

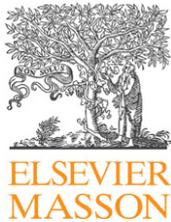


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

 www.em-consulte.com



STRATÉGIE D'EXPLORATION FONCTIONNELLE ET DE SUIVI THÉRAPEUTIQUE

Interprétation de l'index IgG et du diagramme de Reiber par Protis 2 dans les maladies inflammatoires du système nerveux central

IgG index and Reiber diagram interpretation with Protis 2 in inflammatory diseases of central nervous system

N. Gillain^{a,*}, A. Fumal^b, C. Nève^a,
 J.-M. Minon^a, A. Maertens de Noordhout^b

^a Laboratoire de biologie clinique, CHR de la Citadelle, 1, boulevard du 12^e de Ligne, 4000 Liège, Belgique

^b Service universitaire de neurologie, CHR de la Citadelle, 1, boulevard du 12^e de Ligne, 4000 Liège, Belgique

Reçu le 11 mars 2009 ; accepté le 27 mars 2009

Disponible sur Internet le 28 mai 2009

KEYWORDS

IgG index;
 Reiber diagram;
 Protis 2;
 Oligoclonal bands;
 Multiple sclerosis

Summary Intrathecal humoral immune response is a common feature of many inflammatory diseases of the central nervous system. IgG intrathecal synthesis demonstration is a cornerstone for the early diagnosis of multiple sclerosis. Immunoglobulin (Ig) synthesis is correlated with CSF-specific oligoclonal bands detection after isoelectric focusing. It may also be performed in calculating Ig index ($Ig\ LCR / Ig\ blood \times albumin\ LCR / albumin\ blood$) and comparing it to a limit defined thanks to the studies of Professor Reiber. Quantitative technics have the advantage to be quickly realised but isoelectric focusing is the gold standard. Formula and Reibergram allow to quantify the IgG, IgA and IGM synthesised in central nervous system and to follow their evolution. Softwares put IgG index on the graph and generate data interpretation for the clinical chemist. Fiability of the comments is variable according to the used software and the position of the index on the graph. We compare IgG intrathecal synthesis detection with the new program of Siemens, Protis 2, and the oligoclonal bands detection with isoelectric focusing on 330 samples. Protis 2 has a great specificity (98%) and a low sensitivity (50%). His positive likelihood ratio is 25 and his negative likelihood ratio, 0.5. It is only reliable when it predicts an intrathecal immune response. It may never be used like a screening test or for exclude an IgG intrathécale synthesis. The usefulness of the software for the follow up of IgG, IgA and IGM in infectious disease of central nervous system is only evocated in this study.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : nicole.gillain@chrcitadelle.be (N. Gillain).

MOTS CLÉS

Index IgG ;
Diagramme de
Reiber ;
Protis 2 ;
Bandes
oligoclonales ;
Sclérose en plaques

Résumé De nombreuses maladies inflammatoires ou infectieuses du système nerveux central sont responsables d'une synthèse intrathécale d'immunoglobulines (Ig). La démonstration d'une synthèse intrathécale d'IgG est un élément important dans le diagnostic précoce de la sclérose en plaques. Ces synthèses sont prouvées par l'existence de bandes oligoclonales spécifiques au LCR obtenues après isoélectrofocalisation ou par un index d'Ig (Ig LCR/Ig sérum \times albumine sérum/albumine LCR) supérieur à une limite que les travaux du Professeur Reiber ont permis de préciser. Les techniques quantitatives présentent l'avantage de leur rapidité d'exécution, mais l'isoélectrofocalisation est la méthode de référence. Les formules et le diagramme de Reiber permettent de quantifier les IgG, les IgA et les IgM synthétisées localement et de suivre leur évolution. Des programmes positionnent les index sur le diagramme et fournissent une aide au diagnostic en générant un commentaire interprétatif. La fiabilité de ces commentaires est variable suivant le programme et la position de l'index. Nous avons confronté la détection d'une synthèse intrathécale d'IgG par Protis 2, la nouvelle version de Protis (Siemens), à la présence de bandes oligoclonales sur 330 échantillons. Protis 2 présente un haut degré de spécificité (98%) qui lui confère un rapport de vraisemblance positif de 25, mais une faible sensibilité (50%) et un rapport de vraisemblance négatif de 0,5. Il n'est fiable que lorsqu'il prédit une synthèse intrathécale. Il ne peut en aucun cas être utilisé ni comme test de dépistage ni pour exclure une synthèse intrathécale d'IgG. L'intérêt de Protis 2 dans le suivi des maladies infectieuses du système central sur base des IgG, des IgA et des IgM n'a été qu'évoqué dans cette étude.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

La mise en évidence d'une synthèse intrathécale (SI) d'IgG est un élément essentiel au diagnostic de la sclérose en plaques (SEP) et des maladies inflammatoires du système nerveux central (SNC) [1]. Pour atteindre ce but, le biologiste dispose de techniques qualitatives basées sur la mise en évidence de bandes oligoclonales IgG spécifiques au LCR et de techniques quantitatives, le dosage des IgG et de l'albumine dans le LCR et le sérum et des formules mathématiques [1,2]. Dans les années 1980, les techniques d'isoélectrofocalisation [3] se sont révélées les plus fiables [4] notamment dans la SEP [5]. Elles n'étaient réalisables que par un très petit nombre de laboratoires. La recherche de la formule idéale a donc été poursuivie par de nombreux spécialistes: Tibbling et al. [6], Tourtellote et Ma [7], Schuller et Sagar [8]. Les formules de Reiber et Felgenhauer [9] se sont révélées relativement efficaces [4]. Elles ont été à la base de nouveaux concepts sur le fonctionnement de la barrière sang-LCR (barrière

[10,11]. Reiber a élaboré un diagramme permettant de visualiser les données des patients et d'interpréter rapidement les dosages [12]. Certaines firmes ont commercialisé des logiciels capables d'effectuer les différents calculs permettant de positionner les données sur le diagramme, de déterminer le pourcentage d'IgG synthétisées dans le SNC, d'interpréter les résultats en fonction de l'âge et de générer un commentaire [13,14]. Les résultats des dosages peuvent être introduits manuellement dans un PC indépendant ou traités directement par un ordinateur connecté au néphélomètre.

Nous avons constaté des discordances entre les interprétations générées par deux programmes de la firme Siemens (Dade-Behring), SEPP et Protis [15]. Cette firme vient de commercialiser une nouvelle version de Protis (Protis 2), dont nous avons testé les performances en prenant comme

référence le résultat de la recherche des BO par isoélectrofocalisation.

Avant de présenter nos résultats, il nous a semblé intéressant de rappeler brièvement les différents concepts à la base du diagramme de Reiber et l'importance de la mise en évidence d'une SI dans le diagnostic de la SEP.

Les différents concepts à la base du diagramme de Reiber

Le LCR est produit essentiellement au niveau des plexus choroïdes des ventricules cérébraux. Les vaisseaux sanguins intracérébraux et le parenchyme cérébral sont des sources beaucoup moins contributives à sa formation [2]. Le LCR passe des ventricules dans les citernes et les espaces sous arachnoïdiens péricérébraux et périmédullaires. Il se déverse finalement dans le système veineux à travers les villosités arachnoïdiennes, appelées granulations de Pacchioni, situées au niveau du sinus supérieur et au niveau de la moelle.

La production de LCR varie avec l'âge: elle est de l'ordre de 500 ml/j chez le jeune adulte (0,4 ml/min) et chute à 250 ml/j chez le patient âgé (0,19 ml/min) [16]. Selon Reiber, le LCR se déplace sous l'influence d'une force qui résulte du gradient de pression artérioveineux [14,16]. Ce gradient de pression et donc le flux du LCR varie naturellement avec l'âge. Il est perturbé lors de pathologies qui entraînent une résistance au flux de LCR [16]. Le flux de LCR peut être diminué suite à une diminution de sa production, une baisse du flux dans l'espace sous-arachnoïdien ou un obstacle à l'écoulement dans les villosités arachnoïdiennes [14].

En l'absence de pathologies susceptibles d'altérer le flux du LCR, la concentration en protéines du LCR est approximativement 200 fois plus faible que celle du plasma. La composition en protéines du LCR se modifie en permanence lors de son trajet au niveau cérébral et périmédullaire [16].

Elle résulte à la fois d'une sécrétion active par l'épithélium des plexus choroïdes et d'une filtration des protéines plasmatiques à travers les cellules endothéliales des capillaires des plexus choroïdes. Des protéines d'origine cérébrale diffusent également du SNC vers le LCR. Ce dernier s'enrichit donc constamment en protéines. La majorité des protéines du LCR comme l'albumine et les immunoglobulines sont donc transsudées à partir du sang et d'autres comme la bêta-trace, la bêta-2-transferrine, la cystatine C et la protéine S100 sont synthétisées dans le SNC [17]. Lors d'un ralentissement du flux de LCR, phénomène courant dans les maladies neurologiques, la concentration des protéines d'origine plasmatique augmente dans le LCR [16]. Les différences observées au niveau des concentrations du LCR en albumine et en immunoglobulines s'expliquent par la différence entre leur poids moléculaire et leur taille qui modifient leur coefficient de diffusion [10]. Cette théorie remplace l'ancienne conception selon laquelle cette augmentation de protéines serait due à l'apparition de « brèches » dans la « barrière hémato-encéphalique » [16]. Ce dernier terme est en fait incorrect puisqu'il fait référence à l'ensemble des mécanismes qui permettent de maintenir l'équilibre entre le sang et le milieu extracellulaire cérébral. Il est plus correct lors d'une altération du flux du LCR de parler « d'altération de la barrière sang/LCR ».

La concentration d'une protéine d'origine plasmatique dans le LCR dépend donc de sa concentration dans le plasma, de sa taille qui va influencer sa diffusion dans le LCR, du niveau auquel on réalise la ponction (lombaire, ventriculaire) et du débit du LCR dans l'espace sous arachnoïdien [10,16,17].

Cette théorie, Reiber l'a établie sur base de données expérimentales en étudiant la relation entre QIgG (IgG LCR/IgG sérique) et QAlbu (albumine LCR/albumine sérique). En 1977, Tibbling et al. [6] avait proposé l'utilisation de l'index IgG. Il s'agit du rapport entre QIgG (IgG LCR/ IgG sérique) et QAlbu (albumine LCR/albumine sérique) [6]. QIgG est une estimation de la concentration des IgG dans le LCR en fonction de leur concentration dans le sérum. QAlbu est un marqueur de l'intégrité de la barrière. Cette protéine étant synthétisée exclusivement au niveau hépatique, une augmentation de sa concentration dans le LCR ne pourra qu'être d'origine sanguine, donc provoquée par une altération de la barrière. QIgG augmente proportionnellement à QAlbu et, théoriquement, le rapport entre les deux quotients reste constant quel que soit le niveau d'altération de la barrière. Normalement, l'index IgG, le rapport entre QIgG et QAlbu, est de l'ordre de 0,4–0,6. Un index IgG supérieur à 0,7 démontre que l'augmentation des IgG dans le LCR n'est pas uniquement provoquée par une simple altération de la barrière, qu'il y a une autre origine à l'augmentation des IgG et que celle-ci ne peut résulter que d'une synthèse intrathécale de ces immunoglobulines.

Malheureusement, un index IgG supérieur à 0,7 peut être observé en dehors de toute SI lorsque la barrière est fortement altérée. En observant la relation entre QIgG et QAlbu chez des patients présentant des altérations diverses de la barrière, mais chez qui aucune SI n'avait pu être démontrée, Reiber a constaté que la relation entre les deux quotients n'était pas linéaire mais hyperbolique (Fig. 1) [9]. La limite à partir de laquelle une augmentation de l'index IgG démontre l'existence d'une synthèse intrathécale augmente

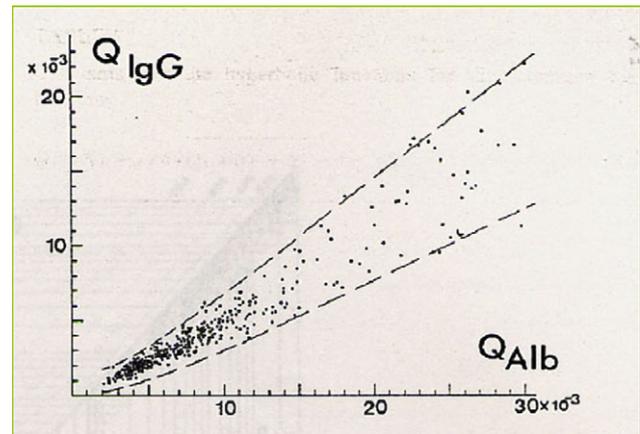


Figure 1 Évolution du QIgG de 361 patients en fonction du QAlbu au cours de pathologies entraînant des altérations diverses de la barrière sang/LCR, mais pas de synthèse intrathécale [9].

avec QAlbu. Elle est 0,64 pour un QAlbu normal de l'ordre de 0,005, 0,74 pour un QAlbu élevé de 0,05 et 0,79 pour un QAlbu très élevé de 0,1. La même relation hyperbolique est observée entre QIgA et QAlbu et QIgM et QAlbu, mais l'allure des courbes est différente en raison du coefficient de diffusion variable des protéines (Fig. 2). La valeur des coefficients des pentes a, b et c (Fig. 3) sont donc propres

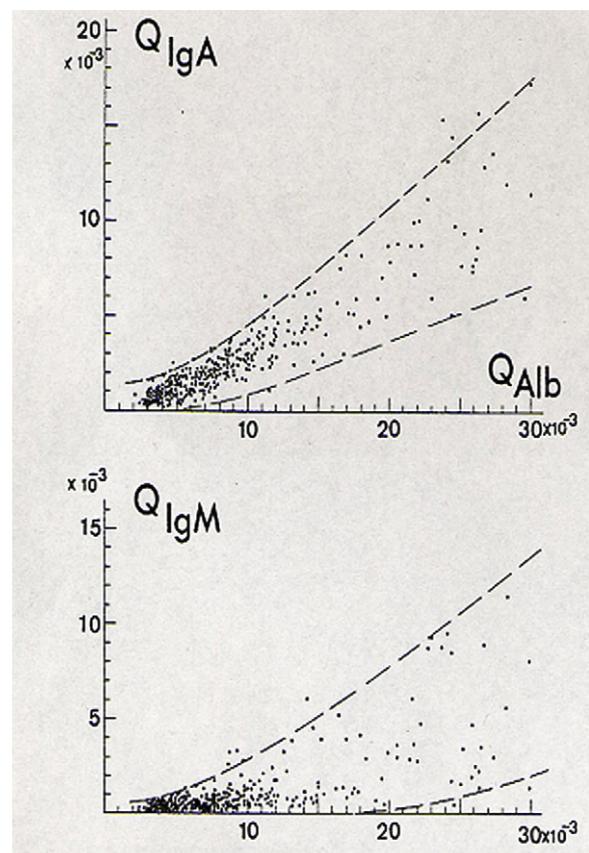


Figure 2 Évolution du QIgA et du QIgM des patients de la fig 1 en fonction du QAlbu [9].

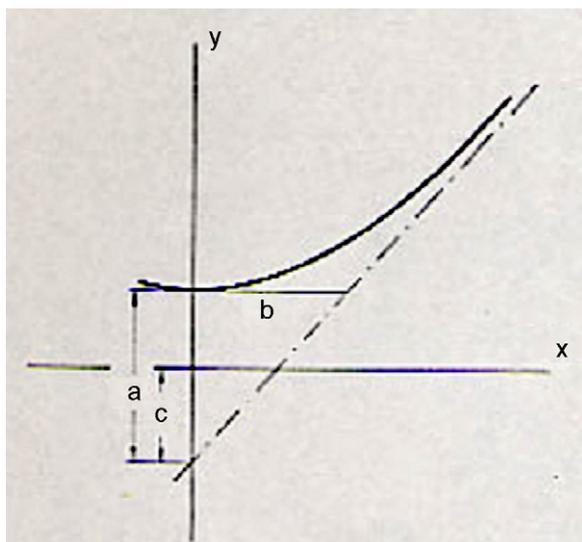


Figure 3 Définition des coefficients de pente des courbes hyperboliques a, b et c. Ils varient en fonction du type d'immunoglobuline [9].

à chaque protéine. Leur détermination a permis à Reiber d'élaborer une formule permettant de calculer la limite du Q d'une immunoglobuline donnée, $Q(IgX)$, en fonction du Qalbu [9] :

$$Q(IgX) = \frac{a}{b} \sqrt{Q(Alb)^2 + b^2} - c$$

et une formule permettant de calculer la quantité d'immunoglobuline synthétisée localement, $IgX(loc)$ soit [9] :

$$IgX(loc) = \left[Q(IgX) - \frac{a}{b} \sqrt{Q(Alb)^2 + b^2} + c \right] \cdot IgX(Ser)$$

ou $IgX(loc) = (QIgX - Qlim IgX) \cdot IgX(ser)$ où $IgX(ser)$ est la concentration sérique de cette immunoglobuline.

Reiber a défini les valeurs de a, b et c pour les trois immunoglobulines sur base de milliers d'observations [12–14] ce qui permet de calculer les $Qlim$ des IgG, des IgA et des IgM soit :

$$Q_{lim}(IgG) = 0,93 \sqrt{(Q_{Alb})^2 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^3$$

$$Q_{lim}(IgA) = 0,77 \sqrt{(Q_{Alb})^2 23 \times 10^{-6}} - 3,1 \times 10^3$$

$$Q_{lim}(IgM) = 0,67 \sqrt{(Q_{Alb})^2 120 \times 10^{-6}} - 7,1 \times 10^3$$

Rappelons l'importante influence de l'âge sur le flux de LCR et donc sur la barrière sang/LCR. À la naissance, le flux de LCR est très faible en raison de l'immaturation des villosités arachnoïdiennes, mais il augmente au cours des premiers mois de la vie et atteint une valeur maximale aux environs de l'âge d'un an. Il se stabilise ensuite. À partir de cinq ans, il commence à diminuer et cette diminution est constante tout au long de la vie. En conséquence, à la naissance, le Qalbu est très élevé et diminue rapidement au cours des quatre

premiers mois de vie. Il atteint alors une valeur minimale et se stabilise entre un et cinq ans. [16] À partir de cinq ans, le Qalbu augmente lentement avec l'âge suivant la relation : $Qalb = (4 + \text{âge}/15) \times 0,001$ [14].

En raison de l'importante répercussion de l'âge sur le fonctionnement de la barrière, les différents coefficients devront être interprétés en fonction de l'âge du patient.

Le diagramme de Reiber

Afin de faciliter l'interprétation des résultats des dosages, Reiber a créé un diagramme [12] dont l'abscisse en échelle logarithmique correspond à différentes valeurs de Qalbu et l'ordonnée, également logarithmique, aux valeurs des QIgG correspondants. Le diagramme est partagé en cinq zones (Fig. 4). L'index IgG du patient se positionne sur une de ces zones permettant une interprétation facile des dosages.

Le diagramme comporte en son centre la $Qlim$ qui est la valeur optimale des QIgG pour laquelle on peut affirmer, en fonction du Qalbu, qu'il n'y a pas de SI. Cette limite a été déterminée à partir des données de 4300 patients [13]. Elle est basée sur la valeur moyenne des valeurs observées majorée de trois écart-types. Tout index IgG dans la zone au dessus de la $Qlim$ correspond à une SI. Parallèlement et à gauche de cette $Qlim$, Reiber trace une droite qui correspond aux valeurs minimales de QIgG pour un Qalbu donné. Elle correspond à la valeur moyenne des valeurs observées dont on a retranché trois écart-types. Tout index IgG situé entre ces deux droites correspond à une absence de SI. En dessous de cette limite inférieure, se situe une zone de valeurs physiologiquement impossible : tout index IgG qui se situerait en dessous de cette limite inférieure est un index erroné suite à une erreur grossière de dosage, d'unités ou d'identification de l'échantillon.

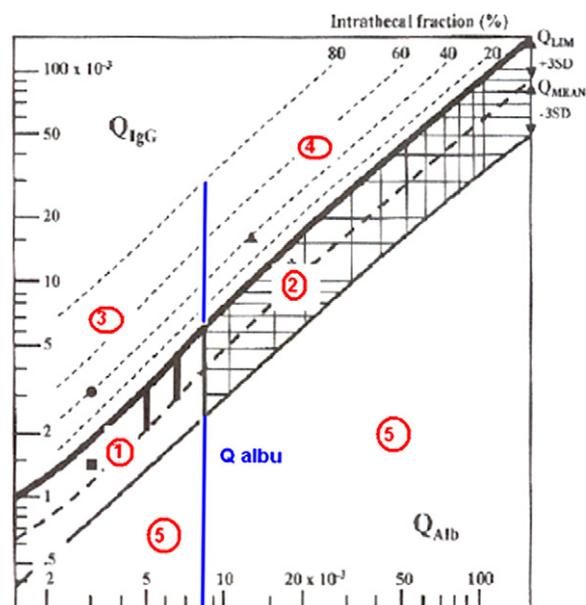


Figure 4 Les différentes zones du diagramme de Reiber : 1 : zone des valeurs normales ; 2 : altération de la barrière sans synthèse intrathécale ; 3 : synthèse intrathécale sans altération de la barrière ; 4 : synthèse intrathécale et altération de la barrière ; 5 : zone des résultats physiologiquement.

Un autre critère doit encore être pris en considération pour l'interprétation des données, c'est l'existence d'une éventuelle altération de la barrière. Elle sera estimée sur base de la valeur du Qalbu par rapport au Qalbu limite pour l'âge du patient. Sur l'abscisse du diagramme, il y a trois traits qui correspondent à trois tranches d'âge différentes.

Lorsque l'index IgG est situé dans la zone située à gauche du Qalbu limite correspondant à l'âge, il n'y a pas d'altération de la barrière, s'il est situé à droite, il y a ralentissement du flux du LCR. Ce nouveau critère permet de classer les index IgG comme :

- normaux (pas de synthèse, pas d'altération de la barrière) ;
- correspondant à une synthèse sans altération de la barrière ;
- correspondant à une simple altération de la barrière sans synthèse ;
- correspondant à une altération de la barrière avec SI.

On comprend l'intérêt de programmes conçus pour positionner l'index sur le diagramme, effectuer les calculs, interpréter les index en fonction de l'âge et finalement générer un commentaire interprétatif.

Intérêt de la détection d'une synthèse intrathécale d'immunoglobulines au cours des maladies inflammatoires et infectieuses du système nerveux central

Dans le cadre de la SEP, seule une synthèse intrathécale d'IgG présente un intérêt diagnostique. La mise en évidence de BO spécifiques au LCR est le test le plus sensible [1,4]. La présence de BO de type IgG spécifiques au LCR est également observée dans de nombreuses maladies inflammatoires systémiques avec répercussions neurologiques (neurolupus, sarcoïdose, maladie de Behçet, syndrome paranéoplasique avec atteinte du SNC) et des pathologies tumorales du SNC (lymphome de SNC, méningite carcinomateuse) [1].

Au cours des maladies infectieuses du SNC, d'origine virale, bactérienne, fongique ou parasitaire, des IgG, des IgA et des IgM peuvent être synthétisées dans le SNC [1,2,13,14]. Au niveau du LCR, la réponse immunitaire s'exprime différemment qu'au niveau sérique : on n'observe pas de classique conversion des IgM en IgG : dès le début de la maladie, une ou plusieurs classes d'immunoglobulines peuvent être présentes dans le LCR. Elles évoluent dans le temps et sous l'influence du traitement. Leur présence peut parfois révéler une infection datant de plusieurs années (neurosyphilis, encéphalite herpétique) [2,14]. Au cours de la phase aiguë de la maladie, le diagnostic des maladies infectieuses est établi grâce aux techniques de bactériologie ou de biologie moléculaire. Après la phase aiguë, lorsque PCR et culture sont négatives, le suivi de la maladie et l'efficacité du traitement peuvent être assurés par l'évolution des index d'immunoglobulines selon Reiber et al. [13]. Un exemple d'évolution des index des IgG, IgA et IgM au cours d'une neuroborréliose chez un patient de notre hôpital est représenté à la Fig. 5.

Rappelons que la barrière est parfois fortement altérée dans les maladies infectieuses et les Qalbu très élevés. Les index doivent alors être interprétés exclusivement à l'aide des diagrammes de Reiber ou au moins à l'aide de ses formules.

Pour préciser la nature de l'agent infectieux, Reiber a appliqué ses formules aux dosages d'anticorps spécifiques d'agent infectieux dans le LCR et le sérum. Il a défini l'index d'anticorps spécifique appelé AI [12–14]. Cet index est basé sur le dosage d'anticorps spécifiques dans le LCR et le sérum. Pour déterminer AI, on calcule d'abord le Qspec, le rapport entre les concentrations d'anticorps spécifiques du LCR et les anticorps spécifiques du sérum. On calcule ensuite l'AI qui est soit le rapport Qspec/QIgG lorsque QIgG est inférieur à Qlim IgG, soit le rapport Qspec/Qlim IgG lorsque QIgG est supérieur à Qlim IgG. Normalement, AI est compris entre 0,7–1,3. Lorsqu'il est supérieur à 1,4, on considère qu'il y a une synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques de l'agent suspecté. Les programmes informatiques calculent également tous ces AI. Il faut néanmoins signaler que les dosages en parallèle des IgG spécifiques dans le LCR et le sérum présentent un certain nombre de difficultés en raison des concentrations très faibles des anticorps dans le LCR et des erreurs susceptibles d'intervenir lors de la dilution des sérums [18].

La recherche des bandes oligoclonales IgG

Normalement, les IgG présentes dans le LCR sont polyclonales. Lorsque le sang du patient contient une ou plusieurs IgG monoclonales, ces composés monoclonaux diffusent dans le LCR et la bande monoclonale observée dans le LCR est alors sans lien avec une éventuelle synthèse intrathécale. Il en est de même pour les patients chez qui on observe un tracé oligoclonal dans le sérum : les bandes oligoclonales diffusent dans le LCR et ont le même aspect que les bandes du sérum : on dit qu'elles sont en miroir [19].

En revanche, dans certaines maladies inflammatoires du SNC, principalement la SEP, des clones lymphocytaires B synthétisent des immunoglobulines dans le SNC lui-même. Grâce aux techniques de biologie moléculaire, on a pu démontrer l'existence de ces différents clones qui prolifèrent dans le tissu nerveux et qui sont en constante mutation [20,21]. Ces clones sont responsables de l'aspect oligoclonal du LCR. Cet aspect démontre l'existence d'une synthèse intrathécale à condition que ces bandes oligoclonales ne soient pas présentes dans le sérum puisque les lymphocytes producteurs ne sont pas périphériques.

La mise en évidence de ces bandes oligoclonales doit répondre à des critères analytiques bien définis : séparation des immunoglobulines par électrofocalisation, mise en évidence des IgG par des techniques immunoenzymatiques, traitement en parallèle du LCR et du sérum, protéines du LCR et du sérum amenées à la même concentration... [19,22]. Des trousseaux répondant à ces critères (kit IgG-IEF d'Hélène Biosciences et Hydragel 9 CSF Isofocusing de Sebia) ont été commercialisés [15].

L'interprétation des tracés est également bien codifiée [1,2,19,22]. La présence de BO est affirmée sur base de la présence de BO dans le LCR et l'absence dans le sérum correspondant ou sur la présence d'un nombre plus élevé de BO

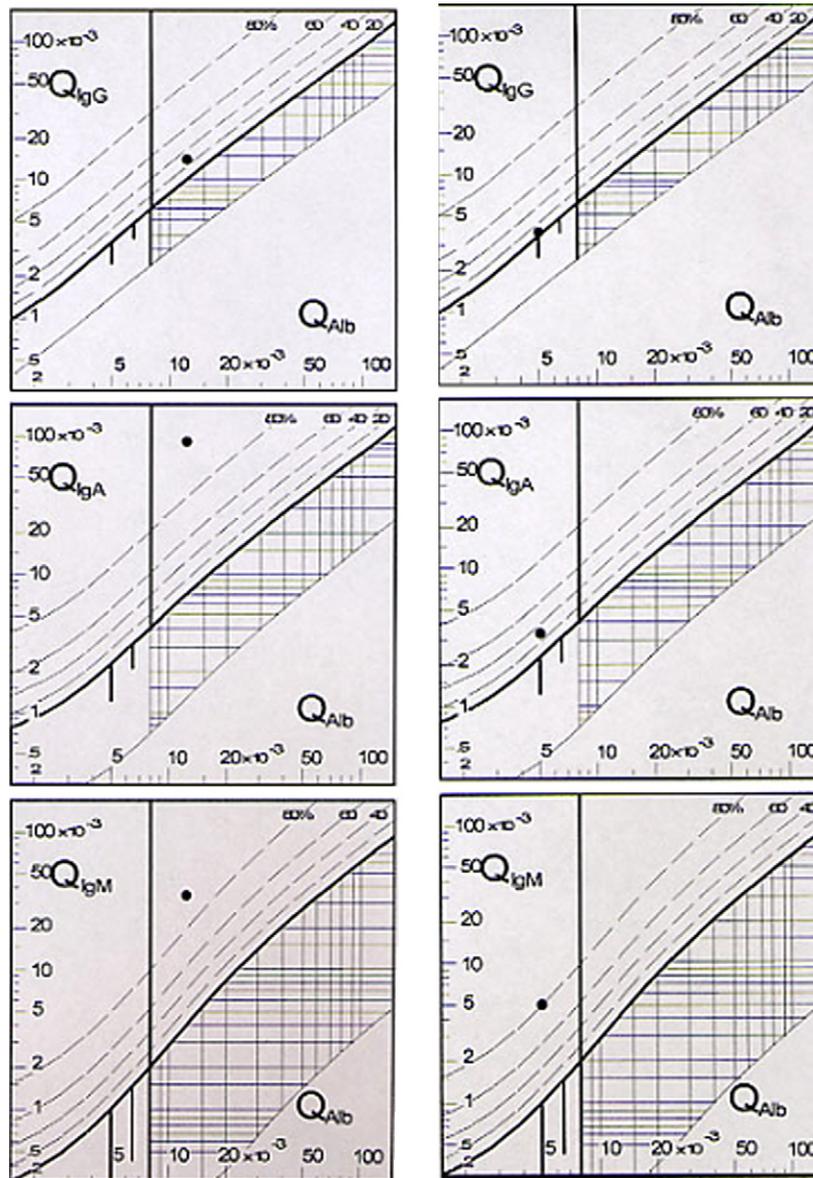


Figure 5 Évolution des index IgG, IgA et IgM au cours de la neuroborréliose. Août 2008, Al : 9,3 (à gauche) ; octobre 2008, Al : 6.5 (à droite).

dans le LCR que dans le sérum. L'absence de BO est affirmée sur l'absence de BO dans le LCR, sur un nombre équivalent de BO dans le LCR et le sérum (bandes en miroir), un cas particulier étant la présence d'un composé monoclonal qui donne une image assez caractéristique (Fig. 6). Un composé monoclonal se présente sous la forme d'au moins quatre bandes oligoclonales plus épaisses que les BO habituelles et très proches les unes des autres. Cet aspect s'explique vraisemblablement par des modifications post-traductionnelles de la structure glycosylée de ce composé monoclonal [21].

La présence d'une seule BO spécifique au LCR est considérée comme négative. Néanmoins, les patients qui présentent cette anomalie doivent faire l'objet d'une surveillance particulière. En effet, chez certains de ces patients, on observera plusieurs BO lors d'une ponction ultérieure et généralement le diagnostic de SEP ou d'une autre maladie démyélinisante sera établi. Un tel diagnostic ne sera jamais

établi chez les patients pour lesquels cette bande unique disparaît ou persiste seule. En revanche, une bande oligoclonale isolée peut être associée aux lymphomes cérébraux [23,24].

La sclérose en plaque (SEP) et son traitement

La SEP est une maladie qui évolue en général par poussées caractérisées par l'apparition de signes neurologiques divers provoqués par une altération de la gaine de myéline qui entoure l'axone des cellules nerveuses présentes essentiellement dans la substance blanche. Ces signes cliniques disparaissent puis réapparaissent après un intervalle de temps dont la durée est imprévisible. Au cours des premiers stades de la maladie, la récupération est parfois totale entre deux poussées vraisemblablement en raison

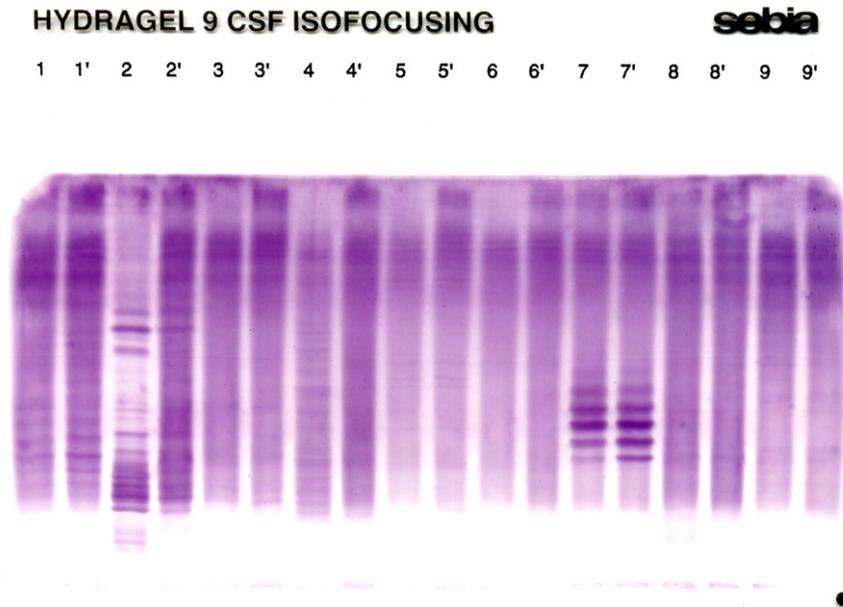


Figure 6 Un gel d'électrofocalisation (le LCR est en première position) ; 1/1' : négative, bandes en miroir ; 2/2' : positive, plus de bandes dans le LCR que dans le sérum ; 4/4' : positive, bandes uniquement dans le LCR ; 6/6' : négative ; 7/7' : composé monoclonal.

d'une reconstitution de la gaine de myéline. Au cours de l'évolution de la maladie, les poussées vont peu à peu laisser des séquelles irréversibles. Chez certains patients, la maladie est d'emblée rapidement évolutive [25,26].

Lors de ses premières manifestations, le diagnostic de la maladie est difficile car les signes cliniques sont aspécifiques et ressemblent aux manifestations neurologiques de maladies systémiques ayant des répercussions neurologiques comme le lupus.

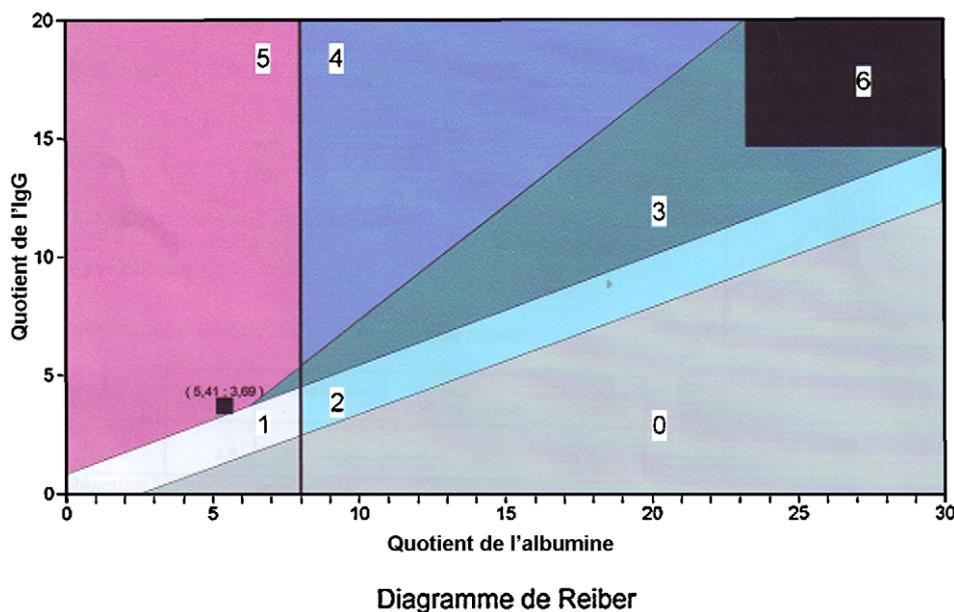
La maladie est toujours incurable, mais, ces dernières années, de nombreux traitements sont proposés pour ralentir son évolution. La SEP est une maladie inflammatoire et doit être traitée dès son diagnostic par de fortes doses de corticoïdes (Solumédrol) [25]. Le traitement de fond est appliqué ultérieurement. Dans la majorité des cas, on administre des immunomodulateurs dans le but de diminuer le nombre et l'intensité des poussées. L'interféron-bêta qui réduit la prolifération des cellules T et la production de $TNF\alpha$ s'est révélé efficace [25]. Nombreuses sont les molécules testées : des mélanges de polypeptides synthétiques ayant une analogie avec certaines protéines de la myéline servant de « leurre » à l'activité des cellules immunes responsables de la maladie (acétate de glatiramère) [25], des anticorps monoclonaux comme le Natalizumab (anticorps anti-intégrines qui réduisent la pénétration des leucocytes dans le SNC) [27], le Rituximab (anticorps anti-lymphocytes B CD20+) [28], l'Alemtuzumab (anti-CD52 des lymphocytes B et monocytes) [29]... Ces traitements sont coûteux et peuvent présenter des effets secondaires plus ou moins graves. Un traitement agressif d'emblée pourrait ralentir l'évolution de la maladie et leur efficacité serait d'autant plus grande qu'ils sont administrés rapidement, idéalement lors de la première manifestation clinique [30].

Le clinicien se voit donc confronté à la nécessité d'établir un diagnostic en « urgence » en se basant sur les critères de Mac Donald de 2001, modifiés en 2005 [31]. Ces critères sont basés sur les signes cliniques, la résonance magnétique nucléaire, la mesure des potentiels évoqués et l'existence d'un « LCR positif : bandes oligoclonales ou index IgG élevé ». D'après ces critères, l'analyse du LCR n'est plus indispensable et la recherche des BO et l'augmentation de l'index IgG sont considérés comme fournissant une information équivalente au clinicien. Cette modification a provoqué une vive réaction de la part d'un consortium de neurologues. Ils ont publié des critères d'interprétation de l'analyse du LCR dans le cadre de la SEP et rappelé les critères analytiques de la recherche des bandes oligoclonales [22].

L'analyse du LCR dans la SEP

Le LCR présente peu d'anomalies dans la SEP [19,22]. La leucocytose est presque toujours inférieure à 50 par millimètre cube, la protéinorachie normale ou très légèrement augmentée, la glycorachie et le lactate normaux. En revanche, la présence de bandes oligoclonales de type IgG est observée chez plus de 95 % des patients [1]. Ces bandes oligoclonales spécifiques restent présentes dans le LCR dans le décours de la maladie [32].

Chez les 5% de patients sans BO, on peut observer des bandes de type IgA, IgM ou kappa ou lambda [1,33]. La signification de ces bandes n'est pas établie. En revanche, chez un patient qui présente des bandes IgG, la mise en évidence de bandes de type IgM serait de mauvais pronostic et orienterait vers une SEP rapidement évolutive [34,35]. Des études ne confirment pas ces observations [36].



Synthèse intrathécale d'IgG sans altération de la barrière.

Figure 7 Les différentes zones du diagramme de Fateh Moghadam : 1 : normal ; 2 : altération de la barrière ; 3 : altération de la barrière, synthèse intrathécale possible ; 4 : grosse altération de la barrière avec synthèse intrathécale ; 5 : synthèse intrathécale sans altération de la barrière ; 6 : pas d'interprétation possible en raison de l'importante altération de la barrière ; 0 : résultat impossible.

Le LCR d'un patient atteint de SEP contient des IgG dirigées contre des constituants de la gaine de myéline comme la myélin oligodendrocyte glycoprotéine (MOG) et la myélin basic protein (MBP) qui sont synthétisées dans le SNC [37]. Ces anticorps persistent au cours des années.

L'agent causal de la maladie n'est pas encore connu. En revanche, le LCR des patients contient des anticorps spécifiques vis-à-vis d'un grand nombre de virus. Les plus fréquemment détectés sont dirigés contre la rougeole, la rubéole et la varicelle. Ces anticorps persistent dans le LCR tout comme les BO. Des index antirougeole très élevés seraient associés à des formes plus rapidement progressives de la maladie [38].

Les techniques quantitatives et le diagramme de Reiber : la technique « d'urgence »

Bien que réalisée dans notre laboratoire, la recherche des BO génère toujours un délai d'attente assez long. En effet, l'isoélectrofocalisation des immunoglobulines et leur mise en évidence par des immuns-sérums marqués à la peroxydase comportent des manipulations qui durent plusieurs heures. Ces analyses très coûteuses sont généralement effectuées par série de huit (8 couples LCR/sérum + un contrôle positif + un contrôle négatif par gel). En revanche, la réalisation des dosages par néphélométrie et l'édition du diagramme à l'aide de soft peuvent être réalisés dans un délai de maximum 24 heures. Disposant d'informations sur le fonctionnement de la barrière et sur l'existence d'une

éventuelle synthèse intrathécale d'immunoglobulines, le clinicien peut planifier de manière plus efficace les examens complémentaires (résonance magnétique, potentiels évoqués) et attendre le résultat de la recherche des BO.

Les dosages sont réalisés avec les réactifs et le néphélomètre BN II de la firme Siemens (Dade-Behring). Nous avons utilisé les programmes d'aide au diagnostic proposés par cette firme : d'abord l'adaptation française du diagramme de Reiber, le diagramme de Fateh Moghadam [39] et ensuite le programme Protis.

Le diagramme de Fateh Moghadam fait partie du soft Système Expert Profils Protéines (SEPP) utilisé par de nombreux laboratoires pour établir le profil protéique. Ce diagramme comporte une abscisse et une ordonnée linéaire. Il permet de classer les patients en sept catégories suivant la position de l'index : normaux, avec altération de la barrière, avec altération de la barrière et synthèse possible, avec altération de la barrière et synthèse intrathécale, synthèse intrathécale sans altération de la barrière, résultat physiologiquement impossible et index ininterprétable en raison d'une trop forte altération de la barrière (si $Q_{IgG} > 0,023$) (Fig. 7). Le soft positionne l'index et génère un de ces commentaires. Le diagramme de Fateh Moghadam ne peut être utilisé en cas de contamination sanguine, chez l'enfant en bas âge, en cas de traumatisme de la colonne, ni sur du liquide prélevé à un autre niveau que le niveau lombaire.

Par la suite, Siemens a commercialisé un autre soft, Protis, qui reproduit le diagramme de Reiber et propose

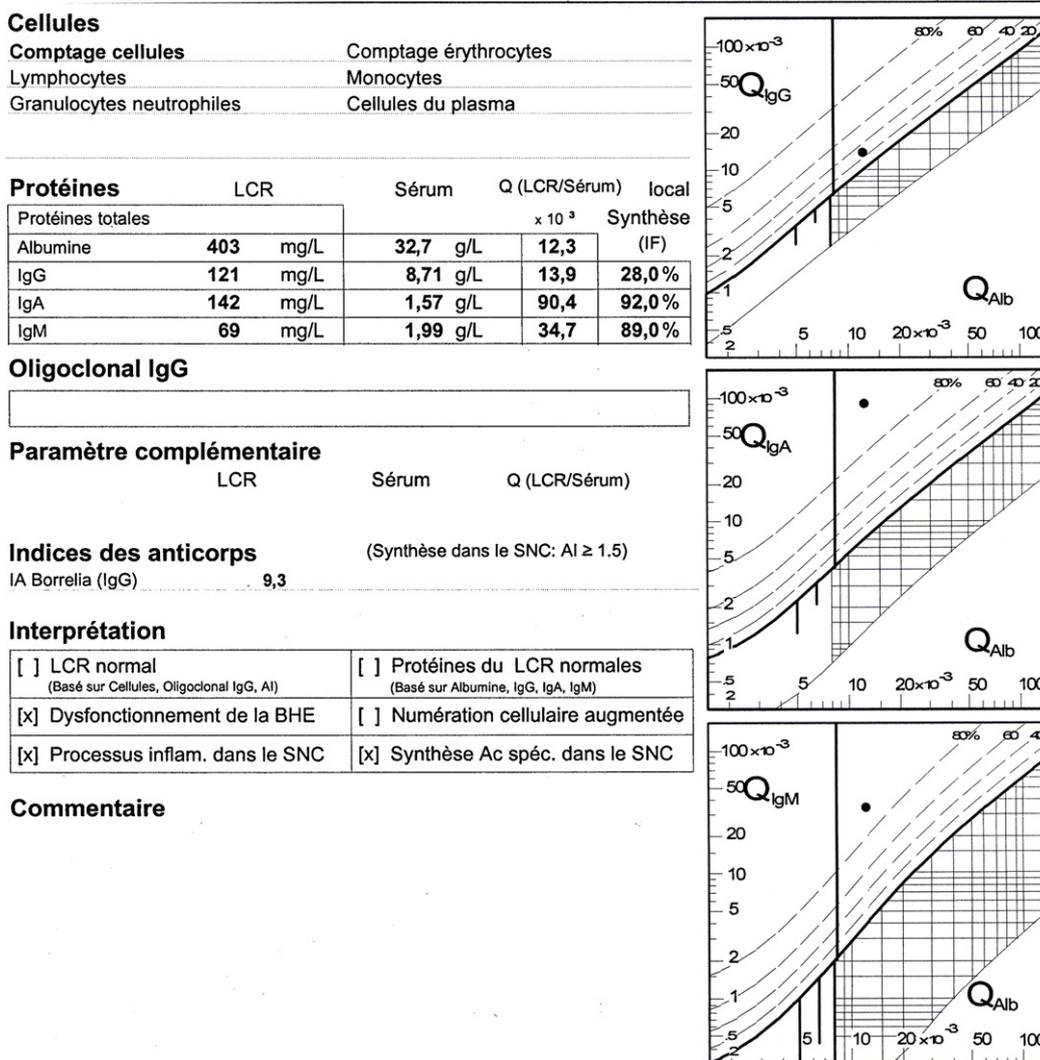


Figure 8 Protocole d'un patient souffrant d'une neuroborréliose lors du diagnostic : le nombre de BO dans le LCR est nettement supérieur à celui du sérum.

également une série de commentaires interprétatifs : normal, SI probable, forte ou légère altération de la barrière, SI sans altération de la barrière... En 2007, Siemens propose une nouvelle version, Protis 2. Le protocole édité par ce programme ressemble fort à celui de la première version. Toutefois, le commentaire de Protis est remplacé par un tableau comportant six cases (Fig. 8). À gauche, trois possibilités résumant l'interprétation des données selon Reiber : LCR normal, dysfonctionnement de la BHE, processus inflammatoire dans le SNC. En fonction du résultat des dosages, une croix apparaît à côté d'un ou de plusieurs commentaires. La partie de droite correspond à des options qu'on peut ne pas introduire dans le programme et qui ne bloquent pas l'édition du diagramme : protéines du LCR normales, numération cellulaire augmentée et synthèse d'anticorps spécifique dans le SNC. Cette dernière information est basée sur la valeur de l'AI déterminé par le programme lorsqu'on lui communique les résultats de la sérologie sur le LCR et le sérum.

Les performances de Protis 2 dans la pratique : l'étude

Nous avons comparé le commentaire généré par Protis 2 à la recherche des BO. Nous disposons du commentaire généré par SEPP, Protis version 1 (Protis 1) et de la valeur de l'index IgG.

La recherche des BO est réalisée à l'aide du kit Hydragel 9 CSF Isofocusing et de l'Hydrasys Focusing de la firme Sebia. LCR et sérums sont dilués de manière à obtenir une concentration identique de 20 mg/l à l'aide d'un diluteur spécial, l'Hydraplus. Cette technique correspond aux critères définis dans les consensus de 2005. L'interprétation du test est également conforme à ce consensus [19,22].

Les dosages des protéines ont été réalisés avec les réactifs, les standards et les contrôles de la firme Siemens sur le néphélomètre BN II. Rappelons qu'il est indispensable de réaliser les dosages dans le sang et le LCR avec les

mêmes réactifs, la même courbe d'étalonnage et les mêmes contrôles adaptés à la faible concentration en protéines du LCR, ce qui nécessite donc une dilution préalable des sérums au 1/200 [40]. Les Qalbu, QlgG et l'index IgG sont également calculés par l'informatique centrale (GLIMS) et les résultats imprimés sur les protocoles d'analyses.

Notre étude a porté sur 330 couples LCR/sérums prélevés chez 314 patients, essentiellement des adultes, chez qui une maladie inflammatoire du SNC était suspectée. La recherche des BO est positive chez 84 patients (25%). Le LCR de 13 patients présente une bande unique, recherche considérée comme négative en fonction des consensus actuels.

Cinquante neuf pour cent des LCR contenaient moins de cinq globules rouges par millimètre cube et 18% d'entre eux plus de 100 globules rouges par millimètre cube.

Les performances de Protis 2 dans la pratique : les résultats

Chez 17 des 84 patients présentant des BO (20%), aucun des trois programmes n'a pu identifier une SI. En revanche, les trois programmes détectent une SI chez trois patients pour lesquels on n'a pas observé de BO. SEPP ne peut interpréter les résultats de six patients en raison d'une importante altération de la barrière.

Le Tableau 1 reprend la sensibilité, spécificité, VVP, VVN des commentaires générés par les différents programmes et de l'index IgG. Nous avons également déterminé les rapports de vraisemblance (*likelihood ratio*) qui globalisent en une donnée les notions de spécificité et de sensibilité [41,42]. Le rapport de vraisemblance d'un test positif (RV+) se calcule par la formule sensibilité/(1-spécificité). C'est, dans ce cas qui nous occupe, une estimation de la probabilité que, lorsque le soft identifie une SI, la recherche des BO soit réellement positive. Le RV+ varie entre 1 (il n'a alors aucune signification) et l'infini; plus il est élevé, plus le test sera utile. Idéalement, il doit être supérieur à 10 et il a une faible signification s'il est compris entre 2 et 5. Le rapport de vraisemblance d'un test négatif (RV-) se calcule par la formule (1 - sensibilité)/spécificité. C'est une estimation de la probabilité que, lorsque le soft annonce une absence de SI, on n'observe pas de BO. Le RV- varie de 0 à 1 (il n'a alors aucune signification). Plus le RV est faible, plus il a de signification. Idéalement, il doit être inférieur à 0,1 et sa signification est faible s'il est compris entre 0,2 à 0,5.

Il est évident sur base de ce tableau que le nombre de SI détectées par SEPP, donc sa sensibilité, est beaucoup plus élevée que celle des autres programmes et que celle de l'index IgG. En revanche, il génère de nombreux faux positifs généralement situés dans la zone trois (Fig. 7). Malgré tout, on dénombre 19 faux négatifs (22% des BO positives). SEPP est donc le meilleur test de dépistage, mais son RV- de 0,3 ne lui permet pas d'exclure la maladie lorsqu'il ne détecte pas SI et son RV+ de 5 ne lui permet pas non plus de confirmer l'existence de BO lorsqu'il détecte une SI. Il ne peut que fournir une orientation clinique et répond bien à ce qu'on en attendait dans notre laboratoire. Le fait que certains résultats soient ininterprétables avec ce soft ne nous pose pas de réel problème puisque actuellement ce type d'analyse nous est rarement demandé en cas d'infection. En outre, une altération aussi importante de la barrière exclut une SEP.

Les programmes Protis génèrent beaucoup plus de faux négatifs et manquent donc de sensibilité. Protis 1 a des performances fort proches d'un index IgG supérieur à 0,7. Dans notre population où une altération importante de la barrière est rare, l'utilisation de ce programme ne nous apporte pas une information utile au point de justifier la charge supplémentaire de travail générée par son édition: nous l'avons rapidement abandonné.

La sensibilité de Protis 2, 50%, est encore plus mauvaise. En revanche, sa spécificité de 98% est excellente: nous dénombrons seulement cinq faux positifs (2% des 246 échantillons BO négatifs). Son RV+ élevé de 25 en fait un très bon test prédictif de l'existence de BO lorsqu'il annonce « processus inflammatoire dans le SNC ». En revanche, son RV- de 0,5 est trop élevé pour exclure une SI lorsqu'il ne signale pas de processus inflammatoire.

Sur base de nos observations, on peut dire que si on avait considéré comme « LCR positif » les LCR dont les index IgG étaient supérieurs à 0,7, on aurait un résultat faussement négatif dans 37% des cas (31 index < 0,7 pour 84 BO positives). Si on avait considéré comme « LCR positif », les LCR générant le commentaire « réaction inflammatoire » de Protis 2, on aurait un résultat faussement négatif dans 55% des cas (46 « normal » pour 84 BO positives)!

La majorité des commentaires erronés sont observés lorsque l'index IgG se positionne sur ou très près d'une ligne du diagramme. Sa visualisation est donc très importante et on ne peut en aucun cas se contenter du commentaire généré par le programme.

Tableau 1 Résultats des différents programmes et de l'index IgG.

	SEPP*	Protis	Protis 2	Index > 0,7
Vrais positifs	63	50	42	53
Vrais négatifs	203	233	241	236
Sensibilité	77%	59%	50%	63%
Spécificité	84%	95%	98%	96%
VPP	62%	79%	89%	84%
VPN	91%	87%	85%	88%
Lr+	4,8	11,8	25,0	15,7
Lr-	0,27	0,43	0,51	0,38
Efficacité	82%	85,7%	85,7%	87,5%

*Pas d'interprétation pour six échantillons

La fiabilité de l'index IgG et de Protis 2 est encore plus mauvaise en cas de contamination sanguine. Parmi les 59 patients dont le LCR contenait plus de 100 hématies par millimètre cube, on dénombre 11 échantillons qui présentaient des BO spécifiques au LCR.

Protis 2 ne détecte une SI que dans deux cas. Sa sensibilité passe de 50 % pour l'ensemble des données à 18 % pour ces échantillons contaminés. En revanche, on ne dénombre qu'un seul faux positif et sa spécificité reste de 98 %. Néanmoins, son RV+ s'effondre à 9 et son RV- augmente à 0,83 et n'a plus aucune signification. En ce qui concerne l'index IgG, sa sensibilité chute de 63 à 45 %, sa spécificité de 96 à 94 %, son RV+ , de 15 à 7,5 et son RV- augmente de 0,38 à 0,58.

Nous avons déjà observé précédemment qu'une contamination sanguine même minime avait une répercussion sur la fiabilité de ces tests [15]. Les programmes Protis permettent d'effectuer une correction des données en fonction du nombre de globules rouges présents dans le LCR et le sang. Nous n'avons pas pratiqué cette correction en raison du surcroît de travail. Nous ne pouvons donc pas juger de son efficacité.

Les performances de Protis 2 dans la pratique : les difficultés de l'édition du diagramme

Dans la pratique, la recherche des BO, le calcul des index d'immunoglobulines et l'utilisation des logiciels représentent une charge certaine pour le laboratoire.

Le LCR et le sérum ne sont pas toujours prélevés en même temps et ne portent pas toujours le même numéro d'identification. Le technicien doit alors rechercher un prélèvement réalisé le jour même, à une heure la plus proche possible de celle de la ponction. L'informatique centrale doit être programmée de manière à ce que toute demande de calcul d'index génère les analyses (immunoglobulines et albumine) sur le BN II et non sur l'automate qui réalise le dosage des protéines par turbidimétrie (Modular, Roche).

Les dosages des immunoglobulines sériques doivent être réalisés sur des dilutions de manière à correspondre aux concentrations du LCR et traitées comme telles. Cela complique la gestion des données par l'informatique centrale. L'identification des patients et les résultats des dosages doivent être introduits manuellement sur un PC autonome pour SEPP. Les résultats peuvent être transférés directement du BN II dans Protis 2, mais ce transfert est parfois difficilement compatible avec l'informatique centrale. Bien entendu, l'encodage peut également être réalisé manuellement.

Malgré tout, nous souhaitons que le diagramme et son commentaire soit communiqué au clinicien le jour de réalisation de la ponction lombaire, l'information fournie par l'index IgG via l'informatique centrale étant beaucoup moins contributive que l'examen du diagramme.

Les performances de Protis 2 dans la pratique : discussion des résultats

Nous avons conscience du caractère réducteur d'une étude basée essentiellement sur une comparaison de techniques.

Idéalement, nous aurions dû déterminer le pourcentage de faux diagnostics qui auraient pu être posés en utilisant l'un ou l'autre programme. Les conséquences d'une SI non détectée dans une affection où une SI est possible sont évidemment moins lourdes que dans une maladie comme la SEP.

L'examen de tous les dossiers des patients de cette étude aurait pu faire l'objet d'un travail à lui seul. Limités par le temps, nous n'avons examiné que les dossiers de quelques patients : ceux des cinq patients pour lesquels Protis 2 avait renseigné une SI non confirmée par les BO et ceux des 11 patients dont les LCR étaient contaminés par du sang et chez qui Protis 2 n'avait pu détecter que 2 SI sur 11.

Chez cinq patients, Protis 2 annonce une synthèse non confirmée par les BO. L'index IgG est également supérieur à 0,7 et positionné près d'une ligne du diagramme ce qui diminue sa fiabilité. Un LCR est contaminé par du sang. Les pathologies observées chez ces patients sont : une paralysie d'installation brutale non résolue par un traitement à haute dose de cortisone chez un patient de 76 ans, une épидурite métastatique chez un patient de 53 ans, un oligastrocytome chez un patient de 46 ans, une encéphalopathie d'étiologie indéterminée (Hashimoto?) d'évolution rapidement favorable chez une patiente de 47 ans et enfin des parésies provoquées par une tumeur envahissante chez une patiente de 50 ans décédée depuis lors. Le nombre élevé de pathologies tumorales dans cette série est surprenant.

Concernant ces « faux positifs », on peut se demander si notre conception selon laquelle SI doit coïncider avec BO est pertinente dans tous les cas. La technique de référence peut être, elle aussi, mise en doute : les bandes oligoclonales étaient peut-être présentes en trop petite quantité pour qu'on puisse les déceler parmi les immunoglobulines polyclonales. Les techniques d'isoélectrofocalisation sont standardisées à l'aide de semi-automates, de gels et d'immunsérums de qualité, mais elles restent délicates et doivent être confiées à des techniciens entraînés. Le gel doit être parfait sinon la lecture devient très difficile lorsqu'il y a peu de bandes ou qu'elles sont en miroir dans le LCR et le sérum. Lorsqu'on n'observe qu'une seule bande spécifique au LCR, l'examen est considéré comme négatif, si l'on observe deux bandes, il est considéré comme positif : une bande peut faire la différence ! On peut également envisager que certaines BO auraient pu être identifiées avec une technique utilisant d'autres ampholines, un autre immun-sérum ou une autre dilution des échantillons.

Parmi les 11 patients dont le LCR était contaminé par du sang, Protis 2 ne décèle une SI que chez deux d'entre eux. Les pathologies observées chez ces patients sont : des parésies des membres inférieurs sans lésion à l'IRM chez une patiente de 41 ans, une névrite optique sans lésion à l'IRM chez un patient de 48 ans, une polyneuropathie sensitivomotrice démyélinisante chez un patient de 46 ans, une maladie d'Alzheimer confirmée par le dosage des protéines Tau et de bêta-amyloïde chez une patiente de 71 ans, une méningite à pneumocoques sur sinusite chez une patiente de 55 ans, un lymphome cérébral chez un patient de 66 ans, une sclérose latérale amyotrophique chez un patient de 74 ans, une paralysie faciale sur neuroborréliose chez une patiente de 58 ans et une névrite optique bulbaire droite, chez une patiente de 30 ans. Cette dernière patiente a été traitée efficacement par haute doses de corticoïdes. Le diagnostic de SEP a été

posé malgré qu'elle ne répondait pas à tous les critères de Mac Donald. Sur les neuf faux négatifs de Protis 2, un seul s'avère un faux négatif qui aurait pu retarder le diagnostic et le traitement.

Enfin, nous avons examiné les dossiers des deux patients dont le LCR contaminé par du sang contenait des BO et chez qui Protis 2 détectait bien une SI. Chez la patiente de 32 ans, le diagnostic de SEP a été établi et un traitement par corticoïdes, puis par Betaféron a été établi. Chez l'autre patiente de 27 ans, la résonance magnétique n'a pas révélé de lésions spécifiques et une neuronite vestibulaire a été évoquée.

Conclusions

Cette étude démontre une nouvelle fois la supériorité de l'isoélectrofocalisation sur les techniques quantitatives pour le diagnostic des maladies inflammatoires du SNC et de la SEP. Elle démontre également que la présence de BO spécifiques au LCR est une anomalie observée dans de nombreuses pathologies neurologiques autres que la SEP.

L'intérêt des techniques quantitatives réside dans leur simplicité et la rapidité de réponse. Le positionnement de l'index IgG sur le diagramme de Reiber à l'aide de soft comme Protis 2 permet une interprétation facile des dosages. Lorsque l'index IgG est situé sur ou près d'une ligne du diagramme, le commentaire édité par ces programmes doit être pris avec réserve. La qualité de l'information est diminuée lorsque l'échantillon est contaminé par du sang et qu'aucune correction n'a été apportée aux données sur base de l'intensité de cette contamination.

Protis 2 présente un haut degré de spécificité, mais une faible sensibilité. Il n'est fiable que lorsqu'il prédit une SI. Selon nous, lorsque le diagnostic de SEP est évoqué sur base de la clinique et de la résonance magnétique, le clinicien peut traiter sans attendre la recherche des BO lorsque Protis 2 annonce une SI et que l'index IgG est bien situé au centre d'une zone du diagramme.

En revanche, Protis 2 ne peut en aucun cas être utilisé ni comme test de dépistage ni pour exclure une SI. En présence des signes évocateurs de la SEP, la recherche des BO doit être réalisée même si Protis 2 ne détecte aucune synthèse.

Rappelons enfin, l'intérêt de ce genre de programme pour l'interprétation des index des IgG, IgA et IgM et le calcul de l'AI dans le diagnostic et le suivi des maladies infectieuses du SNC, un aspect que nous n'avons fait qu'évoquer dans ce travail.

Conflits d'intérêts

Aucun.

Remerciements

Nous remercions tout particulièrement Madame J. Vanherque et Madame F. Detroz pour la réalisation des dosages et l'édition du diagramme de Reiber.

Tous nos remerciements également à Monsieur J.-P. Verlaine (recherche de BO), Madame F. Dom, Madame A. Bogdan et le stagiaire de la Haute École Charlemagne de Liège, Mon-

sieur Francis N'Goma pour l'encodage des résultats sur Protis 2 et l'élaboration du fichier patient.

Références

- [1] Sindic C, Van Antwerpen MP, Goffette S. The intrathecal humoral immune response: laboratory analysis and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:333–40.
- [2] Kuhle J, Mehling M, Regeniter A. Diagnostic moderne du liquide céphalorachidien, un aperçu. *Forum Med Suisse* 2007;7:166–74.
- [3] Keir G, Luxton RW, Thompson EJ. Isoelectric focusing of cerebrospinal fluid immunoglobulin G: an annotated update. *Ann Clin Biochem* 1990;27:436–43.
- [4] Luxton RW, McLean BN, Thompson EJ. Isoelectric focusing versus quantitative measurements in the detection of intrathecal local synthesis of IgG. *Clin Chim Acta* 1990;187:297–308.
- [5] Rumbach L, Grucker M, Kiesmann M, Warter JM, Collard M. Analyse biochimique du liquide céphalorachidien au cours de la sclérose en plaques : étude de différentes formules. *Pathol Biol* 1988;36:1217–20.
- [6] Tibbling G, Link H, Ohman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:385–90.
- [7] Tourtelotte WW, Ma BI. Multiple sclerosis: the blood-brain barrier and the measurement of de novo central nervous system IgG synthesis. *Neurology* 1978;28:76–83.
- [8] Schuller E, Sagar HJ. Central nervous system IgG synthesis in multiple sclerosis. Application of new formula. *Acta Neurol Scand* 1983;67:365–71.
- [9] 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;163:319–28.
- [10] Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)—a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci* 1994;122:189–203.
- [11] Reiber H. The hyperbolic function: a mathematical solution of protein flux/CSF flow model for blood-CSF barrier function, a reply to the letter by S. Ohman *J Neurol Sci* 1994;126:243–5.
- [12] Reiber H. Cerebrospinal fluid-physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult Scler* 1998;4:99–107.
- [13] Reiber H, Otto M, Trendelenburg C, Wormek A. Reporting cerebrospinal fluid data: knowledge base and interpretation software. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:324–32.
- [14] Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001;184:101–22.
- [15] Gillain N, Fumal A, Minon J-M. Bandes oligoclonales et index IgG interprété selon Reiber dans les maladies inflammatoires du système nerveux central. *Immun Anal Biol Special* 2006;21:348–56.
- [16] Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers. CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci* 2003;21:79–96.
- [17] Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2001;310:173–86.
- [18] Schubert J, Weissbrich B. Detection of virus-specific intrathecally synthesised immunoglobulin G with a fully automated enzyme immunoassay system. *BMC Neurol* 2007;7–12.
- [19] Andersson M, Alvarez-Germeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:897–902.
- [20] Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple Sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006;354:942–55.

- [21] Mehling M, Kuhle J, Regeniter A. 10 most commonly asked questions about cerebrospinal fluid characteristics in demyelinating disorders of the central nervous system. *The Neurologist* 2008;14:60–5.
- [22] Freedman M, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimley G, Keir J, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis. A consensus statement. *Arch Neurol* 2005;62:865–70.
- [23] Davies G, Keir G, Thompson EJ, Giovannoni G. The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band. A follow up study. *Neurology* 2003;60:1163–6.
- [24] Franciotta D, Zardini E, Lolli F. Correspondance: The clinical significance of an intrathecal monoclonal immunoglobulin band- a follow up study. *Neurology* 2004;62:675–6.
- [25] Noseworthy J, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:938–52.
- [26] Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Eng J Med* 2000;343:1430–8.
- [27] Ransohoff R. Natalizumab for Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2007;356:2622–9.
- [28] Hauser S, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with Rituximab in relapsing-remitting Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2008;358:676–88.
- [29] The CAMMS223 Trial Investigators. Alemtuzumab vs. Interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Eng J Med* 2008;359:1786–801.
- [30] Hauser S. Multiple lessons for Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2008;359:1838–41.
- [31] Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H-P, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for Multiple Sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald criteria". *Ann Neurol* 2005;58:840–6.
- [32] Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006;180:17–28.
- [33] Sindic CJM, 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;33:63–72.
- [34] Villar LM, Masjuan J, Gonzalez-Portués P, Plaza J, Sabada M, Roldan E, et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003;53:222–6.
- [35] Mandriolo 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;255:1023–31.
- [36] Schneider R, Euler B, Rauer S. Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *Eur J Neurol* 2007;14:904–11.
- [37] Reindl M, Linington C, Brehm U, Egg R, Dilitz E, Deisenhammer F, et al. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and the other neurological diseases: a comparative study. *Brain* 1999;122:2047–56.
- [38] 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;2:3.
- [39] Fateh-Moghadam. Logiciel d'aide à l'interprétation du bilan protéique du LCR. Copyright Behringwerke 1990.
- [40] Reiber H, Thompson EJ, Grimley G, Bernardi G, Adam P, Monteiro de Almeida S, et al. Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an internet based discussion. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:331–7.
- [41] Marshall WJ, Bangert S, Raynaud E. Paramètres biochimiques en médecine clinique. In: *Biochimie médicale. Physiologie et diagnostic*. Elsevier; 2004, 10.
- [42] Lavoie E. Poser le diagnostic clinique de la pharyngite streptococcique: résultats d'une méta-analyse. *Actualité médicale*, mai 2001 <http://cetp.fmed.ulaval.ca/CetP/contenu/ARTICLES/2001/01.05.16.2.htm>.