répartition clinique des patients atteints ou non d'une altération de la BHE.

Parmi les patients présentant une altération de la BHE, un index de Link supérieur à 0,65 ("positif") a été observé dans 56,5% (13 / 23) des cas du groupe "SEP" ; dans 23,1% (24 / 104) du groupe "PI" et dans 3,3% (1 / 30) de chacun des groupes "PNI" et "Syndrome isolé".

6.3.3.3. Performances de l'index de Link.

Pour ces calculs, la catégorie "Syndrome isolé" est exclue du fait de l'absence de diagnostic clinique précis. Le calcul de la sensibilité, de la spécificité, de la VPP et de la VPN nécessite de créer deux groupes : le groupe "SEP" constitué de 66 patients et le groupe "Non SEP" constitué de 291 patients (groupe PI + PNI). Ces derniers vont permettre de déterminer la performance de l'index de Link vis-à-vis du diagnostic de la SEP. Les résultats sont donnés dans le tableau 11 :

	SEP	Non SEP
Link positif (> 0,65)	49	37
Link négatif (< 0,65)	17	254

Tableau 11 : Répartition des résultats de l'index de Link en fonction de la SEP.

Pour le diagnostic d'une SEP, l'index de Link présente les performances suivantes :

- Sensibilité de 74,2%,
- Spécificité de 87,3%.

Dans la cohorte étudiée, la prévalence de la SEP est de 0,185 (soit 66 / 357). Ces résultats ont permis de déterminer les valeurs prédictives :

- VPP de 57% avec un risque d'erreur de 43%,
- VPN de 93,7% avec un risque d'erreur de 6,3%.

6.3.4. Analyse de l'indice de Tourtelotte.

L'indice de Tourtelotte est calculé par la formule mathématique suivante :

$$\text{IgG tourt} = \left[\left(\text{Ig}_{\text{GLCR}} - \frac{\text{Ig}_{\text{Gsérum}}}{369} \right) - \left(\text{Alb}_{\text{LCR}} - \frac{\text{Alb}_{\text{LCR}}}{230} \right) \times \left(\frac{\text{Ig}_{\text{Gsérum}}}{\text{Alb}_{\text{sérum}}} \right) \times 0,43 \right] \times 5$$

Cet indice n'est pas utilisé en pratique courante au laboratoire de biochimie du CHU de Rennes. Il a été calculé à l'aide du logiciel Protis® dans le cadre de ce travail pour évaluer son éventuel apport. Toute valeur supérieure à + 3,3 mg/24h témoigne d'une synthèse intrathécale.

6.3.4.1. Répartition de l'indice de Tourtelotte en fonction du contexte clinique.

Un indice de Tourtelotte supérieur à + 3,3 mg/24h ("positif") a été retrouvé chez 109 patients (soit 25%).

Les patients se répartissent dans les différentes catégories cliniques de la manière suivante :

- 47 patients dans le groupe "SEP",
- 48 patients du groupe "PI",
- 5 patients du groupe "PNI",
- 2 patients du groupe "Syndrome isolé".

6.3.4.2. Répartition de l'indice de Tourtelotte en fonction de la BHE.

L'influence de la BHE sur l'indice de Tourtelotte est étudiée à partir des données du tableau 10 (Cf. "Répartition des index de Link et Tourtelotte en fonction de la BHE" chapitre 6.3.3.2.). Ainsi, une altération de la BHE associée à un indice de Tourtelotte "positif" a été observée dans 52,2% (12 / 23) des cas du groupe "SEP", dans 42,3% (44 / 104) des cas du groupe "PI", dans 13,3% (4 / 30) des cas du groupe "PNI" et dans 3,3% (1 / 30) des cas du groupe "Syndrome isolé".

6.3.4.3. Performances de l'indice de Tourtelotte.

Comme pour l'index de Link, la performance de l'indice de Tourtelotte pour détecter une SEP nécessite de créer deux groupes : un groupe "SEP" (N = 66) et un groupe "Non SEP" (N = 291). La prévalence de la SEP est de 0,185 (66 / 357). La répartition de l'indice de Tourtelotte en fonction du diagnostic clinique est résumée dans le tableau 12 :

	SEP	Non SEP
Tourtelotte positif (> + 3,3 mg/24h)	48	54
Tourtelotte négatif (< + 3,3 mg/24h)	18	237

Tableau 12 : Répartition des résultats de l'indice de Tourtelotte en fonction de la SEP.

Ainsi, les valeurs respectives de la sensibilité, de la spécificité, de la VPP et de la VPN de l'indice de Tourtelotte sont de 72,7%, 81,4%, 47% (risque d'erreur de 53%) et de 92,9% (risque d'erreur de 7,1%).

6.4. Résultats des analyses qualitatives.

6.4.1. Résultats de l'isoélectrofocalisation sur HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING Sébia®.

6.4.1.1. Classification des résultats obtenus.

Trois grands types de profils électrophorétiques sont retenus dans cette classification (Figure 19) :

- a- Synthèse intrathécale : bandes oligoclonales des IgG dans le LCR non retrouvées dans le sérum. Ce groupe englobe les cas de certitudes et de suspicions (présence d'une seule bande ou de plusieurs bandes plus discrètes d'IgG dans le LCR et non retrouvées dans le sérum) de synthèse intrathécale.
- b- LCR = sérum : bandes oligoclonales des IgG identique dans le LCR et dans le sérum.
- c- Normal : absence de bandes oligoclonales des IgG dans le LCR et dans le sérum.

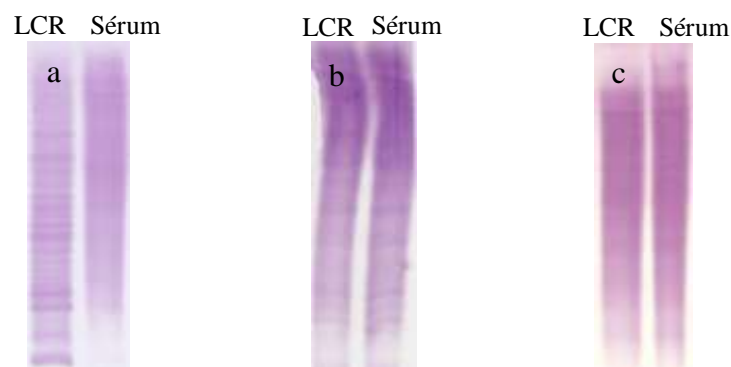


Figure 19 : Les trois principaux profils électrophorétiques des IgG du LCR et du sérum par IEF (a : synthèse intrathécale des IgG ; b : LCR=sérum et c : normal).

Parmi les 445 couples LCR/sérum, la répartition des différents profils électrophorétiques d'IEF est la suivante :

- 127 "Synthèse intrathécale" soit 28,5%,
- 25 "LCR = sérum" soit 5,6%,
- 293 "Normal" soit 65,8%.

6.4.1.2. Analyse des profils électrophorétiques et des index de Link et de Tourtelotte.

Le tableau 13 résume la répartition des index de Link et de Tourtelotte en fonction des profils obtenus par la technique d'IEF :

Profil électrophorétique	BHE	Link et Tourtelotte positif	Link et Tourtelotte négatif	Link positif	Tourtelotte positif
Normal	Normale	2	167	2	
	Altérée	11	99		12
Synthèse intrathécale	Normale	40	29	6	
	Altérée	25	21		6
LCR = sérum	Altérée	3	18		4
TOTAL		81	334	8	22

Tableau 13 : Répartition des valeurs des indices de Link et Tourtelotte en fonction des différents profils électrophorétiques et de la BHE.

Ces différentes observations permettent ainsi d'évaluer les performances des index de Link et Tourtelotte selon la présence ou non d'une synthèse intrathécale observée par la technique d'IEF.

La prévalence d'une synthèse intrathécale dans ce groupe d'étude est de 0,285 (soit 127 / 445). Deux groupes sont exploités, le groupe synthèse intrathécale et le groupe absence de synthèse intrathécale ; la répartition obtenue est résumée dans le tableau 14.

Index de Link			Indice de Tourtelotte		
	Synthèse intrathécale	Absence de synthèse intrathécale		Synthèse intrathécale	Absence de synthèse intrathécale
Link positif	71	18	Tourtelotte positif	71	32
Link négatif	56	300	Tourtelotte négatif	56	286

Tableau 14 : Répartition des valeurs des index de Link et de Tourtelotte en fonction de l'absence ou de la présence de synthèse intrathécale détectée par IEF.

Les valeurs respectives de la sensibilité, de la spécificité, de la VPP et de la VPN de l'index de Link pour la détection d'une synthèse intrathécale sont de 55,9%, 94,3%, 79,6% (risque d'erreur de 20,4%) et de 84,3% (risque d'erreur de 15,7%). Pour l'indice de Tourtelotte, la sensibilité est de 55,9%, la spécificité de 89,9%, la VPP de 68,8% pour un risque d'erreur de 31,2% et, la VPN de 83,6% pour un risque d'erreur de 16,4%.

6.4.1.3. Répartition des profils électrophorétiques en fonction du contexte clinique.

Onze patients ont bénéficié de plusieurs analyses (9 malades en ont bénéficié de 2 et 2 malades en ont bénéficié de 3) dont les résultats se sont avérés identiques pour un même malade. Ainsi, seul un résultat a été comptabilisé pour ces patients lors de l'étude de la répartition des différents profils électrophorétiques d'IEF en fonction des pathologies. Parmi les 432 patients, 125 "Synthèse intrathécale", 23 "LCR = sérum" et 284 "Normal" ont été observés. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 15 :

	Synthèse intrathécale (N = 125)	LCR = sérum (N = 23)	Normal (N = 284)	TOTAL (N = 432)
SEP	64	1	1	66
PI	53	16	125	194
PNI	4	5	88	97
Syndrome isolé	4	1	70	75

Tableau 15 : Répartition des différents profils électrophorétiques d'IEF en fonction du diagnostic clinique.

Deux cas de SEP sans profil oligoclonal des IgG dans le LCR sont observés ; ces diagnostics ont été établis sur les critères de dissémination spatiale et temporelle de Mc Donald et al (30) fournis par les résultats de l'IRM et des potentiels évoqués.

6.4.2. Comparaison des deux techniques d'analyses qualitatives.

6.4.2.1. Estimation des performances des techniques qualitatives.

Les techniques d'IFIX et d'IEF, réalisées à l'aide des deux kits Sébia®, ont été effectuées sur 62 couples LCR/sérum. Ces prélèvements ont été réalisés chez 61 patients qui se répartissent dans les différentes catégories cliniques de la manière suivante :

- 17 patients en catégorie "SEP",
- 29 patients en catégorie "PI",
- 4 patients en catégorie "PNI",
- 11 patients en catégorie "Syndrome isolé".

La répartition des différents profils électrophorétiques des IgG en fonction du diagnostic est résumée dans le tableau 16.

		SEP	PI	PNI	Syndrome isolé
IEF	Synthèse intrathécale	16	9	1	2
	LCR=sérum	1	5	1	/
	Normal	/	15	2	9
IFIX	Synthèse intrathécale	16	6	1	1
	LCR=sérum	/	4	/	/
	Normal	1	19	3	10

Tableau 16 : Répartition des différents profils électrophorétiques obtenus par IEF et par IFIX en fonction des catégories cliniques.

Un profil oligoclonal des IgG dans le LCR non retrouvé dans le sérum (Synthèse intrathécale) est observé dans 46,8% des cas par la technique d'IEF et dans 40,3% des cas par celle d'IFIX.

La prévalence d'une synthèse intrathécale d'IgG est de 0,45 pour la technique d'IEF (soit 28 / 62) et de 0,39 pour la technique d'IFIX (soit 24 / 62). Un profil oligoclonal des IgG observé à l'identique dans le LCR et dans le sérum (LCR=sérum) est observé dans 11,3% des cas par IEF et dans 6,4% des cas par IFIX. Enfin, un profil polyclonal des IgG dans le LCR et le sérum (Normal) est observé dans 41,9% des cas par IEF et dans 53,2% des cas par IFIX.

Ces différentes données permettent d'évaluer les performances des analyses qualitatives pour le diagnostic de SEP dont la prévalence dans cet échantillon est de 0,34 (17 / 50). Le tableau 17 expose les résultats obtenus selon la présence ou non d'une synthèse intrathécale détectée par les techniques électrophorétiques (IEF et IFIX) et selon le diagnostic clinique ("SEP" ou "Non SEP"). La catégorie "Syndrome isolé" est exclue suite à l'absence de diagnostic clinique précis.

		SEP	Non SEP
IEF	Synthèse intrathécale	16	10
	Absence de synthèse intrathécale	1	23
IFIX	Synthèse intrathécale	16	7
	Absence de synthèse intrathécale	1	26

Tableau 17 : Répartition des différents profils électrophorétiques obtenus par IEF et par IFIX en fonction du diagnostic de SEP.

Pour le diagnostic d'une SEP, la technique d'IEF présente les performances suivantes :

- Une sensibilité de 94,1%,
- Une spécificité de 69,6%,
- Une VPP de 61,5% avec un risque d'erreur de 38,5%,
- Une VPN de 95,8% avec un risque d'erreur de 4,2%.

De la même manière, la technique d'IFIX présente les performances suivantes pour le diagnostic de SEP :

- Une sensibilité de 94,1%,
- Une spécificité de 78,8%,
- Une VPP de 69,5% avec un risque d'erreur de 30,5%,
- Une VPN de 96,3% avec un risque d'erreur de 3,7%.

6.4.2.2. Calcul des coefficients de concordance Kappa.

L'absence de spécificité d'une synthèse intrathécale d'Igs pour la SEP rend l'évaluation des performances des techniques électrophorétiques difficile. Le coefficient Kappa présente ainsi un certain intérêt car il permet de déterminer l'accord ou la concordance, entre deux techniques qualitatives. Cet accord est défini comme la conformité de deux ou plusieurs informations (absence ou présence d'une synthèse intrathécale) qui se rapportent au même objet (SEP ou pathologies susceptibles de présenter une synthèse intrathécale) (87).

La concordance résulte donc de la somme d'une composante "aléatoire" (hasard) et d'une composante "d'accord véritable" (réel). Le coefficient Kappa permet de retirer la portion de hasard entre les techniques.

Le test de concordance Kappa se calcule à l'aide du tableau suivant :

Catégorie de réponse		Technique 1		
		+	-	TOTAL
Technique 2	+	a	b	N1
	-	c	d	N2
	TOTAL	n1	n2	N = n1 + n2 OU N = N1 + N2

Tableau 18 : Exemple de distribution des résultats pour le calcul du coefficient de concordance Kappa.

Le coefficient Kappa est défini par l'équation suivante :
$$Kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

La valeur P_o correspond à la proportion d'accord ou de concordance observée et elle est calculée par l'équation $(a + d) / N$. La valeur P_e correspond à la proportion d'accord ou de concordance aléatoire et elle est calculée par l'équation $(a' + d') / N$ avec $a' = (N1 \times n1) / N$ et $d' = (N2 \times n2) / N$.

Landis et Koch (88) ont par la suite estimé le degré d'accord entre deux techniques qualitatives selon la valeur de Kappa. Ainsi, pour Kappa supérieur ou égal à 0,81, la concordance est excellente ; pour Kappa compris entre 0,61 et 0,80, la concordance est bonne ; pour Kappa compris entre 0,21 et 0,60, la concordance est modérée ; pour Kappa compris entre 0 et 0,20, la concordance est mauvaise ; enfin pour une valeur de Kappa négative, la concordance est très mauvaise.

Lors de cette étude, différents coefficients Kappa ont été calculés afin de déterminer la concordance entre les deux techniques qualitatives, d'une part pour le diagnostic de SEP où le groupe "Syndrome isolé" a été exclu du fait de l'absence de diagnostic clinique précis, et d'autre part, pour la détection d'une synthèse intrathécale. Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux 19 A, B et C.

Tableau A KAPPA = 0,565		SEP		
		Présente	Absente	TOTAL
IEF	Synthèse intrathécale	16	10	26
	Absence de synthèse intrathécale	1	23	24
	TOTAL	17	33	50

Tableau B KAPPA = 0,671		SEP		
		Présente	Absente	TOTAL
IFIX	Synthèse intrathécale	16	7	23
	Absence de synthèse intrathécale	1	26	27
	TOTAL	17	33	50

Tableau C KAPPA = 0,81		IFIX		
		Synthèse intrathécale	Absence de synthèse intrathécale	TOTAL
IEF	Synthèse intrathécale	23	5	28
	Absence de synthèse intrathécale	1	33	38
	TOTAL	24	34	62

Tableau 19 : Répartition des résultats pour le calcul des concordances Kappa de l'IEF (A) et de l'IFIX (B) pour le diagnostic de SEP et pour la détection d'une synthèse intrathécale (C).

Le test de concordance Kappa montre que pour le diagnostic de SEP, la technique d'IEF présente une concordance modérée (Kappa = 0,565) et la technique d'IFIX, une bonne concordance (Kappa = 0,672). De plus, ce test montre une concordance excellente entre les deux techniques qualitatives pour la détection d'une synthèse intrathécale d'IgG (Kappa = 0,81).

Cependant, beaucoup de pathologies neurologiques peuvent être accompagnées de synthèse intrathécale d'IgG de manière transitoire. C'est pourquoi le calcul du coefficient Kappa pour les deux techniques qualitatives a également été déterminé pour l'ensemble des groupes "SEP" et "PI" (soit N = 46 patients) où une synthèse intrathécale d'IgG est susceptible d'être détectée. Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux 20 A et B.

<i>Tableau A</i> KAPPA = 0,09		SEP + PI		
		Présente	Absente	TOTAL
IEF	Synthèse intrathécale	25	1	26
	Absence de synthèse intrathécale	21	3	24
	TOTAL	46	4	50

<i>Tableau B</i> KAPPA = 0,072		SEP + PI		
		Présente	Absente	TOTAL
IFIX	Synthèse intrathécale	22	1	23
	Absence de synthèse intrathécale	24	3	27
	TOTAL	46	4	50

Tableau 20 : Répartition des résultats pour le calcul des concordances Kappa de l'IEF (A) et de l'IFIX (B) pour le diagnostic des "SEP + PI".

Pour le diagnostic des SEP et des pathologies neurologiques inflammatoires, les deux techniques qualitatives ont de mauvaises concordances : Kappa = 0,09 pour l'IEF et, Kappa = 0,072 pour l'IFIX.

6.4.2.3. Analyse des discordances entre les deux techniques électrophorétiques.

Cinquante-deux couples LCR/sérum (soit 82,5%) présentent des profils électrophorétiques identiques à l'aide des techniques d'IEF et d'IFIX. Onze couples (soit 17,5%) mettent en évidence une discordance :

- Pour 5 couples LCR/sérum, la technique d'IFIX décrit un profil polyclonal des IgG dans le LCR et le sérum tandis que celle d'IEF met en évidence des bandes oligoclonales des IgG

dans le LCR non retrouvées dans le sérum. Ces différents prélèvements ont été effectués chez 5 patients, dont un patient atteint de SEP, trois patients atteints d'une pathologie inflammatoire du système nerveux (neurosarcoïdose, neuropathie axonale diffuse et polyradiculonévrite) et un patient pour lequel le diagnostic clinique n'a pu encore être établi. La figure 20 expose le cas du patient atteint de SEP (Mr N.D.)

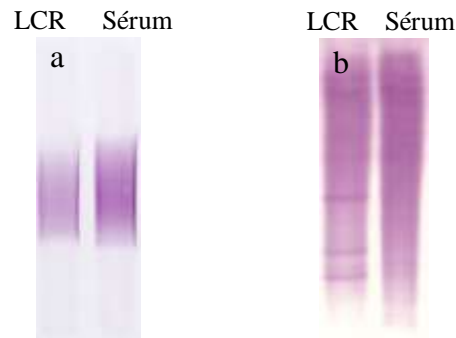


Figure 20 : Profils électrophorétiques des IgG du couple LCR/sérum de Mr N.D. obtenus par les techniques d'IFIX (a) et d'IEF (b).

Le patient atteint de SEP est un cas intéressant. En effet, le diagnostic de SEP étant fortement suspecté, une 2^{ème} ponction lombaire a été réalisée 3 semaines après la 1^{ère}. Un profil oligoclonal des IgG dans le LCR, non retrouvé dans le sérum, a alors été mis en évidence par la technique d'IFIX sur le 2^{ème} prélèvement. Une synthèse intrathécale des IgG aurait été détectée dès le premier prélèvement par la technique d'IEF et aurait permis d'éviter ainsi une 2^{ème} ponction lombaire au patient.

- Pour un patient atteint de SEP (Mme G.M.), l'IFIX démontre une synthèse intrathécale des IgG tandis que l'IEF présente un discret profil oligoclonal des IgG identique dans le LCR et dans le sérum (Figure 21).

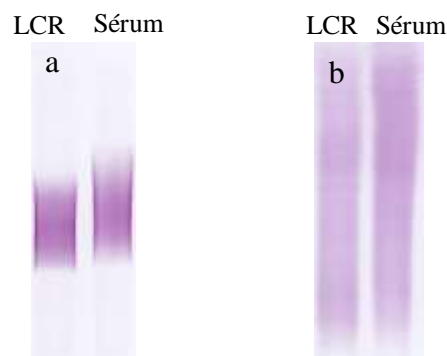


Figure 21 : Profils électrophorétiques des IgG du couple LCR/sérum de Mme G.M. obtenus par les techniques d'IFIX (a) et d'IEF (b).

- Pour 2 couples LCR/sérum, un profil polyclonal des IgG dans le LCR et le sérum est mis en évidence par la technique d'IFIX. En revanche, la technique d'IEF démontre un profil oligoclonal des IgG identique dans le LCR et dans le sérum (Figure 22). Ces 2 prélèvements correspondent à 1 patient atteint de neuropathie optique inflammatoire (groupe PI) et à 1 patiente (Mme D.Y.) atteinte de lymphome (groupe PNI).

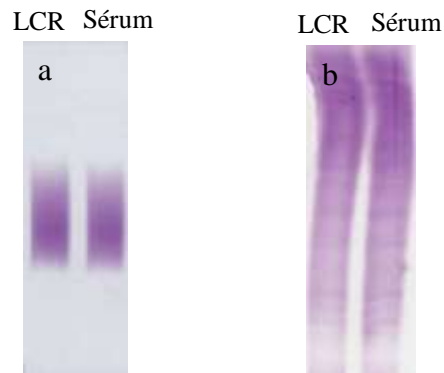


Figure 22 : Profils électrophorétiques des IgG du couple LCR/sérum de Mme D.Y. obtenus par les techniques d'IFIX (a) et d'IEF (b).

- Pour un couple LCR/sérum dont la patiente (Mme R.M.) était atteinte de neuropathie axonale diffuse (groupe PI), la technique d'IFIX permet de suspecter une synthèse intrathécale des IgG. La technique d'IEF met en évidence un profil oligoclonal des IgG dans le LCR et dans le sérum (LCR=sérum) (Figure 23).

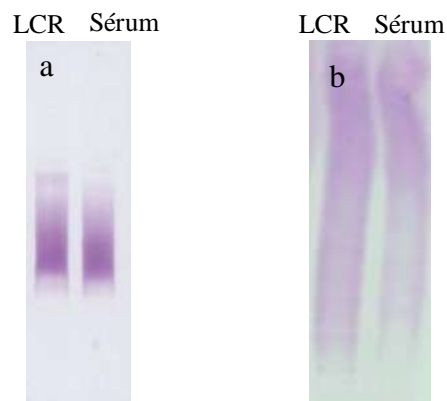


Figure 23 : Profils électrophorétiques des IgG du couple LCR/sérum de Mme R. M. obtenus par les techniques d'IFIX (a) et d'IEF (b).

- Enfin, pour 2 couples LCR/sérum dont les patients sont atteints de myélite (Mr G.Y.) et de méningite lymphocytaire (Mr P.Y.) inclus dans le groupe PI, l'IFIX permet de conclure à une synthèse intrathécale d'IgG tandis que l'IEF ne permet que de la suspecter (Figure 24).

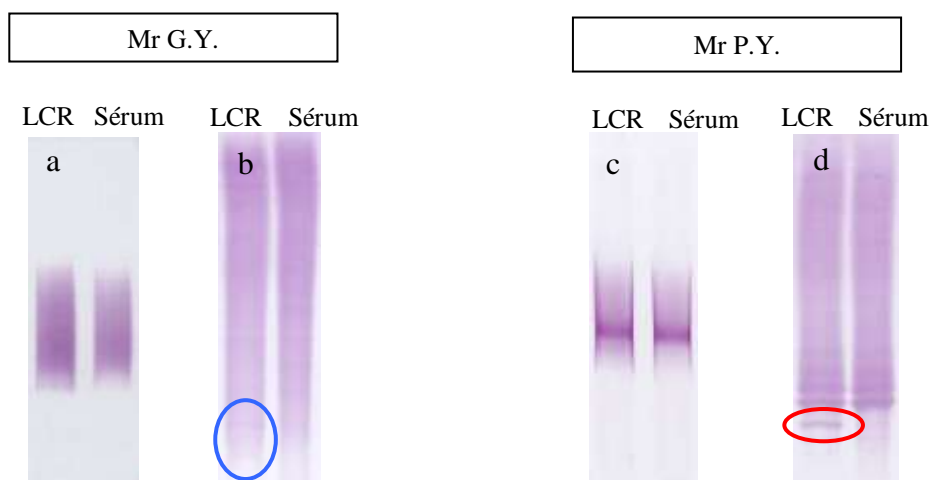


Figure 24 : Profils électrophorétiques des IgG de 2 couples LCR/sérum (Mr G. Y. et Mr P. Y.) obtenus par les techniques d'IFIX (a et c) et d'IEF (b et d).

La technique d'IEF du couple LCR/sérum de Mr G.Y. (Figure 24 b) met en évidence 4 bandes supplémentaires (○) discrètes d'IgG dans le LCR. Pour Mr P.Y., l'IEF (Figure 24 d) montre une immunoglobuline monoclonale dans le LCR et dans le sérum ainsi qu'une bande supplémentaire d'IgG dans le LCR (○) ce qui reste insuffisant pour conclure formellement à une synthèse intrathécale d'IgG.

Lors de l'installation de la technique d'IEF au laboratoire de biochimie du CHU de Pontchaillou, les biologistes interprétaient avec prudence les suspicions de synthèse intrathécale d'IgG (cas de Mr G.Y. et Mr P.Y.). Dans le cadre de ce travail, une expertise de ces 2 profils électrophorétiques, réalisée par la société Sébia®, a permis d'aboutir aux mêmes conclusions que par la technique d'IFIX. Ainsi, la présence de quelques bandes surnuméraires mêmes discrètes ou d'une seule bande mais de forte intensité dans le LCR suffit à mettre en évidence une synthèse intrathécale d'IgG.

7. DISCUSSION

7. DISCUSSION.

7.1. Aspects techniques de l'isoélectrofocalisation (IEF) avec le kit "HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING" de Sébia®.

Cette technique est réalisée de manière semi-automatique sur l'appareil Hydrasis® Focusing qui permet une séparation électrophorétique des protéines à un voltage très élevé. Elle nécessite du personnel qualifié tant au niveau de la réalisation technique que de l'interprétation biologique.

Nous reverrons donc dans ce chapitre les points importants des différentes étapes techniques afin d'obtenir d'emblée des plaques d'IEF permettant une lecture aisée et fiable.

- Préparation des échantillons.

Les dosages sériques de l'albumine et des IgG des échantillons analysés par IEF sont réalisés quotidiennement en même temps que les autres demandes sur l'appareil Olympus® et sur le néphélémètre BNII®. Par contre, les demandes de dosage de l'albumine et des IgG dans le LCR étant plus rares, elles sont groupées et effectuées le jour de la réalisation de l'IEF, ce qui permet d'utiliser les mêmes courbes de calibration pour les 8 échantillons de la plaque.

A partir des résultats obtenus, la dilution des échantillons peut être manuelle ou automatisée et elle doit être la plus rigoureuse possible afin d'obtenir une concentration en IgG identique entre le LCR et le sérum. La concentration en IgG recommandée pour la méthode d'IEF est de 20 mg/L. Cependant, en cas de concentration en IgG du LCR plus faible et comprise entre 10 et 20 mg/L, le sérum doit être dilué de telle sorte que la concentration en IgG soit identique à celle du LCR pour permettre une comparaison optimale des deux profils électrophorétiques. Enfin, si la concentration en IgG du LCR est inférieure à 10 mg/L, l'échantillon doit normalement être concentré avec le matériel adéquat.

Les échantillons dilués sont rapidement déposés sur l'applicateur afin d'assurer un temps de diffusion identique en chambre humide au niveau des dents du peigne. Il est conseillé de terminer cette étape en même temps que la préfocalisation pour éviter une évaporation des échantillons.

- Préfocalisation – migration – immunofixation (IFIX).

Les points les plus importants à souligner sont : le positionnement du gel sur la plaque de migration et la mise en place d'un cache plastique qui doivent être réalisés sans induire la formation de bulles qui pourraient créer un phénomène de "vagues" sur le gel ; l'application de l'Ac anti-IgG à la surface du gel qui doit être la plus homogène possible afin d'éviter la présence de renforcements de coloration au sein des différentes pistes.

Ces artefacts pourraient en effet fausser l'interprétation de la plaque d'IEF.

- Révélation du gel.

La solution de révélation doit être préparée lors de l'étape d'IFIX, sous hotte due à la toxicité du TTF3 qui contient de la benzidine et du diméthylformamide, puis elle est conservée à température ambiante à l'abri de la lumière avant son utilisation. Le révélateur enzymatique est appliqué sur l'ensemble du gel à l'aide du masque adéquat. Cette étape est également cruciale car il est nécessaire d'éviter la formation de bulles qui, à ce niveau, induiraient une absence de coloration des zones du gel correspondantes et donc une absence de révélation des bandes IgG.

La validation technique s'effectue lors de la lecture de l'ensemble de la plaque. Le biologiste s'assure de la bonne migration électrophorétique du contrôle positif et de la cohérence de migration entre les différentes pistes (absence de différence de coloration entre les pistes du LCR et du sérum pouvant être liée à une erreur de dilution ou de dosage, absence de "vagues" ou de zones non colorées). L'interprétation biologique nécessite la comparaison des deux pistes LCR/sérum d'un même patient. La présence de bandes, même de faible intensité est notée et est corrélée aux résultats des analyses quantitatives (présence ou non d'une altération de la BHE et résultat des index) et aux renseignements cliniques.

7.2. Performances du kit d'IEF dans la SEP et comparaison par rapport à l'ancienne technique d'IFIX.

7.2.1. Analyse de nos résultats.

Au laboratoire de Biochimie du CHU de Pontchaillou, la technique d'IEF est réalisée à l'aide du kit "HYDRAGEL 9 CSF FOCUSING" depuis avril 2008 et elle présente l'avantage de respecter les recommandations concernant l'analyse du LCR pour le diagnostic de SEP (27).

- IEF couplée à une technique d'IFIX,
- utilisation de LCR non concentré,
- contrôle positif sur la plaque de migration en parallèle des échantillons,
- concentrations en IgG identiques dans le LCR et dans le sérum.

Les résultats de ce travail permettent d'étudier les performances des techniques qualitatives (IEF et IFIX de Sébia®), et quantitatives (index de Link et de indice de Tourtelotte) pour le diagnostic de SEP. Le tableau 21 récapitule les résultats obtenus :

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (risque d'erreur) (%)	VPN (risque d'erreur) (%)
IEF	94,1	69,6	61,5 (38,5)	95,8 (4,2)
IFIX	94,1	78,8	69,5 (30,5)	96,3 (3,7)
Index Link	74,2	87,3	57 (43)	93,7 (6,3)
Indice Tourtelotte	72,7	81,4	47 (53)	92,9 (7,1)

Tableau 21 : Performances des techniques électrophorétiques et des index de Link et de Tourtelotte pour le diagnostic de SEP.

Ces résultats mettent en évidence une meilleure sensibilité des deux techniques qualitatives par rapport aux techniques quantitatives. Ainsi, il y a plus de chance qu'une synthèse intrathécale soit détectée par les techniques qualitatives que par les index de Link ou de Tourtelotte si le patient est atteint de SEP.

Les index de Link et de Tourtelotte ont une spécificité plus importante que les techniques qualitatives ce qui indique que lorsque le patient n'est pas atteint de SEP, la probabilité d'une absence de synthèse intrathécale par le calcul des index est plus élevée que celle détectée par les techniques qualitatives.

La plus faible spécificité est observée pour la technique de référence (IEF). Ceci est lié au fait qu'une synthèse intrathécale d'IgG n'est pas un signe pathognomonique de la SEP, elle peut en effet être retrouvée dans de nombreuses autres pathologies inflammatoires du système nerveux (Cf. "Diagnostic différentiel de la SEP" chapitre 3.8.). Une synthèse intrathécale d'IgG est généralement observée dans 95% des cas de SEP mais également dans 30% à 50% des cas de pathologies neurologiques inflammatoires (en particulier d'origine infectieuse) et dans 5% à 10% des cas de maladies non inflammatoires du système nerveux (89). Pour notre cohorte de patient (N = 62 patients), la méthode d'IEF détecte plus de synthèse intrathécale

d'IgG (46,8%) que la technique d'IFIX (40,3%), que l'indice de Tourtelotte (40,3%) et que l'index de Link (35,5%) quel que soit le diagnostic clinique ce qui explique sa plus faible spécificité pour le diagnostic de SEP.

La VPP des 4 types d'analyses de recherche de synthèse intrathécale est inférieure à la VPN ce qui implique que tout résultat négatif obtenu par ces techniques sera en défaveur du diagnostic de SEP. Les VPP sont plus élevées pour les techniques qualitatives et d'après ces résultats, la technique d'IFIX est plus performante que l'IEF. Ainsi, il y a une plus grande probabilité qu'un patient soit atteint de SEP lorsqu'une synthèse intrathécale d'IgG est détectée par IFIX que par IEF.

Les VPN de ces 4 analyses ne sont pas significativement différentes et ceci a été prouvé à l'aide du test de χ^2 . Ce test est effectué à l'aide de l'équation suivante :

$$\chi^2 = \sum (x - X)^2 / X$$

On appelle x la VPN obtenue selon une technique donnée et X, la moyenne des 4 VPN calculées. La valeur χ^2 calculée est de 0,084 et elle est donc bien inférieure à la valeur χ^2 théorique pour 1 degré de liberté qui est égale à 3,84. Ainsi pour ces 4 méthodes de recherche de synthèse intrathécale, il existe une probabilité importante qu'un patient ne soit pas atteint de SEP si la technique qualitative ou quantitative ne détecte pas de synthèse intrathécale.

Le test Kappa démontre que les deux techniques qualitatives ont une concordance excellente pour la recherche d'une synthèse intrathécale (Kappa = 0,81). Cependant, pour le diagnostic de SEP, ce test montre que l'IFIX présente une meilleure concordance que l'IEF (Kappa = 0,671 versus Kappa = 0,565). De plus, les résultats du tableau 21 indiquent que l'IFIX paraît plus performante que l'IEF pour le diagnostic de SEP. Ceci est lié au fait que la technique d'IEF détecte plus de synthèse intrathécale d'IgG que celle d'IFIX ; en effet, pour la catégorie PI ("Pathologie inflammatoire du SNC et du système nerveux périphérique hors SEP"), l'IEF met en évidence une synthèse intrathécale dans 31% des cas contre 20,7% pour l'IFIX.

Les principales discordances entre la technique d'IEF et d'IFIX, concernant l'absence ou la présence d'une synthèse intrathécale, ont été observées dans 4 cas du groupe PI et dans 2 cas du groupe SEP. Dans 3 cas de pathologies neurologiques inflammatoires et 1 cas de SEP, l'IEF a permis de détecter une synthèse intrathécale d'IgG alors que l'IFIX était négative. Dans 1 cas de pathologie neurologique inflammatoire et dans l'autre cas de SEP, l'IEF était négative

alors que l'IFIX a permis de déceler une synthèse intrathécale. Nous avons donc calculé les coefficients Kappa permettant de démontrer l'accord entre les deux techniques qualitatives et la détection d'une synthèse intrathécale pour l'ensemble des groupes "SEP" + "PI". Les résultats du test Kappa montrent une mauvaise concordance pour les 2 techniques, Kappa = 0,09 pour l'IEF et Kappa = 0,072 pour l'IFIX. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une atteinte neurologique inflammatoire ne s'accompagne pas toujours d'une synthèse intrathécale d'Igs.

Les sensibilités médiocres des index de Link et Tourtelotte retrouvées dans notre travail montrent la nécessité d'employer conjointement ces index aux techniques électrophorétiques. Le tableau 22 résume les performances des ces deux méthodes de calcul vis-à-vis de la détection d'une synthèse intrathécale d'IgG par la technique d'IEF et vis-à-vis du diagnostic de SEP.

Comparaison		Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (risque d'erreur) (%)	VPN (risque d'erreur) (%)
Link	Synthèse intrathécale détectée par IEF	55,9	94,3	80 (20)	84,9 (16,1)
	SEP	74,2	87,3	57 (43)	93,7 (6,3)
Tourt.	Synthèse intrathécale détectée par IEF	55,9	89,9	69,3 (30,7)	83,3 (16,7)
	SEP	72,7	81,4	47 (53)	92,9 (7,1)

Tableau 22 : Performances des index de Link et Tourtelotte (Tourt.) en fonction de la détection d'une synthèse intrathécale par IEF et en fonction du diagnostic de SEP.

L'index de Link est beaucoup plus performant que l'indice de Tourtelotte par rapport à la détection d'une synthèse intrathécale par IEF et par rapport au diagnostic de SEP. Ces différences sont liées à l'influence de l'état de la BHE. En effet, nous avons pu observer lors de ce travail que dans 42,3% des cas, l'indice de Tourtelotte était supérieur à 3,3 mg/24h en présence d'une altération de la BHE dans le groupe "PI" tandis que dans les mêmes conditions, l'index de Link était supérieur à 0,70 dans 23,1% de ces cas. Cette constatation avait également été mise en évidence par l'équipe de Blennow en 1994 (50) : l'index de Link, IgGprod et Log IgG index n'étaient pas influencés par une altération de la BHE contrairement aux formules de Tourtelotte, Schuller et Reiber dont les résultats étaient alors surestimés.

Lors de cette étude, les résultats quantitatifs des 445 couples LCR/sérum ont été analysés à l'aide du logiciel Protis®. Ce dernier a permis le calcul du rapport QAlb permettant d'apprécier l'état de la BHE et celui des index de Link et de Tourtelotte. Il positionne également les résultats du patient sur le diagramme de Reiber. Ce logiciel ne remplace pas les techniques qualitatives car, comme indiqué précédemment, les index présentent de mauvaises performances et ne sont pas assez fiables pour la détection d'une synthèse intrathécale lors du diagnostic de SEP. Cet outil présente cependant l'avantage de fournir rapidement au clinicien une idée sur l'état de son patient ; il peut en effet à l'aide du diagramme de Reiber évaluer l'état de la BHE du patient et l'existence ou non d'une "probable" synthèse intrathécale. La lecture et l'interprétation des résultats quantitatifs sont ainsi plus aisées pour le clinicien, dans l'attente du résultat de l'IEF.

7.2.2. Comparaison par rapport à la littérature.

L'évaluation des performances d'IEF et d'IFIX mérite également d'être étudiée par rapport aux différents travaux décrits dans la littérature. Cette comparaison peut cependant s'avérer difficile du fait de l'importante variabilité des techniques employées, de la diversité des critères diagnostiques de la SEP (Poser *et al* (29), Mac Donald *et al* (30), Polman *et al* (31)), de la composition du groupe d'étude et de la définition d'une synthèse intrathécale d'IgG selon la technique employée.

En 2000, Caudie *et al* étudièrent l'apport des techniques d'IEF pour le diagnostic de SEP par rapport aux électrophorèses standard des protéines du LCR ou à l'index de Link (65). Le groupe d'étude était constitué de 1188 couples LCR/sérum classés en fonction du diagnostic clinique de la manière suivante : 281 cas de SEP réparties selon les critères diagnostiques de Poser *et al* (29) (182 SEP certaines et 99 SEP possibles/probables) ; 63 cas de pathologies neurologiques inflammatoires ; 180 cas de pathologies neurologiques non inflammatoires et 664 malades sans diagnostic clinique précis.

L'IEF était effectuée sur gel d'agarose et l'immunorévélation était réalisée, après transfert sur membrane, avec un Ac anti-IgG de chèvre biotinylé. La technique permettait l'analyse de 6 couples LCR/sérum. Contrairement à l'IEF, l'électrophorèse standard nécessitait de concentrer le LCR afin d'obtenir une concentration d'IgG à 8 g/L. Après la migration électrophorétique des couples LCR/sérum, les protéines étaient colorées au violet Paragon. Les dosages de l'albumine et des IgG dans le LCR et dans le sérum étaient réalisés par néphélométrie. Un index IgG supérieur à 0,70 était en faveur d'une synthèse intrathécale

d'IgG. Dans le groupe SEP certaines, l'index IgG était supérieur à 0,70 dans 69% des cas et une synthèse intrathécale d'Igs était mise en évidence dans 57% des cas par électrophorèse standard et dans 94% des cas par IEF. Cette étude confirmait les performances analytiques médiocres de l'électrophorèse des protéines du LCR. Pour le diagnostic de SEP, l'IEF possédait une sensibilité et une spécificité respectives de 94% et 96%. La même valeur de sensibilité a été retrouvée dans notre étude mais les résultats de spécificité sont très différents (69,6%) ; ceci peut s'expliquer en partie par la taille de notre groupe d'étude, 62 couples LCR/sérum contre 1188, avec seulement 17 cas de SEP. De plus, le calcul de la sensibilité dans l'étude de Caudie *et al* (65) est estimé en fonction du nombre de SEP certaines ; si l'on tient compte de tous les cas de SEP (N = 281), la sensibilité de l'IEF chute à 74%. Cependant, les résultats de Caudie sont conformes à ceux publiés sur de grandes séries d'échantillons qui sont beaucoup plus représentatives que notre cohorte.

Une autre étude menée également par Caudie *et al* a permis de comparer la technique d'IEF couplée à un immunotransfert à celle d'IFIX de Sébia® ("HYDRAGEL 6 CSF") (68). Le groupe d'étude était constitué de 144 couples LCR/sérum répartis en 56 cas de SEP (27 cas de SEP certaines et 29 cas de SEP possibles/probables), 4 cas de pathologies neurologiques inflammatoires, 35 cas de pathologies neurologiques non inflammatoires et 49 cas de manifestations neurologiques sans diagnostic précis. Les deux techniques électrophorétiques avaient été réalisées sur l'ensemble des échantillons. L'IEF consistait en une migration électrophorétique des protéines sur gel d'agarose suivie d'une immunorévélation des IgG sur membrane de PVDF. La révélation des IgG était effectuée par le système avidine-biotine. Selon cette étude, la méthode d'IFIX et d'IEF avaient respectivement une sensibilité de 90% et de 95% et une spécificité de 94% et 100% ce qui montre les meilleures performances de l'IEF. Cependant, les groupes pris en compte pour ce calcul correspondent aux 27 cas de "SEP certaines" et aux 4 cas de pathologies neurologiques inflammatoires (N = 27 + 4 soit 31 patients). Ces 31 patients ont été comparés au groupe constitué de 35 cas de pathologies neurologiques non inflammatoires. Cette cohorte n'est au final pas représentative de la réalité et elle surestime donc les valeurs de sensibilité et de spécificité.

En 2005, Fromont *et al* avaient comparé de la même manière la technique d'IFIX de Sébia® à celle d'IEF couplée à un immunotransfert sur membrane de PVDF et immunorévélation par le système avidine-biotine (90). Cette étude avait été effectuée sur 177 couples LCR/sérum répartis en 103 cas de pathologies neurologiques non inflammatoires et en 74 cas de SEP. Tous ces échantillons avaient bénéficié d'une détermination de l'index de Link et d'une

analyse électrophorétique par IEF et par IFIX qui permettait l'utilisation de LCR non concentré. Les auteurs avaient analysé les différents résultats obtenus pour déterminer les performances de chaque technique électrophorétique. Les sensibilités, spécificités, VPP et VPN respectives étaient de 82,2%, 93,2%, 75% et 94% pour la technique d'IEF et, de 82,2%, 95,1%, 80% et 93,3% pour celle d'IFIX dans le cadre du diagnostic de SEP. Ces résultats mettent en évidence une concordance excellente entre les deux techniques électrophorétiques pour la détection de synthèse intrathécale d'IgG dans le diagnostic de SEP.

Des différences significatives existent entre nos résultats et ceux de Caudie *et al* (65, 68) et de Fromont *et al* (90), mais également entre les résultats de ces 2 équipes. Fromont *et al* expliquait que ces différences seraient liées à la méthode de classification des patients (90). Leur étude utilisait l'algorithme diagnostique du logiciel EDMUS (European Database for Multiple Sclerosis) qui classe les SEP selon les critères diagnostiques de Poser *et al* (29) en SEP cliniquement certaine, SEP certaine avec l'aide du laboratoire, SEP cliniquement probable et SEP probable avec l'aide du laboratoire. Le laboratoire apporte l'information de l'existence ou non d'une synthèse intrathécale d'IgG qui peut être primordiale dans le cadre d'un diagnostic de SEP lorsque les données cliniques ou IRM sont peu informatives ou atypiques. La classification utilisée dans cette étude surestime le nombre de cas de SEP dans la cohorte ce qui entraîne une sous-estimation de la sensibilité des techniques d'IEF et d'IFIX. De plus, l'absence de cas de pathologies neurologiques inflammatoires où il peut exister une synthèse intrathécale d'IgG, surestime les valeurs des spécificités, VPP et VPN. Cette situation ne correspond pas à ce qui se passe réellement en pratique dans les laboratoires. Une évaluation des performances de ces techniques électrophorétiques est donc plus juste lorsque les cas de SEP sont comparés à une multiplicité d'autres pathologies neurologiques, inflammatoires ou non.

Toutes ces études tendent néanmoins vers une même conclusion en démontrant que la technique d'IEF est la technique la plus sensible et la plus spécifique pour la recherche de synthèse intrathécale d'IgG. La technique d'IFIX de Sébia® était auparavant préférée à l'IEF trop longue (une journée en moyenne) et fastidieuse pour être utilisée en routine dans les laboratoires. Cependant, les auteurs rapportent les difficultés de lecture des plaques d'IFIX notamment lorsque les bandes IgG sont peu intenses et diffuses. Les plaques d'IEF présentent en effet l'avantage d'offrir un plus large "champ d'observation" ; les pistes sont plus longues et une bande unique d'IgG en IFIX peut migrer en plusieurs bandes par IEF selon le degré de glycosylation d'une même IgG. La lecture de la plaque est ainsi plus aisée.

Depuis fin 2003, la société Sébia® a commercialisé un kit prêt à l'emploi d'IEF sur l'appareil Hydrasis® Focusing qui rend la technique plus facilement réalisable et moins longue (environ 3h). Ce kit permet ainsi une meilleure standardisation de la méthode tout en respectant les différentes recommandations de la dernière conférence de consensus sur l'analyse biologique du LCR pour le diagnostic de SEP (27, 91).

7.3. Autres pathologies associées à une synthèse intrathécale d'Igs.

Lors de notre étude, 125 profils oligoclonaux d'IgG dans le LCR non retrouvés dans le sérum (soit 28,5%) ont été mis en évidence parmi les 445 couples LCR/sérum de notre cohorte. Une synthèse intrathécale d'IgG a été retrouvée dans 97% (64/66) des cas du groupe SEP, 27,3% (53/194) des cas du groupe PI ("Pathologie inflammatoire du SNC et du système nerveux périphérique hors SEP"), 4,1% (4/97) des cas du groupe PNI ("Pathologie non inflammatoire du système nerveux") et dans 5,3% (4/75) des cas du groupe "Syndrome isolé". Ces résultats démontrent à nouveau qu'une synthèse intrathécale d'IgG n'est pas spécifique de la SEP et qu'elle peut être retrouvée dans d'autres pathologies neurologiques d'origine infectieuse, tumorale ou auto-immune.

En 1993, l'étude de Zeman *et al* permit de démontrer l'importante variabilité de pathologies neurologiques présentant une synthèse intrathécale en s'appuyant sur la notion essentielle de comparaison en parallèle des profils électrophorétiques du LCR et du sérum (92). Le groupe d'étude était constitué de 1874 couples LCR/sérum et l'analyse électrophorétique avait été réalisée par IEF suivie d'un immunotransfert sur membrane de nitrocellulose puis d'une révélation enzymatique des IgG par un système à double Ac. L'équipe de Zeman s'intéressa plus particulièrement aux patients présentant des bandes IgG dans le LCR et dans le sérum. Deux types de profils électrophorétiques furent définis :

- Profil oligoclonal des IgG identique dans le LCR et dans le sérum (synthèse systémique),
- profil oligoclonal des IgG dans le LCR et dans le sérum mais avec présence de bandes surnuméraires dans le LCR (synthèse intrathécale et systémique).

Les diagnostics cliniques avaient pu être établis chez 102 patients présentant un profil oligoclonal des IgG dans le sérum, 56 profils traduisant une synthèse systémique d'IgG et 46 profils traduisant une synthèse intrathécale et systémique d'IgG. Les patients atteints de SEP représentaient 57% du groupe synthèse intrathécale et systémique d'IgG. Dans ce

groupe, les autres pathologies neurologiques retrouvées étaient d'origine infectieuse (29%), inflammatoire (9%) et tumorale (6%).

Dans le groupe synthèse systémique, les pathologies majoritairement retrouvées étaient les cas de neuropathies périphériques (18%), de pathologies neurologiques inflammatoires (18%), de syndrome de Guillain-Barré (16%), de syndrome néoplasique (16%) et de pathologies neurologiques infectieuses (14%). Seul un cas de SEP (2%) était mis en évidence. Ce type de profil est rarement observé dans les SEP et, dans le cas où celui-ci est présent chez un patient dont le diagnostic de SEP est suspecté, il est fortement recommandé de revoir le diagnostic et/ou de reconstrôler l'analyse du LCR.

Ces résultats montrent ainsi l'importance de l'analyse biologique en parallèle du couple LCR/sérum et de plus à des concentrations identiques en IgG ; en effet, sans l'analyse du profil électrophorétique des IgG du sérum, il n'est pas possible de distinguer une synthèse intrathécale d'une synthèse systémique d'IgG. Toutes les pathologies présentant une synthèse systémique auraient été faussement classées en profil traduisant une synthèse intrathécale d'IgG alors que dans ce groupe, la SEP est minoritaire (2%). De plus, cette étude souligne le fait que de nombreuses pathologies neurologiques inflammatoires autres que la SEP peuvent être accompagnées d'une synthèse intrathécale d'IgG. Cependant, l'analyse électrophorétique des IgG du LCR et du sérum ne peut pas contribuer à elle seule au diagnostic de SEP.

En 1995, Mc Lean et al (33) ont étudié les profils électrophorétiques des IgG dans le LCR et dans le sérum de 75 patients répartis en 43 cas de sarcoïdose, 20 cas de lupus érythémateux disséminé et 12 cas de maladie de Behçet. Ces 3 pathologies sont des maladies systémiques inflammatoires et les prélèvements ont été effectués lors d'une atteinte neurologique au cours de ces maladies. Une synthèse intrathécale d'IgG avait été mise en évidence chez 51% des patients atteints de sarcoïdose, chez 25% des patients atteints de lupus et chez 8% des patients atteints de maladie de Behçet. De plus, une altération de la BHE, évaluée par le rapport QAlb, était mise en évidence dans 47% des cas de sarcoïdose, dans 30% des cas de lupus et dans 42% des cas de maladie de Behçet. Cette étude montre une proportion importante d'altération de la BHE au cours de ces 3 pathologies ; ceci est confirmé par le fait qu'un traitement par corticoïde au cours de ces 3 maladies systémiques permettait d'améliorer l'état de la BHE et, par conséquent de diminuer le nombre de bandes oligoclonales d'IgG dans le LCR. Dans les cas de SEP, la BHE est généralement intacte et un traitement anti-inflammatoire n'a aucune influence sur la synthèse intrathécale d'Igs ; si tel est le cas, le diagnostic de SEP doit être révisé.

La mise en évidence d'une synthèse intrathécale d'Igs ne peut donc pas à elle seule permettre de poser le diagnostic de SEP puisqu'elle peut être retrouvée de manière transitoire dans de nombreuses pathologies neurologiques inflammatoires ou non. L'IRM et d'autres examens complémentaires tels les sérologies, les biopsies, les analyses microbiologiques ou la recherche d'Auto-Ac sont essentiels pour le diagnostic différentiel de la SEP. Cependant, lorsqu'un doute diagnostique persiste à l'issue de l'ensemble des examens cliniques et biologiques, la preuve d'une synthèse intrathécale d'Igs par les techniques qualitatives devient primordiale.

Cette synthèse intrathécale d'Igs présente de plus un certain intérêt lorsque les patients ont un syndrome neurologique isolé. Des études menées par Zipoli *et al* (93) et Tintoré *et al* (94) montraient que la présence d'une synthèse intrathécale d'Igs lors d'un trouble neurologique isolé augmentait de deux fois le risque de développer ultérieurement une SEP et ceci, indépendamment des résultats obtenus à l'IRM.

Dans l'étude de Tintoré *et al* (94), 415 patients avec un syndrome neurologique isolé avaient bénéficié d'une IRM et d'une analyse électrophorétique des IgG du LCR et du sérum par IEF. Une synthèse intrathécale d'IgG avait été mise en évidence chez 254 patients (61%) dont 127 cas se sont révélés être des SEP. Parmi ces patients atteints de SEP, 31% d'entre eux ne présentaient pas initialement d'anomalies évocatrices à l'IRM selon les critères diagnostiques de Barkhof.

L'IRM reste cependant un outil diagnostique incontestable mais en cas de syndrome neurologique isolé sans lésions observées à l'IRM, l'analyse biologique du LCR est très informative. L'association de ces deux examens permet un diagnostic fiable et précis en cas de SEP mais il est important de rappeler que dans les formes débutantes de SEP, l'IRM est normale dans un tiers des cas et l'analyse électrophorétique du LCR ne révèle pas de synthèse intrathécale d'Igs dans 15% des cas.

7.4. Absence de synthèse intrathécale d'Igs dans les SEP.

Lors de notre étude, 2 patients atteints de SEP (soit 3%) ne présentaient pas de synthèse intrathécale d'IgG. Ce résultat est en accord avec ceux retrouvés dans la littérature (95). Pour un patient, l'IEF avait révélé un profil polyclonal des IgG dans le LCR et dans le sérum (l'IFIX n'avait pas été réalisée). Le diagnostic de SEP bénigne avait été établi sur la base de l'examen clinique, de la présence de deux poussées en 15 ans et des données de l'IRM.

Pour l'autre patient, la technique d'IFIX, réalisée en 2006 lors de la demande d'examen, avait révélé une synthèse intrathécale d'IgG (présence d'une bande IgG dans le LCR avec un profil polyclonal des IgG dans le sérum) et paradoxalement, celle d'IEF, réalisée en 2008 sur le prélèvement conservé congelé, avait mis en évidence un profil oligoclonal des IgG identique dans le LCR et dans le sérum. Or, fin 2007, le diagnostic de SEP était toujours confirmé suite à l'hospitalisation de ce patient pour une nouvelle phase de poussée de sa maladie.

L'absence de synthèse intrathécale d'IgG dans les cas de SEP doit faire envisager différentes situations :

- Recherche de synthèse intrathécale d'IgM, d'IgA ou de CL (Kappa et Lambda),
- SEP débutante avec une faible expression de la synthèse intrathécale d'Igs,
- SEP avec une "véritable absence" de synthèse intrathécale d'Igs.

Dans un premier temps, devant une suspicion de SEP avec une absence de profil oligoclonal des IgG dans le LCR, les différentes études abordées dans notre travail préconisent la recherche de synthèse intrathécale des IgM, des IgA et de CL par technique électrophorétique et/ou par des formules mathématiques.

Les synthèses intrathécales d'IgM ou d'IgA sont très rarement observées dans les cas de SEP et elles sont plus fréquemment retrouvées dans les cas de pathologies neurologiques d'origine infectieuse ou auto-immune (96). L'analyse des IgM et des IgA dans le LCR ne présente donc pas un intérêt majeur pour le diagnostic de SEP. La technique d'IFIX utilisée auparavant au laboratoire de biochimie du CHU de Rennes, permettait la recherche de synthèse intrathécale d'IgG, d'IgA et d'IgM d'un couple LCR/sérum donné sur une même plaque de migration. La recherche d'IgA ou d'IgM était effectuée lors de l'absence de profil oligoclonal des IgG dans le LCR, non retrouvé dans le sérum, associée à une concentration d'IgA supérieure à 10 mg/L ou d'IgM supérieure à 40 mg/L. Ces analyses se sont rarement révélées nécessaires ; en effet, sur 2288 IFIX effectuées au laboratoire sur une période de 5 ans (avril 2003 à avril 2008), la recherche de synthèse intrathécale d'IgA concernait 0,96% (22 / 2288) des demandes et celle d'IgM, 0,17% (4 / 2288) des demandes.

En revanche, l'analyse électrophorétique des CL Kappa et Lambda dans le LCR paraît plus informative. L'étude de Goffette *et al* (46) montra que parmi 33 cas de SEP sans profil oligoclonal d'IgG dans le LCR, 54% présentaient une synthèse intrathécale de CL libres Kappa détectée par IEF. De plus, les bandes oligoclonales à CL libres Kappa seraient plus

facilement visualisées sur les plaques d'IEF du fait de l'absence de fond polyclonal contrairement aux IgG.

Dans un deuxième temps, il est important de rappeler qu'une absence de profil oligoclonal des Igs dans le LCR peut être observée dans 15% des cas de SEP débutante. Devant une suspicion diagnostique de SEP, un contrôle du profil électrophorétique des IgG du LCR est préconisé environ un an après la première ponction lombaire ou lors d'une nouvelle poussée.

Le troisième point qui consiste en la "véritable absence" de synthèse intrathécale d'Igs mérite d'être détaillé. En 1985, Farrel *et al* avaient autopsié 18 patients pour lesquels un diagnostic de SEP avait été établi. Les couples LCR/sérum avaient été analysés avant le décès des patients par électrophorèse standard ou par IEF suivies d'une coloration standard des protéines (97). Quatre patients ne présentaient pas de bandes oligoclonales dans le LCR. Les autopsies avaient confirmé le diagnostic de SEP pour l'ensemble du groupe d'étude et ainsi apporté la preuve que la maladie pouvait être dépourvue de synthèse intrathécale d'Igs. Selon les auteurs, cette absence serait liée à un nombre plus faible de plaques actives ou de cellules autoréactives au sein de la substance blanche.

En 1996, Zeman *et al* étudièrent les diagnostics cliniques de 34 patients ayant présenté un trouble neurologique et dont l'analyse électrophorétique du LCR par IEF n'avait pas mis en évidence de synthèse intrathécale d'IgG et de CL Kappa et Lambda (95). Huit cas de SEP avaient été diagnostiqués ; 6 de ces patients avaient bénéficié d'une 2^{ème} ponction lombaire et la technique d'IEF avait permis de mettre en évidence une synthèse intrathécale d'IgG et/ou de CL chez 3 patients. Les cas de SEP sans profil oligoclonal d'Igs dans le LCR sont rares et leur fréquence est d'environ 3%. Selon cette étude, ces cas de SEP toucheraient autant les hommes que les femmes, contrairement aux SEP avec synthèse intrathécale d'IgG (ratio Femme/Homme à 2) et elles seraient de meilleur pronostic à cause du faible nombre de plaques actives au sein de la substance blanche.

L'étude de Sá *et al* (98) avait montré que sur 92 cas de SEP, une absence de profil oligoclonal d'IgG dans le LCR analysé par IEF était retrouvé dans 16% des cas. Ce résultat est plus élevé que ceux retrouvés dans d'autres études et il pourrait être expliqué par l'absence de recherche de synthèse intrathécale d'IgM, d'IgA et de CL Kappa et Lambda. Les auteurs préconisaient une nouvelle analyse électrophorétique du LCR et selon eux, une absence de synthèse intrathécale d'Igs dans les SEP suggérerait un meilleur pronostic.

Deux études menées en 2006 par Imrell *et al* (99) et en 2009 par Siritho *et al* (100) indiquaient à l'inverse qu'il n'existait pas de différence entre les SEP avec ou sans synthèse intrathécale d'Igs. En effet, dans les deux cas, la maladie posséderait les mêmes caractéristiques cliniques, démographiques et pronostiques et, seules les caractéristiques génotypiques diffèreraient. La présence du gène HLA-DRB1*15 augmenterait le risque de détecter une synthèse intrathécale d'Igs lors d'une SEP tandis que le gène HLA-DRB1*04 augmenterait le risque qu'il n'y en ait pas (99). Siritho *et al* montrèrent cependant qu'il pouvait exister une différence entre les SEP avec ou sans synthèse intrathécale d'Igs au niveau des clichés obtenus à l'IRM (100). Les SEP sans synthèse intrathécale d'Igs présenteraient une localisation atypique des lésions observées à l'IRM qui ne correspond pas aux critères diagnostiques de Mac Donald (30). De plus, dans ces cas de SEP, l'index IgG serait rarement supérieur à 0,70.

Toutes ces études mettent en évidence la faible proportion de SEP sans synthèse intrathécale d'Igs (environ 2 à 5%) et elles précisent l'importance de contrôler à nouveau le LCR devant une suspicion de SEP.

7.5. SEP pédiatriques.

Aucun cas de SEP pédiatrique n'a été observé lors de ce travail. Cependant, une jeune patiente âgée de 13 ans a attiré notre attention. En mars 2008, cette patiente était admise aux urgences pédiatriques pour léger fébricule, paralysie faciale, troubles oculomoteurs et de la déglutition. L'IRM, l'analyse biologique du LCR et d'autres examens complémentaires étaient normaux mais une surveillance régulière a été mise en place du fait de ses antécédents familiaux (2 cas de SEP dans la famille proche).

Dans les formes pédiatriques, l'encéphalomyélite aiguë disséminée (ADEM pour Acute Disseminated EncephaloMyelitis) constitue le diagnostic différentiel majeur de la SEP qui ne représente que 2 à 5% des causes d'atteintes neurologiques chez les enfants de moins de 16 ans. Le diagnostic de SEP pédiatrique est difficile ; en effet, plus l'enfant est jeune, plus la clinique, les examens biologiques et les clichés IRM sont atypiques. Cependant, il doit être le plus précoce possible afin de préserver au maximum la fonction neurologique de l'enfant et de limiter l'apparition d'un handicap irréversible (101, 102).

Deux études seront présentées dans ce chapitre.

La première avait été menée par Dale *et al* (103) pendant 6 ans sur 48 enfants atteints de pathologies démyélinisantes : 35 cas d'encéphalomyélite (28 cas d'ADEM et 7 cas d'encéphalomyélite multiphasique disséminée) et 13 cas de SEP. Les auteurs avaient comparé les signes cliniques observés lors du premier épisode neurologique, les données de l'IRM et l'analyse biologique du LCR. Ainsi, les enfants atteints d'encéphalomyélite présentaient surtout un tableau initial polysymptomatique tandis que pour les enfants atteints de SEP, le tableau clinique était plutôt monosymptomatique. Le nombre de lymphocytes dans le LCR était augmenté dans 64% des cas d'encéphalomyélite et dans 42% des cas de SEP. Une synthèse intrathécale d'IgG était observée dans 29% des cas d'encéphalomyélite et dans 64% des cas de SEP. Enfin, lors d'une IRM de contrôle, de nouvelles lésions étaient visualisées dans tous les cas de SEP et dans aucun cas d'encéphalomyélite. Selon les auteurs, la distinction de ces 3 pathologies est essentielle et ils recommandent un contrôle des données IRM et de l'analyse biologique du LCR pour poser de manière fiable le diagnostic et ainsi prévoir la survenue d'une nouvelle poussée.

La deuxième étude expose le suivi de 68 enfants de moins de 17 ans (48 cas de SEP et 20 cas d'ADEM) pendant 12 ans (104). Une technique d'IEF couplée à une immunofixation avait été réalisée sur les couples LCR/sérum et une synthèse intrathécale d'IgG avait été observée dans 83% des cas de SEP et dans 10% des cas d'ADEM. Un index IgG supérieur à 0,70 avait été retrouvé dans 64% des cas de SEP et dans 15% des cas d'ADEM et, une altération de la BHE était présente dans 12% des cas de SEP et dans 50% des cas d'ADEM. Les filles étaient plus touchées que les garçons dans les cas de SEP, ratio Femme/Homme à 2,8, contrairement aux cas d'ADEM où le ratio Femme/Homme était de 0,6. Dans cette étude, l'âge de début de la maladie pour les cas d'ADEM était d'environ 8,1 ans et, il était de 14,5 ans pour les cas de SEP ce qui pourrait impliquer le rôle de la puberté dans le déclenchement de la maladie. Les auteurs insistent sur le fait qu'il est essentiel de contrôler l'IRM et l'analyse biologique du LCR car la disparition de lésions et/ou d'une synthèse intrathécale d'IgG serait dans ce cas plus en faveur d'une ADEM que d'une SEP.

Les critères diagnostiques de Mac Donald (30) ne peuvent pas être appliqués aux cas de SEP pédiatriques à cause du nombre faible de lésions et de leur localisation atypique à l'IRM (105). En 2007, une conférence de consensus a établi des critères pour faciliter le diagnostic de SEP chez les enfants et adolescents de moins de 17 ans (106) :

- Antécédents familiaux de SEP,
- tableau initial de syndrome neurologique isolé,
- LCR anormal avec synthèse intrathécale d'IgG à l'IEF **OU** index de Link supérieur à 0,70,
- présence d'au moins deux poussées avec mise en évidence à l'IRM de lésions neurologiques avec dissémination spatiale et temporelle.

Le diagnostic de SEP chez un enfant doit être posé avec précaution après un contrôle de L'IRM et de l'analyse biologique du LCR. En effet, l'absence de synthèse intrathécale d'IgG peut être observée en cas de SEP débutante. Une étude menée par Pohl et al (107) montre dans ce cas, l'utilité du calcul de l'index IgM qui est positif dans 36% des cas de SEP pédiatrique contrairement aux formes adultes où cet index est rarement positif.

Le diagnostic de SEP doit être réalisé le plus tôt possible afin de limiter l'apparition du handicap neurologique irréversible et, contrairement aux formes adultes de SEP, l'enfant doit présenter 2 poussées pour poser le diagnostic de manière fiable.

8. CONCLUSION

8. CONCLUSION.

La sclérose en plaque (SEP) est la pathologie chronique démyélinisante la plus fréquente de l'adulte jeune et son diagnostic peut s'avérer difficile. L'examen clinique, l'IRM, l'analyse biologique du LCR et les potentiels évoqués constituent les outils essentiels au diagnostic. Au niveau biologique, le diagnostic de SEP repose sur la mise en évidence d'une synthèse intrathécale d'IgG par des techniques qualitatives et quantitatives mais cette anomalie n'est pas spécifique de la maladie et, à l'heure actuelle, il n'existe pas de test biologique spécifique permettant d'affirmer le diagnostic.

Depuis 2005, l'isoélectrofocalisation (IEF) est la méthode de référence pour détecter un profil oligoclonal des IgG dans le LCR, non retrouvé dans le sérum, pour le diagnostic de SEP. Cette technique, commercialisée depuis 2003 par la société Sébia® sous forme de kit prêt à l'emploi, a été mise en place en avril 2008 au laboratoire de biochimie du CHU de Pontchaillou et elle a été évaluée sur 445 couples LCR/sérum sur une période de 9 mois. De plus, parmi ces échantillons, 62 couples LCR/sérum ont été analysés par IEF et par immunofixation (IFIX) afin d'effectuer une étude comparative des deux techniques qualitatives. Au total, cette nouvelle méthode d'analyse a montré de bonnes performances avec une sensibilité de 94,1% et une spécificité de 69,6% pour le diagnostic de SEP. Notre étude a également démontré que cette technique détecte plus de synthèse intrathécale d'IgG que l'IFIX, expliquant ainsi sa plus faible spécificité vis-à-vis de la SEP.

Nos résultats ont été comparés à ceux de nombreuses études qui rappellent les excellentes performances de l'IEF pour le diagnostic de SEP. Cependant, dans notre étude et contrairement à ces différents travaux, l'intérêt de l'IEF pour le diagnostic de SEP a été analysé par rapport à d'autres pathologies neurologiques, inflammatoires ou non, où une synthèse intrathécale d'IgG est susceptible d'être détectée. Bien que paraissant moins performants que ceux présentés dans la littérature, nos résultats sont cependant représentatifs de l'ensemble des demandes de recherches de pathologies intrathécales.

Grâce au kit "HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING", la technique d'IEF est plus facilement réalisable puisque semi-automatisée. Elle comporte cependant quelques difficultés pratiques qu'il est important de savoir parfaitement maîtriser puisque tout artéfact de révélation pourra entraîner une interprétation erronée des profils. La lecture des plaques est plus aisée : les pistes de migration de l'IEF offrent un plus large champ d'observation que

celles de l'IFIX ; une bande unique d'IgG à l'IFIX se présente sous la forme de plusieurs bandes à l'IEF.

Les différents résultats quantitatifs ont été analysés par le logiciel d'aide au diagnostic Protis®. Cet outil offre de nombreux avantages : possibilité de connexion directe du logiciel à l'appareil de néphélométrie (BNII®) ; génération d'un commentaire prédéfini selon les résultats des index (Link et Tourtelotte), de l'état de la BHE et de la représentation du diagramme de Reiber ; création d'un compte rendu clair qui permet une interprétation facilitée des résultats du patient. Bien qu'une recherche de synthèse intrathécale d'IgG par les formules de Link et de Tourtelotte ne soit pas aussi fiable que par les techniques qualitatives, le compte rendu généré par le logiciel pourrait apporter rapidement un premier élément d'information au clinicien pour le diagnostic de SEP.

Ainsi, ce travail montre l'importance de la place de l'IEF au sein des différentes analyses biologiques pour la recherche de pathologies neurologiques démyélinisantes. Cette technique, corrélée aux dosages de l'albumine et des IgG dans le LCR et dans le sérum et aux résultats des différents index, par l'intermédiaire ou non du logiciel d'aide au diagnostic Protis®, permet de détecter de manière fiable une synthèse intrathécale d'IgG.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Vibert JF, Sébille A, Lavattard-Rousseau MC, Boureau F. Neurophysiologie : De la physiologie à l'exploration fonctionnelle. Masson, Elsevier (Coll Campus illustré), Paris ; 2005.
2. Richard D, Orsal D. Neurophysiologie–Organisation et fonctionnement du système nerveux, Deuxième édition. Dunod, Paris. 2001.
3. Crossman AR, Neary MDD. Neuroanatomie. Elsevier Masson (Coll Campus illustré), Paris ; 2004.
4. Dubret G, Cousin FR. Eléments d'anatomie et de physiologie du système nerveux central. Flammarion médecine-sciences. 1985.
5. Bolsacq-Schepens N, Crommelinck M. Neurosciences 4ème édition. Dunod, Paris. 2004.
6. Bogousslavsky J, Léger J, Mas J. Affections démyélinisantes. Neuro-immunologie et clinique. Doin (Traité de Neurologie). 1999.
7. Kabat EA, Moore DH, Landow H. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. J Clin Inves. 1942 ; **21**(5) : 571-7.
8. Morgan BP, Campbell AK, Compston DA. Terminal component of complement (C9) in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. Lancet. 1984 ; **2** : 251-4.
9. Aloisi F, Ria F, Adorini L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells : different roles for microglia and astrocytes. Immunol Today. 2000 ; **21**(3) : 141-7.
10. Confavreux C. Multiple sclerosis: the new frontier. Rev Prat. 2006 ; **56**(12) : 1290-2.
11. Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis : a systematic review. Neurology. 2008 ; **71**(2) : 129-35.

12. Debouverie M, Rumbach L, Clavelou P. The organisation of health care and epidemiology of multiple sclerosis in France. *Rev Neurol (Paris)*. 2007 ; **163**(6-7) : 637-45.
13. Kurtzke JF. Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta Neurol Scand*. 1980 ; **62**(2) : 65-80.
14. Dutta R, Trapp BD. Pathology and definition of multiple sclerosis. *Rev Prat*. 2006 ; **56**(12) : 1293-8.
15. Smith KJ. Pathophysiology of multiple sclerosis. *Rev Prat*. 2006 ; **56**(12) : 1299-303.
16. Laplaud D, Confavreux C. Etiology of multiple sclerosis. *Rev Prat*. 2006 ; **56**(12) : 1306-12.
17. Yaouanq J, Semana G, Eichenbaum S, Quelvennec E, Roth MP, Clanet M, Edan G, Clerget-Darpoux F. Evidence for linkage disequilibrium between HLA-DRB1 gene and multiple sclerosis. The French Research Group on Genetic Susceptibility to MS. *Science*. 1997 ; **276**(5313) : 664-5.
18. Kenealy SJ, Babron M, Bradford Y, Schnetz-Boutaud N, Haines JL, Rimmler JB, Schmidt S, Pericak-Vance MA, Barcellos LF, Lincoln RR, Oksenberg JR, Hauser SL, Clanet M, Brassat D, Edan G, Yaouanq J, Semana G, Cournu-Rebeix I, Lyon-Caen O, Fontaine B. A second-generation genomic screen for multiple sclerosis. *Am J Hum Genet*. 2004 ; **75**(6) : 1070-8.
19. Confavreux C, Vukusic S. The natural history of multiple sclerosis. *Rev Prat*. 2006 ; **56**(12) : 1313-20.
20. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996 ; **46**(4) : 907-11.

21. Confavreux C, Aimard G, Devic M. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain*. 1980 ; **103**(2) : 281-300.
22. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000 ; **343**(20) : 1430-8.
23. de Seze J, Confavreux C. Multiple sclerosis: positive diagnosis. *Rev Prat*. 2006 ; **56**(12) : 1321-5.
24. Ranjeva J, Audoin B, Pelletier J, Confavreux C. Contribution of nuclear magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Rev Prat*. 2006 ; **56**(12) : 1326-35.
25. Pelletier J, Audoin B, Ranjeva JP. Future of non conventional MR techniques in MS. *Rev Neurol (Paris)*. 2007 ; **163**(6-7) : 663-6.
26. Link H, Huang Y. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*. 2006 ; **180**(1-2) : 17-28.
27. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Ohman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CJM, Sellebjerg F, Tourtellotte WW. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol*. 2005 ; **62**(6) : 865-70.
28. Souverijn JH, Serrée HM, Peet R, Grenzebach Smit W, Bruyn GW. Intrathecal immunoglobulin synthesis. Comparison of various formulae with the 'gold standard' of isoelectric focusing. *J Neurol Sci*. 1991 ; **102**(1) : 11-6.
29. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW. New diagnostic criteria for multiple sclerosis : guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983 ; **13**(3) : 227-31.

30. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001 ; **50**(1) : 121-7.
31. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.* 2005 ; **58**(6) : 840-6.
32. Sindic CJ, Van Antwerpen MP, Goffette S. The intrathecal humoral immune response : laboratory analysis and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med.* 2001 ; **39**(4) : 333-40.
33. McLean BN, Miller D, Thompson EJ. Oligoclonal banding of IgG in CSF, blood-brain barrier function, and MRI findings in patients with sarcoidosis, systemic lupus erythematosus, and Behçet's disease involving the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995 ; **58**(5) : 548-54.
34. Menge T, Hemmer B, Nessler S, Wiendl H, Neuhaus O, Hartung H, Kieseier BC, Stüve O. Acute disseminated encephalomyelitis: an update. *Arch Neurol.* 2005 ; **62**(11) : 1673-80.
35. Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta.* 1987 ; **163**(3) : 319-28.
36. Gillain N, Fumal A, Minon JM. Oligoclonal bands and IgG Index interpreted according to Reiber in the inflammatory diseases of the central nervous system. *Immuno-analyse et biologie spécialisée.* 2006 ; **21**(6) : 348-56.
37. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci.* 2001 ; **184**(2) : 101-22.

38. Blennow K, Fredman P, Wallin A, Gottfries CG, Karlsson I, Langstrom G, Skoog I, Svennerholm L, Wikkelso C. Protein analysis in cerebrospinal fluid. II. Reference values derived from healthy individuals 18-88 years of age. *Eur Neurol.* 1993 ; **33**(2) : 129-33.
39. Liebsch R, Kornhuber ME, Dietl D, von Einsiedel HG, Conrad B. Blood-CSF barrier integrity in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 1996 ; **94**(6) : 404-10.
40. Bienvenu J. Dosage des immunoglobulines sériques. Le cahier de formation, Biologie médicale N°28, Bioforma. Paris: 2003.
41. Mandrioli J, Sola P, Bedin R, Gambini M, Merelli E. A multifactorial prognostic index in multiple sclerosis: Cerebrospinal fluid IgM oligoclonal bands and clinical features to predict the evolution of the disease. *J Neurol.* 2008 ; **255**(7) : 1023-31.
42. Link H, Zettervall O. Multiple sclerosis: disturbed kappa: lambda chain ratio of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid. *Clin Exp Immunol.* 1970 ; **6**(3) : 435-8.
43. Sindic CJ, Laterre EC. Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. An immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J Neuroimmunol.* 1991 ; **33**(1) : 63-72.
44. Krakauer M, Nielsen HS, Jensen J, Sellebjerg F. Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 1998 ; **98**(3) : 161-5.
45. Jenkins MA, Cheng L, Ratnaike S. Multiple sclerosis: use of light-chain typing to assist diagnosis. *Ann Clin Biochem.* 2001 ; **38**(3) : 235-41.
46. Goffette S, Schluep M, Henry H, Duprez T, Sindic CJM. Detection of oligoclonal free kappa chains in the absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry.* 2004 ; **75**(2) : 308-10.
47. Mehta PD, Cook SD, Coyle PK, Troiano RA, Constantinescu CS, Rostami AM. Free light chains in multiple sclerosis urine. *Mult Scler.* 1998 ; **4**(3) : 254-6.

48. Mehta PD, Cook SD, Troiano RA, Coyle PK. Increased free light chains in the urine from patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 1991 ; **41**(4) : 540-4.
49. Tibbling G, Link H, Öhman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest*. 1977 ; **37**(5) : 385-90.
50. Blennow K, Fredman P, Wallin A, Gottfries C, Skoog I, Wikkelso C, Svennerholm L. Protein analysis in cerebrospinal fluid. III: Relation to blood-cerebrospinal fluid barrier function for formulas for quantitative determination of intrathecal IgG production. *Eur Neurol*. 1993 ; **33**(2) : 134-42.
51. Thompson EJ. The cerebrospinal fluid proteins : a biochemical approach. Elsevier Publishing Company ; 1988 : 67-85
52. Blennow K, Fredman P, Wallin A, Gottfries CG, Frey H, Pirttila T, Skoog I, Wikkelso C, Svennerholm L. Formulas for the quantitation of intrathecal IgG production. Their validity in the presence of blood-brain barrier damage and their utility in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 1994 ; **121**(1) : 90-6.
53. Tourtelotte W, Booe M. Multiple sclerosis: the blood brain barrier and the measurement of de novo central nervous system IgG synthesis. Part 11. *Neurology*. 1978 ; **28**(2) : 76-83.
54. Schuller E, Sagar HJ. Local synthesis of CSF immunoglobulins. A neuroimmunological classification. *J Neurol Sci*. 1981 ; **51**(3) : 361-70.
55. Schuller EA, Benabdallah S, Sagar HJ, Reboul JA, Tompe LC. IgG synthesis within the central nervous system. Comparison of three formulas. *Arch Neurol*. 1987 ; **44**(6) : 600-4.
56. Sindic CJ, Monteyne P, Laterre EC. The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1994 ; **54**(1-2) : 75-80.

57. Felgenhauer K, Reiber H. The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin Investig.* 1992 ; **70**(1) : 28-37.
58. Petereit HF, Reske D. Expansion of antibody reactivity in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients—follow-up and clinical implications. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2005 ; **2**(1) : 3.
59. Tuengler P, Metzmann E, Pauly HE, Becker W. New immunodiagnostic systems. *Behring Inst Mitt.* 1988 ; (82) : 282-308.
60. Katzenelbogen S. The cerebrospinal fluid and its relation to the blood: a physiological and clinical study. John Hopkins Press. 1935.
61. Métais P, Agneray J, Ferard G, Fruchart JC, Jardiller JC, Revol A, Siest G, Stahl A. *Biochimie clinique Tome 1. Biochimie analytique 2ème édition.* Paris : Simep SA ; 1990.
62. Keren DF. High-resolution Electrophoresis and Immunofixation: Techniques and interpretation. Butterworth-Heinemann, Woburn, USA ; 1987.
63. Confavreux C, Gianazza E, Arnaud P, Chazot G, Daif A, Aimard G, Devic M. Silver stain of unconcentrated cerebrospinal fluid. Preliminary results in multiple sclerosis and other neurological diseases. *Rev Neurol (Paris).* 1982 ; **138**(4) : 317-25.
64. Papadopoulos NM, Costello R, Kay AD, Cutler NR, Rapoport SI. Combined immunochemical and electrophoretic determinations of proteins in paired serum and cerebrospinal fluid samples. *Clin Chem.* 1984 ; **30**(11) : 1814-6.
65. Caudie C, Allauzen O, Bancel J, Later R. Apport de la focalisation isoélectrique des immunoglobulines G du liquide céphalorachidien dans le bilan biologique précoce de la sclérose en plaques. *Ann Biol Clin (Paris).* 2000 ; **58**(2) : 187-93.

66. Christenson RH, Russell ME, Gubar KT, Silverman LM, Ebers GC. Oligoclonal banding in cerebrospinal fluid assessed by electrophoresis on agarose after centrifugal sample concentration through a microconcentrator membrane. *Clin Chem.* 1985 ; **31**(10) : 1734-6.
67. Desplat S, Pelletier J, Pouget J, Bellon F, Bernard D, Boucraut J. L'immunofixation sensibilisée: nouvelle technique d'analyse du profil oligoclonal des immunoglobulines du LCR. *Rev Neurol (Paris).* 2000 ; **156**(10) : 773-7.
68. Caudie C, Allausen O, Bancel J. Détection des bandes oligoclonales d'immunoglobulines G dans le liquide céphalorachidien par immunofixation après migration électrophorétique sur l'automate Hydrasys® Sebia. *Ann Biol Clin (Paris).* 2000 ; **58**(3) : 376-9.
69. Richard S, Miossec V, Moreau JF, Taupin JL. Detection of Oligoclonal Immunoglobulins in Cerebrospinal Fluid by an Immunofixation-Peroxidase Method. *Clin Chem.* 2002 ; **48**(1) : 167-73.
70. Laterre EC. Les protéines du liquide céphalo-rachidien à l'état normal et pathologique. Paris: Maloine/Arsacia; 1964.
71. Kjellin KG, Vesterberg O. Isoelectric focusing of CSF proteins in neurological diseases. *J Neurol Sci.* 1974 ; **23**(2) : 199-213.
72. Trbojevic-Cepe M, Poljakovic Z, Franjic J, Bielen I, Vranes Z. Detection of oligoclonal IgG bands in unconcentrated CSF in multiple sclerosis and other neurological diseases by isoelectric focusing on ultrathin-layer polyacrylamide gel immunofixation and silver staining. *Neurologija.* 1989 ; **38**(1) : 11-21.
73. Laurenzi MA, Link H. Characterisation of the mobility on isoelectric focusing of individual proteins in CSF and serum by immunofixation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1979 ; **42**(4) : 368-72.

74. Olsson T, Kostulas V, Link H. Improved detection of oligoclonal IgG in cerebrospinal fluid by isoelectric focusing in agarose, double-antibody peroxidase labeling, and avidin-biotin amplification. *Clin Chem.* 1984 ; **30**(7) : 1246-9.
75. Link H, Kostulas V. Utility of isoelectric focusing of cerebrospinal fluid and serum on agarose evaluated for neurological patients. *Clin Chem.* 1983 ; **29**(5) : 810-5.
76. Mehta P, Patrick B, Black J. Detection of oligoclonal IgG bands in unconcentrated CSF by isoelectric focusing in agarose gel and silver staining. *J Neurosci Methods.* 1986 ; **16**(4) : 277-82.
77. Notice d'utilisation Sébia HYDRAGEL 9 CSF ISOFOCUSING. Ref 4355.
78. Koch M, Heersema D, Mostert J, Teelken A, De Keyser J. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2007 ; **14**(7) : 797-800.
79. Mares J, Herzig R, Urbanek K, Sladkova V, Sklenarova J, Bekarek V, Schneiderka P, Zapletalova J, Kanovsky P. Correlation of the IgG index and oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2008 ; **152**(2) : 247-9.
80. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi LM, Gronning M. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1994 ; **57**(8) : 897-902.
81. Weichselbaum T. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Amer J Clin Path.* 1946 ; (16) : 40-8.
82. Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A, Yamanaka M, Ohsawa S, Makino K, Tokuda K. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin Chem.* 1986 ; **32**(8) : 1551-4.

83. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem.* 2002 ; **48**(3) : 436-72.
84. Burgot G, Burgot J. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales 2ème édition. Lavoisier. Paris : 2006.
85. Notice d'utilisation Sébia HYDRAGEL 6 CSF. Ref 4851.
86. Kassai B, Manière J, Nguyen K. Qu'attendre d'un "test diagnostique"? Les indices de précision des tests diagnostiques (1ère partie). 2006 ; **2**(8) : 368-71.
87. Bergeri I, Michel R, Boutin J. Pour tout savoir ou presque sur le coefficient Kappa... *Med Trop.* 2002 ; **62** : 634-6.
88. Landis J, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977 ; **33** : 159-74.
89. Tourtelotte W, Tumani H. Multiple Sclerosis cerebrospinal fluid. In : Raine CS, McFarland HF, Tourtelotte WW. Multiple Sclerosis : Clinical and pathogenic basis. Chapman & Hall Medical, London. 1997 ; pp. 57-79.
90. Fromont A, Couvreur G, Guiguet M, Giroud M, Caudie C, Moreau T. Immunofixation compared to isoelectric focusing in the detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Rev Neurol (Paris).* 2005 ; **161**(12 Pt 1) : 1183-90.
91. Franciotta D, Lolli F. Interlaboratory reproducibility of isoelectric focusing in oligoclonal band detection. *Clin Chem.* 2007 ; **53**(8) : 1557-8.
92. Zeman A, McLean B, Keir G, Luxton R, Sharief M, Thompson E. The significance of serum oligoclonal bands in neurological diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1993 ; **56**(1) : 32-5.

93. Zipoli V, Hakiki B, Portaccio E, Lolli F, Siracusa G, Giannini M, Pantoni L, Pescini F, Sorbi S, Amato M. The contribution of cerebrospinal fluid oligoclonal bands to the early diagnosis of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2009 ; **15**(4) : 472-8.
94. Tintoré M, Rovira A, Ríó J, Tur C, Pelayo R, Nos C, Téllez N, Perkal H, Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology.* 2008 ; **70**(13 Pt 2) : 1079-83.
95. Zeman AZ, Kidd D, McLean BN, Kelly MA, Francis DA, Miller DH, Kendall BE, Rudge P, Thompson EJ, McDonald WI. A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996 ; **60**(1) : 27-30.
96. Sharief MK, Thompson EJ. Immunoglobulin M in the cerebrospinal fluid: an indicator of recent immunological stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1989 ; **52**(8) : 949-53.
97. Farrell MA, Kaufmann JC, Gilbert JJ, Noseworthy JH, Armstrong HA, Ebers GC. Oligoclonal bands in multiple sclerosis: clinical-pathologic correlation. *Neurology.* 1985 ; **35**(2) : 212-8.
98. Sá MJ, Sequeira L, Rio ME, Thompson EJ. Oligoclonal IgG bands in the cerebrospinal fluid of portuguese patients with multiple sclerosis: negative results indicate benign disease. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005 ; **63**(2B) : 375-9.
99. Imrell K, Landtblom A, Hillert J, Masterman T. Multiple sclerosis with and without CSF bands: clinically indistinguishable but immunogenetically distinct. *Neurology.* 2006 ; **67**(6) : 1062-4.
100. Siritho S, Freedman MS. The prognostic significance of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2009 ; **279**(1-2) : 21-5.
101. Hahn JS, Pohl D, Rensel M, Rao S. Differential diagnosis and evaluation in pediatric multiple sclerosis. *Neurology.* 2007 ; **68**(16 Suppl 2) : S13-22.

102. Ness JM, Chabas D, Sadovnick AD, Pohl D, Banwell B, Weinstock-Guttman B. Clinical features of children and adolescents with multiple sclerosis. *Neurology*. 2007 ; **68**(16 Suppl 2) : S37-45.
103. Dale RC, de Sousa C, Chong WK, Cox TC, Harding B, Neville BG. Acute disseminated encephalomyelitis, multiphasic disseminated encephalomyelitis and multiple sclerosis in children. *Brain*. 2000 Déc ; 123 Pt 12 : 2407-22.
104. Atzori M, Battistella P, Perini P, Calabrese M, Fontanin M, Laverda A, Suppiej A, Drigo P, Grossi P, Rinaldi L, Gallo P. Clinical and diagnostic aspects of multiple sclerosis and acute monophasic encephalomyelitis in pediatric patients : a single centre prospective study. *Mult Scler*. 2009 ; **15**(3) : 363-70.
105. Hahn CD, Shroff MM, Blaser SI, Banwell BL. MRI criteria for multiple sclerosis: Evaluation in a pediatric cohort. *Neurology*. 2004 ; **62**(5) : 806-8.
106. Krupp LB, Banwell B, Tenenbaum S. Consensus definitions proposed for pediatric multiple sclerosis and related disorders. *Neurology*. 2007 ; **68**(16 Suppl 2) : S7-12.
107. Pohl D, Rostasy K, Reiber H, Hanefeld F. CSF characteristics in early-onset multiple sclerosis. *Neurology*. 2004 ; **63**(10) : 1966-7.

Nom – Prénoms : Chevalier Julie, Anne, Marie

Titre du mémoire-thèse : Place de l'isoélectrofocalisation des immunoglobulines G du liquide céphalo-rachidien et du logiciel Protis® pour le diagnostic de la sclérose en plaque.

Résumé du mémoire-thèse :

D'après la conférence de consensus de 2005, le diagnostic biologique de la sclérose en plaque (SEP) repose sur la mise en évidence d'un profil oligoclonal des immunoglobulines G (IgG) dans le LCR, non retrouvé dans le sérum, par une technique d'isoélectrofocalisation (IEF). Cette méthode est commercialisée depuis 2003 par la société Sébia® sous forme de kit prêt à l'emploi et elle a été mise en place en avril 2008 au laboratoire de biochimie du CHU de Pontchaillou pour remplacer l'ancienne technique d'immunofixation (IFIX) de Sébia®.

Dans ce travail, l'IEF a été réalisée sur 445 couples LCR/sérum dont 62 ont bénéficié en plus d'une IFIX pour permettre une étude comparative rétrospective des deux techniques électrophorétiques. Tous les résultats de dosages (Albumine et IgG dans le LCR et dans le sérum) ont été analysés à l'aide du logiciel d'aide au diagnostic Protis® qui permet de fournir rapidement au clinicien des informations sur l'existence ou non d'une synthèse intrathécale d'IgG par le calcul des index (Link et Tourtelotte) et par le diagramme de Reiber.

Selon cette étude, pour le diagnostic de SEP, la technique d'IEF possède une sensibilité et une spécificité de 94.1% et de 69.6% et, la technique d'IFIX, une sensibilité et une spécificité de 94.1% et de 78.8%. La technique de référence possède une plus faible spécificité car une synthèse intrathécale d'IgG peut être retrouvée dans de nombreuses pathologies neurologiques inflammatoires autres que la SEP. En effet, dans ce travail, une synthèse intrathécale d'IgG est détectée dans 46.8% des cas par IEF et dans 40.3% par IFIX. Ainsi, l'IEF est la technique la plus performante pour la détection d'une synthèse intrathécale d'IgG.

MOTS CLÉS : SCLÉROSE EN PLAQUE (SEP), LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN (LCR), ISOÉLECTROFOCALISATION, IMMUNOGLOBULINES, SYNTHÈSE INTRATHÉCALE, INDEX DE LINK.

Adresse de l'auteur : 9 rue de la cochardière, 35132 VEZIN-LE-COQUET