



HAL
open science

Évaluations des chaînes légères libres sériques et intrathécales comme biomarqueur diagnostique et pronostique dans la sclérose en plaques

Michaël Levraut

► **To cite this version:**

Michaël Levraut. Évaluations des chaînes légères libres sériques et intrathécales comme biomarqueur diagnostique et pronostique dans la sclérose en plaques. Médecine humaine et pathologie. Université Côte d'Azur, 2023. Français. NNT : 2023COAZ6055 . tel-04524703

HAL Id: tel-04524703

<https://theses.hal.science/tel-04524703>

Submitted on 28 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

Évaluations des chaînes légères libres sériques et intrathécales comme biomarqueur diagnostique et pronostique dans la sclérose en plaques

Michaël LEVRAUT

Unité Mixte de Recherche Clinique Côte d'Azur, équipe URRIS

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences de la vie et de la santé d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Pr Christine LEBRUN-FRENEY

Soutenue le : 21 décembre 2023

Devant le jury, composé de :

Pr Barbara SEITZ-POLSKI, PU-PH, CHU de Nice, France

Pr Laure MICHEL, PU-PH, CHU de Rennes, France

Pr Romain MARIGNIER, PU-PH, CHU de Lyon, France

Dr Édith BIGOT-CORBEL, MCU-PH, CHU de Nantes, France

Pr Éric THOUVENOT, PU-PH, CHU de Nîmes, France

Évaluations des chaînes légères libres sériques et intrathécales comme biomarqueur diagnostique et pronostique dans la sclérose en plaques

Directrice de thèse :

Pr Christine LEBRUN-FRENAY

Présidente du jury :

Pr Barbara SEITZ-POLSKI

PU-PH, CHU de Nice, France

Rapporteurs :

Pr Laure MICHEL

PU-PH, CHU de Rennes, France

Pr Romain MARIGNIER

PU-PH, CHU de Lyon, France

Examineurs :

Dr Édith BIGOT-CORBEL

MCU-PH, CHU de Nantes, Lyon, France

Pr Éric THOUVENOT

PU-PH, CHU de Nîmes, France

Résumé et mots clefs

La sclérose en plaques (SEP) est la maladie inflammatoire du système nerveux central (SNC) la plus fréquente et est la première cause de handicap d'origine non traumatique dans les populations d'adultes jeunes. Le pronostic neurologique des patients atteints de SEP s'est amélioré ces 20 dernières années grâce à l'avènement des thérapeutiques immuno-actives et les révisions successives des critères diagnostiques, se voulant de plus en plus sensibles. Cependant, ce gain de sensibilité entraîne une diminution de spécificité, avec un risque d'erreurs diagnostiques plus fréquentes. Nous manquons donc d'outils sensible et spécifique d'aide au diagnostic des patients suspects de SEP.

Compte tenu des processus immuno-pathologiques impliqués dans la maladie, l'objectif de cette thèse est d'évaluer les performances diagnostiques et pronostiques de différents biomarqueurs dans le liquide céphalo-rachidien (LCR): Différentes cytokines intrathécales (IL-1 β , récepteur soluble de l'IL-2 (sIL-2R), IL-6, et IL-10), et les chaînes légères libres (CLL) kappa, en les comparant aux bandes oligoclonales (BOC), actuel biomarqueur du LCR de référence dans la SEP. Nous avons mis en place une cohorte prospective (CyBIRD, NCT05056740) incluant tout patient majeur adressé au CRC-SEP du CHU de Nice pour une suspicion clinique et/ou radiologique de SEP. Sur les 176 patients inclus, l'index kappa et la fraction intrathécale (FI) de CLL kappa favorisaient le diagnostic de SEP (AUC 0.90 et 0.89 respectivement) et les concentrations d'IL-6 et de sIL-2R dans le LCR favorisaient le diagnostic de maladie inflammatoire du SNC non SEP (AUC 0.87 et 0.77 respectivement). Après avoir déterminé les seuils optimaux de chaque biomarqueur, un index kappa positif semblait plus performant que les BOC pour le diagnostic de SEP (AUC 0.82 vs 0.74).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons mené une seconde étude rétrospective multicentrique française à l'aide du soutien de la Société Francophone de la SEP. Grâce à la collaboration de 13 CRC-SEP français, 1621 patients ont été inclus. Nos résultats montraient que l'index kappa (AUC 0.94) et la FI kappa (AUC 0.94) avaient une capacité diagnostique respectivement équivalente ($p=.123$), et supérieure à celle de la valeur brute des CLL kappa dans le LCR (AUC 0.91, $p<.0001$). Un index kappa positif (seuil de 8.9) était plus sensible (88% vs 82%) et aussi spécifique (89% vs 90%) que les BOC. Enfin, la valeur de l'index kappa n'était pas influencée par les caractéristiques cliniques de la maladie, les différentes techniques de dosage des CLL, ou encore la prise de corticoïdes, renforçant son intérêt à la phase diagnostique.

Pour terminer, nous avons évalué si la valeur de l'index kappa au diagnostic prédisait l'évolution clinique et radiologique des patients ayant un premier événement clinique suspect de SEP (SCI) ou un syndrome radiologique isolé (SRI). L'étude de 182 patients (146 SCI et 36 SRI) a montré que l'index kappa permettait de prédire l'apparition d'une nouvelle lésion radiologique au cours du temps chez les patients SCI (AUC variant de 0.86 à 0.96 à 12 et 48 mois, Hazard ratio 1.06 [1.04; 1.07], $p<.0001$) et chez les patients SRI (AUC variant de 0.84 à 0.64 à 12 et 24 mois, Hazard ratio 1.08 [1.03; 1.13], $p=.002$) mais aussi l'apparition d'une seconde poussée clinique chez les patients SCI (AUC variant de 0.75 à 0.87 à 12 et 48 mois, Hazard ratio 1.04 [1.01; 1.07], $p=.007$).

L'ensemble de nos résultats suggèrent que la mise en évidence d'une synthèse intrathécale de CLL kappa, via le calcul de l'index ou de la FI kappa, est un outil sensible et spécifique pour le diagnostic de SEP. Il permet d'estimer le risque d'évolution clinique et radiologique dès les phases les plus précoces de la maladie. Ces résultats apportent un argument fort pour l'intégration de ce

biomarqueur dans les prochaines révisions des critères diagnostiques de la maladie.

Mots clefs : Sclérose en plaques, Biomarqueurs, Chaînes légères libres, Cytokines

Abstract and keywords

Multiple sclerosis (MS) is one of the most common central nervous system (CNS) inflammatory and demyelinating disease worldwide, and is the main cause of non-traumatic disability in young adults. Multiple sclerosis prognosis improved during the past 20-years because of treatments development and efficacy and the successive revisions of MS diagnostic criteria that allow to diagnose MS sooner, thanks to their high sensitivity. Nonetheless, the gain in sensitivity in MS diagnostic criteria leads to a loss of specificity increasing the risk of misdiagnosis. We lack sensitive and specific biomarkers that could help clinicians to diagnose MS accurately. Given the pathological processes leading to CNS inflammation in MS, we aimed to evaluate the diagnostic performances of four cytokines implicated in different inflammatory mechanisms (IL-1 β , soluble IL-2 receptor (sIL-2R), IL-6, et IL-10) and kappa free light chains (kappa FLC). The performances of all these biomarkers were compared to those of oligoclonal bands (OCB).

In Nice University Hospital MS tertiary center, we set up a monocentric prospective cohort (CyBIRD cohort, NCT05056740) that included all adult patients referred for a clinical or MRI suspicion of MS. Of the 176 included patients, both the kappa FLC index and the kappa FLC intrathecal fraction (IF) were able to differentiate MS and non-MS patients (AUC of 0.90 and 0.89 respectively). Cerebrospinal fluid (CSF) IL-6 and sIL-2R concentrations favored non-MS inflammatory CNS disorders (AUC of 0.87 and 0.77 respectively). According to our optimal threshold, a positive kappa FLC index performed better than OB for MS diagnosis (AUC 0.82 vs 0.74).

To confirm our results, we conducted, on behalf of the French MS Society, a multicenter retrospective study where 1,621 patients were included. Based on this cohort, the kappa FLC index (AUC 0.94) and the kappa FLC IF (0.94) had similar diagnostic performances ($p=.123$), higher than the CSF kappa FLC

concentration ones (AUC 0.91, $p < .0001$). A positive kappa FLC index (threshold of 8.9) was more sensitive (88% vs 82%) and as specific as OB (89% vs 90%). We also found that the kappa FLC index value was not influenced by baseline MS clinical characteristics, by samples or analyzers differences, nor by steroid exposure at sampling reinforcing its interest as diagnostic biomarker.

Finally, we evaluated whether the baseline value of the kappa FLC index was able to predict clinical relapses or new MRI lesions during follow-up, in patients presenting with clinically or radiologically isolated syndromes (CIS and RIS). Based on the retrospective study of 182 patients (146 CIS and 36 RIS), the kappa FLC index was able to predict new MRI lesions in CIS (AUC of 0.86 and 0.96 at 12 and 48 months respectively – Hazard ratio of 1.06 [1.04; 1.07], $p < .0001$), and in RIS (AUC of 0.84 and 0.64 at 12 and 24 months respectively – Hazard ratio of 1.08 [1.03; 1.13], $p = .002$), but also clinical relapse in CIS (AUC of 0.75 and 0.87 at 12 and 48 months respectively – Hazard ratio of 1.04 [1.01; 1.07], $p = .007$).

Our results suggest that a kappa FLC CSF-restricted synthesis (kappa FLC index or IF) is sensitive and specific for MS diagnosis, and may predict clinical and MRI disease course in the earliest phases of the disease. Therefore we suggest adding kappa FLC biomarkers (whether it is kappa FLC index or IF) in the further revisions of MS diagnostic criteria.

Keywords : Multiple sclerosis, Biomarkers, Kappa free light chains, Cytokines

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma Directrice de thèse : **Pr Christine Lebrun-Frénay**. Christine, je ne vous remercierai jamais assez pour vos précieux conseils, votre soutien, votre confiance et votre patience à mon égard surtout cette dernière année qui n'a pas été simple. Vous êtes pour moi un exemple de réussite et j'espère pouvoir continuer à avancer et apprendre à vos côtés.

Je souhaite également remercier **Pr Barbara Seitz-Polski**, qui me fait l'honneur de présider ce jury. J'ai beaucoup appris à vos côtés et j'espère avoir l'occasion de collaborer avec vous encore longtemps.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont acceptés de donner de leur temps précieux pour juger mon travail : mes rapporteurs **Pr Laure Michel** et **Pr Romain Marignier**, mes examinateurs **Dr Édith Bigot-Corbel** et **Pr Éric Thouvenot**.

Un grand merci à **Cassandra**, ma co-thésarde, pour ses conseils toujours avisés et sa capacité à me rappeler sans cesse ce que j'oublie tout le temps ! Aux **Dr Lydiane Mondot, Saskia Bresch, Mikaël Cohen** : je vous remercie pour vos conseils et votre accueil au sein de cette unité de neuro-inflammatoire unique. Je suis ravi d'avoir partagé ce début de chemin avec vous. Pourvu qu'il dure longtemps. Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe de l'URC Neurosciences, avec qui j'ai pu partager de très bons moments. Merci à toute l'équipe du CRC-SEP du CHU de Nice qui a pu rendre ce travail possible.

Je souhaite également remercier le service de médecine interne. Au **Dr Yanis Kouchit**, grâce à qui l'association « début de clinicat et fin de thèse » a pu être surmontable ! Aux **Dr Nihal Martis, Sarah Lechtman** et **Pierre-Yves Jeandel** : merci pour votre soutien dans ce parcours.

Enfin, je tiens à remercier ma famille.

A mes parents, qui m'ont donné le goût du travail, la persévérance et la passion de l'hôpital. Merci de m'avoir inculqué toutes les valeurs qui font que j'en suis là maintenant.

A Mathieu et Cyrielle. Merci beaucoup pour tous les bons moments passés ensemble. Vous nous manquez !

A ma femme, Nelly. Je souhaite te remercier pour ton soutien sans faille, depuis le début et jusqu'aux derniers moments qui furent difficiles. Tu as rendu cette étape possible et tu as pu consacrer à nos enfants le temps dont ils avaient besoin. Pour cela, je ne te remercierai jamais assez. Je t'aime.

A Olivia et Noah, mes enfants. L'accueil que vous me réservez chaque soir lorsque je rentre est ce qui me permet d'avancer chaque jour.

Table des matières

Liste des Abréviations	14
Liste des figures et tableaux	16
I. Introduction	19
I.1. La sclérose en plaques, généralités.....	19
I.2 Évolution des critères diagnostiques.....	20
I.3. Immunopathologie dans la SEP et potentiels biomarqueurs.....	22
I.3.a. Rôle des cellules T et biomarqueurs.....	23
I.3.b Rôle des cellules B et biomarqueurs.....	24
I.4. Les chaînes légères libres.....	26
I.5. Objectifs de la thèse.....	28
II. Identification d'un biomarqueur immunologique d'intérêt	31
1. Constitution de la cohorte CyBIRD : méthodologie.....	31
1.a Critères d'inclusion et d'exclusion dans la cohorte CyBIRD.....	31
1.b Dosages des biomarqueurs à l'étude.....	31
1.c Quantification d'une synthèse intrathécale de chaînes légères libres.....	33
1.d Analyse statistique de la cohorte CyBIRD.....	34
2. Résultats de cette première étude.....	35
2.a. Quantification des différents biomarqueurs à l'étude.....	37
2.a.1. Les chaînes légères libres kappa.....	37
2.a.2. Les cytokines intrathécales.....	39
2.b. Capacité de chaque biomarqueur à prédire le diagnostic de SEP.....	40
2.c. Calcul des sensibilités et spécificités de chaque biomarqueur.....	41
2.c.1. Séparation des groupes SEP et CNI.....	43
2.c.2. Séparation des groupes SEP et CI.....	43
2.d. Évaluation des facteurs influençant les CLL kappa, sIL-2R, et IL-6.....	44
3. Discussion.....	45
4. Points clés de la première étude.....	49
III. Évaluation des différentes mesures de chaînes légères libres pour le diagnostic de SEP	50
1. Méthodologie de cette étude SFSEP nationale multicentrique.....	50
1.a. Population de l'étude.....	50
1.b Données collectées auprès des CRC-SEP.....	51
1.c. Estimation d'une synthèse intrathécale de CLL.....	52

1.d. Analyse statistique de l'étude SFSEP.....	53
2. Résultats de cette deuxième étude.....	54
2.a Quantification des biomarqueurs de CLL entre les groupes.....	58
2.b. Performances des biomarqueurs de CLL.....	59
2.c. Comparaison des performances diagnostiques de l'index kappa et de la FI kappa avec celle des BOC pour le diagnostic de SEP.....	63
2.c.1. Performances pour séparer les groupes SCI/SEP et Contrôle.....	63
2.c.2. Performances pour séparer les sous-groupes SEP et CI.....	63
2.d. Faut-il utiliser les CLL kappa seules ou en combinaison les BOC ?.....	65
2.e. Facteurs pouvant influencer la valeur de l'index kappa.....	67
2.f Reproductibilité du dosage des CLL kappa dans le LCR.....	67
3. Discussion de cette seconde étude.....	69
3.1 Les CLL lambda sont peu performantes pour prouver la présence d'une activité lymphocytaire B dans le LCR.....	69
3.2 L'importance de la prise en compte de la perméabilité de la barrière hémato-méningée via le quotient albumine, pour prouver une synthèse locale de CLL.....	70
3.3 L'index kappa et la FI kappa aussi performants que les BOC pour le diagnostic de SEP.....	71
3.4 La valeur de l'index kappa dépend de l'âge, du sexe et de l'activité de la maladie au moment du recueil.....	73
4. Points clés de la seconde étude.....	74
IV. Rôle pronostic des chaînes légères libres kappa dans la SEP.....	75
1. Méthodologie.....	76
1.a Schéma de l'étude.....	76
1.b Données collectées.....	77
1.c Analyse de l'IRM.....	77
1.d Analyses biologiques.....	78
1.e Analyses statistiques.....	78
2 Résultats de cette troisième étude.....	79
2.a. Capacité de prédiction d'une nouvelle lésion T2 dans le groupe SCI.....	83
2.b. Capacité de prédiction d'une nouvelle lésion T2 dans le groupe SRI.....	86
2.c. Capacité de prédiction d'une poussée clinique dans le groupe SCI.....	89

3. Discussion pour cette troisième étude.....	92
3.a Prédiction clinique et radiologique chez les patients SCI.....	93
3.b Prédiction clinique et radiologique chez les patients SRI.....	95
3.c Prédiction du handicap chez les patients SEP.....	95
4. Points clés de la troisième étude.....	97
V. Conclusions et perspectives.....	98
VI. Références bibliographiques.....	101
VII. Annexes.....	114
1. Formulaire d'information patient de la cohorte CyBIRD.....	115
2. Article 1.....	118
3 Article 2.....	131
4 Article 3.....	146

Liste des abréviations

ADEM : Encéphalo-Myélite Aiguë Disséminée

AUC : Area Under the Curve

BOC : Bandes Oligoclonales

CAARI : Cerebral amyloid angiopathy related-inflammation

CI : Contrôle Inflammatoire

CLL : Chaînes Légères Libres

CNI : Contrôle Non Inflammatoire

CRC-SEP : Centre de Ressource et Compétence pour la Sclérose En Plaques

EBV : Epstein-Barr Virus

FI : Fraction Intrathécale

FLAIR : Fluid-Attenuated Inverse Recovery

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

Ig: Immunoglobuline

IL : Interleukine

INF : Interféron

LB : Lymphocyte B

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LT : Lymphocyte T

MLT : Myélite Longitudinale Transverse

MOG : Myelin-Oligodendrocyte Glycoprotéine

NMO : Neuromyéélite optique

PIRA : Progression Indépendante des poussées

ROC : Receiving Operating Curve

SCI : Syndrome Cliniquement Isolé

SEP : Sclérose En Plaques

SNC : Système Nerveux Central

SRI : Syndrome Radiologiquement Isolé

TNF : Tumor Necrosis Factor

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Différents profils évolutifs cliniques de la SEP	20
Tableau 1. Critères diagnostics de SEP (McDonald 2017)	21
Figure 2. Histologie des lésions démyélinisantes dans la SEP	25
Figure 3. Schéma montrant la constitution d'une immunoglobuline entière et sites de fixation des antisérum	27
Figure 4. Schématisation de la modélisation d'une synthèse locale de CLL selon Reiber (modèle hyperbolique)	30
Tableau 2. Caractéristiques démographiques, cliniques, radiologiques et biologiques de la cohorte CyBIRD	36
Tableau 3. Diagnostics retenus au sein des groupes	37
Figure 5. Quantification des biomarqueurs de chaînes légères libres kappa et leur comparaison entre les groupes	38
Figure 6. Quantification des biomarqueurs de chaînes légères libres kappa et leur comparaison au sein du groupe SEP	39
Figure 7. Quantification des cytokines intrathécales et leur comparaison entre les groupes	40
Tableau 4. Capacité de chaque biomarqueur à identifier le groupe SEP comparé aux différents groupes contrôles	41
Tableau 5. Performances diagnostiques de l'index kappa et des BOC pour séparer les groupe SEP et CNI	43
Tableau 6. Performances diagnostiques de l'index kappa, du sIL-2R, et de l'IL-6 pour séparer les groupe SEP et CI	44
Tableau 7. Variables démographiques et cliniques pouvant indépendamment influencer les valeurs d'index kappa, de sIL-2R et d'IL-6	45

Tableau 8. Données concernant les patients inclus et les automates utilisés par chaque centre : étude SFSEP	55
Tableau 9. Diagnostics retenus de la cohorte SFSEP	56
Tableau 10. Caractéristiques cliniques et biologiques de base de la cohorte SFSEP en fonction des sous-groupes	57
Figure 8. Quantification et comparaison du taux de CLL kappa et lambda et leurs biomarqueurs (index et FI) entre les sous-groupes	59
Figure 9. Analyse des courbes ROC évaluant la capacité des biomarqueurs de CLL à séparer les patients SEP des contrôles	61
Tableau 11. Résultats de l'analyse des courbes ROC des biomarqueurs de CLL kappa pour séparer les groupes SCI/SEP et Contrôle (n=1621 patients)	62
Tableau 12. Résultats de l'analyse des courbes ROC des biomarqueurs de CLL kappa pour séparer les sous-groupes SEP et CI (n=972 patients)	62
Tableau 13. Capacité de l'index kappa, FI kappa et des BOC à séparer le groupe SCI/SEP du groupe contrôle (n=1621)	64
Tableau 14. Capacité de l'index kappa, FI kappa et des BOC à séparer le sous-groupe SEP du sous-groupe CI (n=972)	65
Tableau 15. Comparaison d'un biomarqueur composite associant CLL kappa et BOC aux CLL kappa seules pour séparer les sous-groupe SEP et CI (n=972)	66
Tableau 16. Évaluation des variables pouvant influencer la valeur de l'index kappa dans le sous-groupe SEP	68
Tableau 17. Comparaison des valeurs médianes des biomarqueurs de CLL kappa dans la SEP entre les centres	69
Figure 10. Organigramme de l'étude pronostique	80

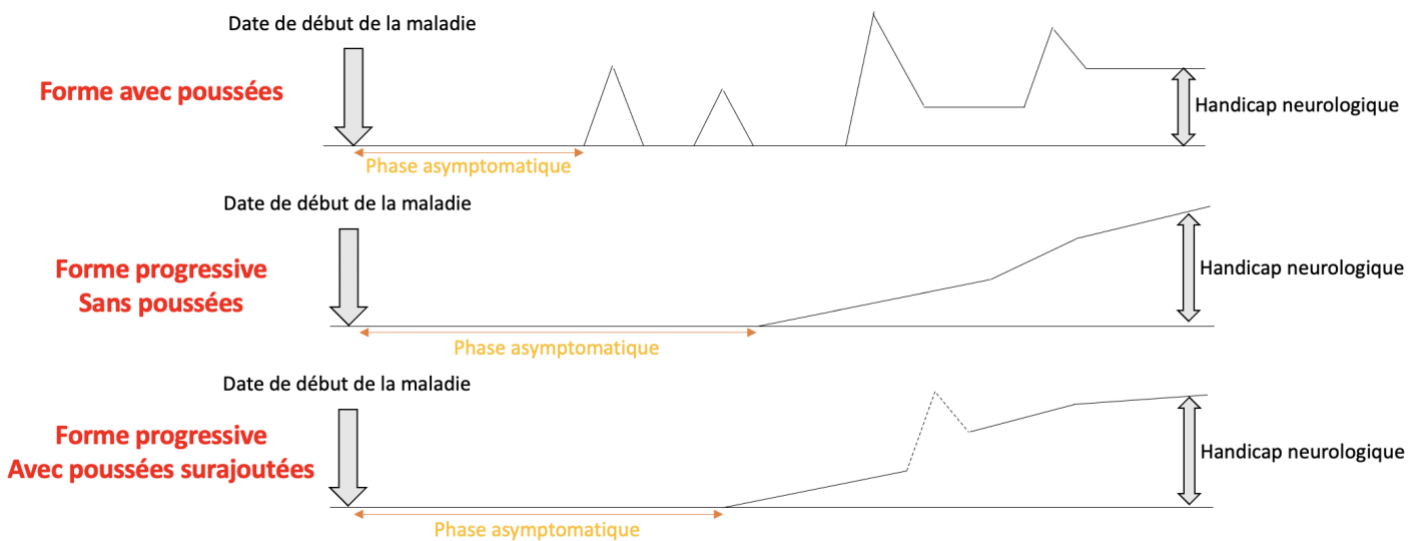
Tableau 18. Données cliniques, biologiques et radiologiques des patients SCI et SRI	81
Figure 11. Évaluation de l'association entre l'index kappa et les autres covariables prédictives	82
Figure 12. Analyse des courbes ROC dépendantes du temps pour la prédiction des différents objectifs	83
Tableau 19. Hazard ratio et indices de concordances estimant le risque de nouvelle lésion T2 chez les patients SCI	84
Tableau 20. Performances de l'index kappa (binaire) et des BOC pour prédire l'apparition d'une nouvelle lésion T2 au cours du temps chez les patients SCI	85
Figure 13. Analyse de survie évaluant le risque de nouvelle lésion T2 chez les patients SCI	86
Tableau 21. Hazard ratio et indices de concordances estimant le risque de nouvelle lésion T2 chez les patients SRI	87
Tableau 22. Performances de l'index kappa (binaire) et des BOC pour prédire l'apparition d'une nouvelle lésion T2 au cours du temps chez les patients SRI	88
Figure 14. Analyse de survie évaluant le risque de nouvelle lésion T2 chez les patients SRI	89
Tableau 23. Hazard ratio et indices de concordances estimant le risque de nouvelle poussée clinique chez les patients SCI	90
Tableau 24. Performances de l'index kappa (binaire) et des BOC pour prédire l'apparition d'une nouvelle poussée clinique au cours du temps chez les patients SCI	91
Figure 15. Analyse de survie évaluant le risque de nouvelle poussée clinique chez les patients SCI	92

I. Introduction

I.1. La sclérose en plaques, généralités

La sclérose en plaques (SEP) est l'une des maladies inflammatoires touchant le système nerveux central (SNC) les plus fréquentes dans les pays développés. Sa prévalence est estimée à 5000 nouveaux cas par an en France. Elle touche préférentiellement les femmes d'âge jeune (âge médian au diagnostic de 30 ans, sex ratio 3/1). Elle constitue un réel enjeu de santé publique, puisque qu'elle est la première cause de handicap d'origine non traumatique dans les populations d'adultes jeunes. Son évolution clinique sans traitement est variable et on décrit classiquement plusieurs formes de la maladie : une forme majoritaire (85% des patients) se traduisant par des poussées inflammatoires neurologiques focales, symptomatiques ou non, pouvant parfois laisser des séquelles, et une forme progressive (15%), entraînant une dégradation lentement progressive du handicap neurologique. Les deux formes de la maladie ne sont pas exclusives puisqu'il existe chez certains malades, une activité inflammatoire intermittente associée à une dégradation neurologique progressive indépendante des poussées.^{1,2} Enfin, il est maintenant clairement admis que la date de début des symptômes ne correspond pas à la date du début de la maladie. Cette affirmation repose sur 2 constats : (i) l'existence de patients présentant toutes les caractéristiques radiologiques de la maladie sans en avoir les symptômes (i.e. le syndrome radiologique isolé) et dont le risque de développer une maladie cliniquement défini est évalué à 35% à 5 ans, et 51% à 10 ans³⁻⁶ mais aussi (ii) par la démonstration d'une neuro dégénérescence avec atrophie cérébrale précoce ou une augmentation des neurofilaments, plusieurs années avant l'identification des premiers symptômes (**Figure 1**).^{7,8}

Figure 1. Différents profils évolutifs cliniques de la SEP



Légende : Les patients ayant une forme avec poussées (ou récurrente-rémittente) présentent des poussées inflammatoires successives, dont les symptômes régressent spontanément en quelques semaines, pouvant laisser des séquelles.

Les formes progressives (pouvant être primaire progressive comme sur la figure ou secondairement progressive, c'est à dire faisant suite à une forme avec poussées) se présente sous la forme d'une accumulation lente et non linéaire du handicap neurologique. Ces profils évolutifs sont actuellement en remembrement pour convenir de formes actives (par aggravation clinique ou radiologique) ou non actives.^{9,10}

Depuis une vingtaine d'années, les efforts scientifiques et médicaux internationaux ont permis la mise sur le marché de plus d'une vingtaine de traitements immuno-actifs. Ces traitements ont permis une réduction importante des poussées inflammatoires¹¹⁻¹⁵ et du handicap neurologique à moyen et longs termes. En revanche, la prise en charge thérapeutique des formes progressives, essentiellement d'origine neurodégénérative, reste encore un besoin non pourvu.¹⁶

1.2 Évolution des critères diagnostics

La grande efficacité des traitements a amené à vouloir les introduire le plus tôt possible, dès la première poussée, pour limiter au maximum l'apparition du

handicap neurologique. Pour cela, les dernières révisions des critères diagnostiques de la maladie ont été simplifiées, en réduisant le nombre de lésions radiologiques nécessaires pour remplir le critère de dissémination spatiale (DIS), et en intégrant différents biomarqueurs radiologiques ¹⁷ et biologiques ¹⁸ permettant d'élargir la définition de dissémination temporelle (DIT), requise pour affirmer le caractère chronique de l'affection démyélinisante, indispensable au diagnostic de SEP. ^{19–23}

Actuellement, le diagnostic de SEP peut être retenu dès le premier évènement clinique chez un patient ayant au moins 2 lésions radiologiques inflammatoires en territoire différent et ayant un biomarqueur remplaçant la DIT (**tableau 1**). Au cours des 20 dernières années, le choix des experts internationaux a été de privilégier des critères sensibles dans le but de diagnostiquer tôt, au prix de la spécificité.^{24,25} La conséquence directe est qu'aujourd'hui, le délai entre les premières manifestations cliniques et le diagnostic de SEP s'est amélioré,²⁶ passant à un délai inférieur à 1 an en moyenne en France.

Tableau 1. Critères diagnostiques de SEP (McDonald 2017)

	Number of lesions with objective clinical evidence	Additional data needed for a diagnosis of multiple sclerosis
≥2 clinical attacks	≥2	None*
≥2 clinical attacks	1 (as well as clear-cut historical evidence of a previous attack involving a lesion in a distinct anatomical location†)	None*
≥2 clinical attacks	1	Dissemination in space demonstrated by an additional clinical attack implicating a different CNS site or by MRI‡
1 clinical attack	≥2	Dissemination in time demonstrated by an additional clinical attack or by MRI§ OR demonstration of CSF-specific oligoclonal bands¶
1 clinical attack	1	Dissemination in space demonstrated by an additional clinical attack implicating a different CNS site or by MRI‡ AND Dissemination in time demonstrated by an additional clinical attack or by MRI§ OR demonstration of CSF-specific oligoclonal bands¶

If the 2017 McDonald Criteria are fulfilled and there is no better explanation for the clinical presentation, the diagnosis is multiple sclerosis. If multiple sclerosis is suspected by virtue of a clinically isolated syndrome but the 2017 McDonald Criteria are not completely met, the diagnosis is possible multiple sclerosis. If another diagnosis arises during the evaluation that better explains the clinical presentation, the diagnosis is not multiple sclerosis. An attack is defined in panel 1. *No additional tests are required to demonstrate dissemination in space and time. However, unless MRI is not possible, brain MRI should be obtained in all patients in whom the diagnosis of multiple sclerosis is being considered. In addition, spinal cord MRI or CSF examination should be considered in patients with insufficient clinical and MRI evidence supporting multiple sclerosis, with a presentation other than a typical clinically isolated syndrome, or with atypical features. If imaging or other tests (eg, CSF) are undertaken and are negative, caution needs to be taken before making a diagnosis of multiple sclerosis, and alternative diagnoses should be considered. †Clinical diagnosis based on objective clinical findings for two attacks is most secure. Reasonable historical evidence for one past attack, in the absence of documented objective neurological findings, can include historical events with symptoms and evolution characteristic for a previous inflammatory demyelinating attack; at least one attack, however, must be supported by objective findings. In the absence of residual objective evidence, caution is needed. ‡The MRI criteria for dissemination in space are described in panel 5. §The MRI criteria for dissemination in time are described in panel 5. ¶The presence of CSF-specific oligoclonal bands does not demonstrate dissemination in time per se but can substitute for the requirement for demonstration of this measure.

Table: The 2017 McDonald criteria for diagnosis of multiple sclerosis in patients with an attack at onset

D'après l'article original de Thompson et al. ²⁰

Le diagnostic de SEP peut demeurer difficile à établir. Les raisons à cela sont multiples : (i) un nombre important d'autres pathologies pouvant se présenter avec des caractéristiques cliniques et/ou radiologiques similaires à la SEP,²⁷ (ii) une grande hétérogénéité clinico-radiologique allant de formes a- ou paucisymptomatiques à des formes agressives pseudo-tumorales, (iii) l'existence d'évènements cliniques démyélinisants monophasiques (événement post-viral, encéphalomyélite aiguë disséminée) et non récidivants, dont les caractéristiques clinico-radiologiques sont parfois indissociables d'un premier événement clinique de SEP, et (iv) l'absence de biomarqueur suffisamment sensible et spécifique. Les critères diagnostiques actuellement en vigueur ont été établis et validés pour des patients ayant présenté un premier événement clinique typique de SEP, et leur application hors de ce contexte n'est pas recommandée car elle représente une source importante d'erreurs diagnostiques.²⁸⁻³⁰ L'identification de biomarqueurs sensibles et spécifiques paraît indispensable pour améliorer la réflexion diagnostique et pronostique des patients atteints de SEP.

1.3. Immunopathologie dans la SEP et potentiels biomarqueurs

Les mécanismes immunologiques aboutissant aux lésions inflammatoires neurologiques centrales, à la démyélinisation et, *in fine*, à la perte axonale sont complexes. Le stimulus aboutissant à l'activation lymphocytaire initiale n'est pas connu, mais semblerait être plurifactoriel.

Il existe une susceptibilité génétique à développer la SEP. Les résultats des études d'agrégation familiale suggèrent que la maladie est associée fortement avec le locus HLA-DRB1*15 :01, mais de nombreux autres loci, mineurs,

impliquant des gènes codant pour des médiateurs immunitaires ont été décrits via les études GWAS.³¹⁻³⁴

Les facteurs de risques environnementaux ont été largement étudiés avec notamment l'implication des virus du groupe herpes, et en particulier l'Epstein-Barr virus dont la primo-infection symptomatique serait un facteur de risque majeur de développer la maladie,^{35,36} le tabagisme,³⁷ ou encore l'obésité.³⁸

I.3.a. Rôle des cellules T et biomarqueurs

Suite à ce(s) stimulus, on observe une activation du système immunitaire innée qui, par la sécrétion de diverses molécules pro-inflammatoires, va activer les cellules T (LT) CD4+ naïves périphériques. Sous l'impulsion de certaines de ces molécules pro-inflammatoires (i.e. IL-12, TNF α , IL-6, et l'IL-23), une altération de la balance entre cellules effectrices et régulatrices va se faire via la polarisation des LT CD4+ vers les voies Th1 (INF γ +, Tbet+), et Th17 (IL17+, ROR γ +), avec une diminution du nombre LT régulateurs (IL10+, FoxP3+).³⁹⁻⁴¹ Cette polarisation – activation LTh1 et LTh17 entraînerait la production d'autres cytokines pro-inflammatoires (INF γ , IL17, TNF α , GM-CSF), qui induiraient à leur tour une boucle inflammatoire Th1, activant les LT CD8+ cytotoxiques et les monocytes macrophages M1 (pro-inflammatoires). Cette activation leucocytaire amènerait une surexpression à leur surface, de molécule d'adhésion^{42,43} entraînant une altération de la barrière hémato-encéphalique, aboutissant à l'envahissement du SNC par les cellules immunitaires.⁴⁴⁻⁴⁶ Cette hypothèse est soutenue par la présence d'une quantité importante de LT, et monocytes macrophages dans les lésions inflammatoires de patients atteints de SEP (**Figure 2**),⁴⁷ mais aussi par l'identification d'une infiltration des follicules méningés par des cellules

circulantes CXCR5+ CD4+ Th1 activées chez des patients atteints de SEP progressive.⁴⁸

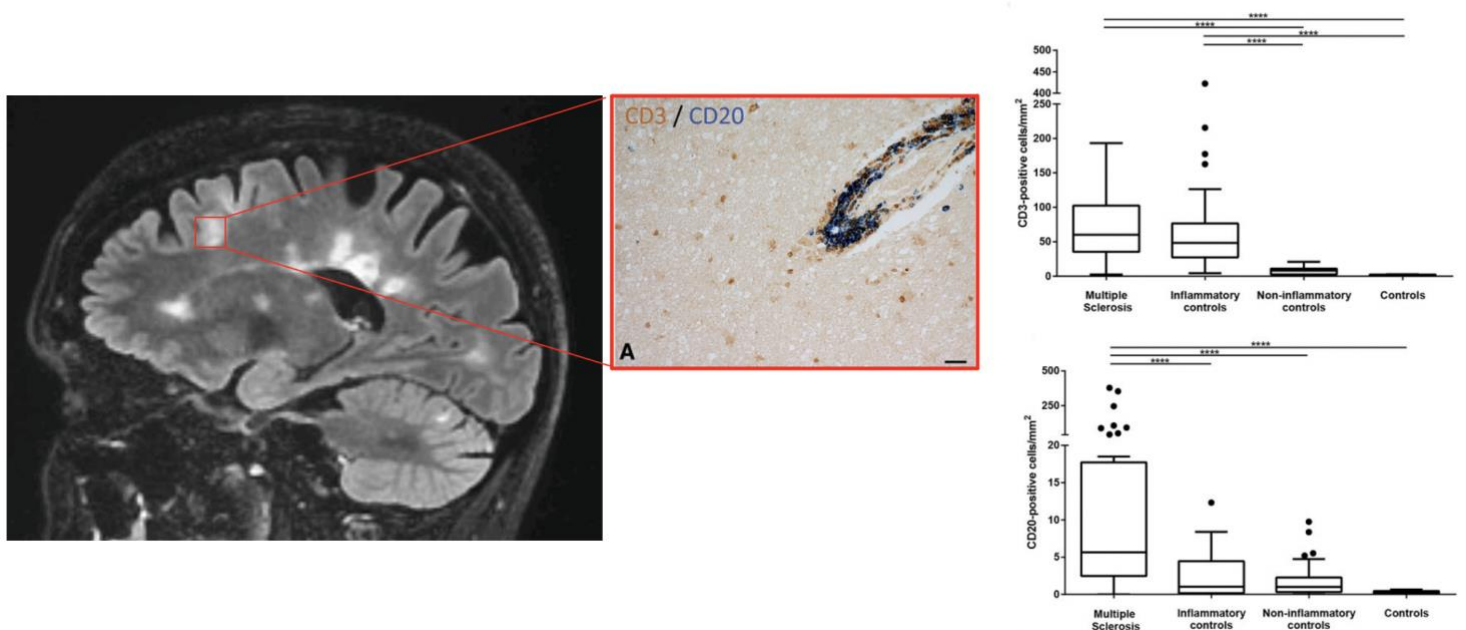
La quantification de certaines cytokines pro- ou anti-inflammatoires dans le LCR semble un outil d'orientation diagnostique intéressant chez les patients suspects de maladie inflammatoire du SNC. Les données de la littérature montrent que la quantification des cytokines intrathécales n'apporte pas d'aide, en pratique clinique, pour favoriser le diagnostic de SEP.⁴⁹⁻⁵¹ Cependant, certaines cytokines intrathécales permettraient d'orienter le diagnostic vers d'autres pathologies inflammatoires. Une élévation du récepteur soluble de l'IL-2 semble favoriser le diagnostic de sarcoidose,⁵²⁻⁵⁴ et celle de l'IL-1 β celui de maladie de Behçet.⁵⁵ L'élévation des cytokines de la voie Th17 est documentée dans les maladies du spectre NMO et MOG⁵⁶⁻⁶⁰ mais aussi dans les vascularites cérébrales.⁶¹ Enfin, le rôle diagnostique de l'IL-10 intrathécale dans le lymphome cérébral est maintenant bien établi.⁶²⁻⁶⁵

I.3.b Rôle des cellules B et biomarqueurs

La participation des cellules B (LB) prend un rôle de plus en plus important dans le processus menant aux lésions inflammatoires neurologiques centrales via différents mécanismes⁶⁶ : (i) en agissant comme cellule présentatrice d'antigène aux LT,⁶⁷ (ii) via la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, GM-CSF, CXCL-13) participant à l'entretien de l'inflammation,⁶⁸⁻⁷⁰ (iii) en produisant des facteurs solubles toxiques contribuant aux lésions oligodendrocytaires et à la perte neuronale, (iv) en contribuant à la formation d'agrégats lymphoïdes ectopiques méningés,^{71,72} (v) en fournissant un réservoir pour le virus EBV, suspect d'entretenir le mécanisme inflammatoire chez les patients SEP.^{73,74} Le rôle majeur des LB est renforcé par la haute efficacité des

traitements ciblant essentiellement les LB – anti-CD-20,^{12,13,16,75} mais aussi par la constatation d’une synthèse locale d’immunoglobulines (Ig) dans le LCR de la majorité des patients atteints de SEP. Cette synthèse locale d’Ig est démontrée par la présence de bandes oligoclonales d’Ig surnuméraires dans le LCR (BOC) chez 85 à 90% des patients.⁷⁶ Cependant, la présence de BOC ne permet qu’une appréciation qualitative de cette activité LB et les études histologiques montrent que le taux de LB méningés est particulièrement élevé chez les patients SEP, y compris lorsque ces derniers sont comparés à d’autres patients ayant des maladies inflammatoires neurologiques.⁴⁷ Ainsi, la quantification de cette activité LB méningée, pourrait être un outil diagnostique intéressant.

Figure 2. Histologie des lésions de démyélinisation dans la SEP



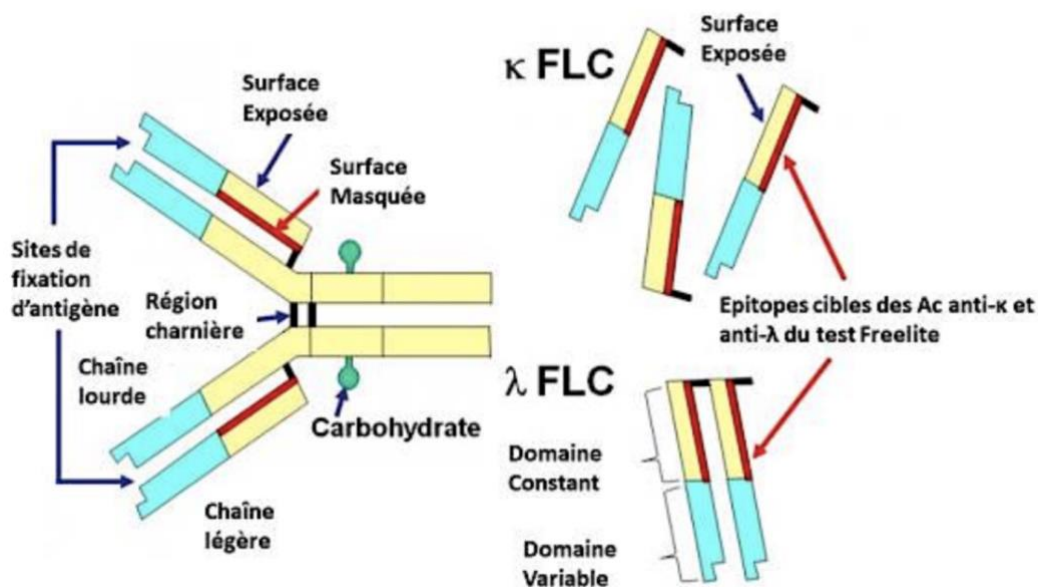
Légende : L’encadré rouge montre l’analyse histologique de la lésion avec coloration des lymphocytes T (CD3+) en brun et des lymphocytes B (CD20+) en bleu. Il existe un infiltrat massif des lésions par les lymphocytes T, et dans une moindre mesure par les lymphocytes B, qui sont de disposition péri-vasculaire. La comparaison du nombre de LT et LB intra-lésionnels est plus élevée chez les patients SEP que les patients avec d’autres maladies du SNC et les contrôles.⁴⁷

I.4. Les chaînes légères libres

Une immunoglobuline entière est constituée de deux chaînes lourdes (IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE) et de deux chaînes légères (kappa ou lambda) identiques, comportant une région variable et une région constante (**Figure 3**). Les chaînes lourdes et légères des Ig entières sont synthétisées de façon asynchrone et assemblées dans les LB avec une production de chaînes légères 10 à 40% supérieure à celle des chaînes lourdes.⁷⁷ Cet excès de production est excrétée sous forme libre (CLL) dans les liquides biologiques par les plasmocytes.⁷⁸ La concentration des CLL ne dépend que de 2 variables, la quantité produite par les LB activés et de la clairance rénale. Ainsi, en l'absence d'insuffisance rénale, leur quantification constitue un reflet indirect de la synthèse d'Ig par les LB.

Le dosage de CLL est disponible depuis 2001⁷⁹ et a d'abord été utilisé en hématologie pour les pathologies plasmocytaires clonales (myélome multiple) et l'amylose AL.^{80,81} Leur dosage se fait grâce à l'utilisation d'anticorps polyclonaux conjugués à des particules de latex, réagissant avec des épitopes cryptiques des chaînes légères, accessibles uniquement lorsque celles-ci sont sous forme libre, réduisant le risque de réactivité croisée avec les chaînes légères liées aux chaînes lourdes. Leur dosage est automatisé, utilisant des techniques de néphélométrie ou turbidimétrie permettant un rendu de résultat en 30mn. Cette technique a donc supplanté les techniques d'électrophorèse et d'immunofixation puisque plus économique, rapide, et permettant une mesure quantitative de la synthèse d'Ig.

Figure 3. Schéma montrant la constitution d'une immunoglobuline entière et sites de fixation des antisera



Légende : FLC : Chaîne légère libre⁸⁷

Dans la SEP, la production en excès de CLL dans le LCR est connue depuis les années 1980, démontrée par des méthodes qualitatives.⁸² Ce n'est que depuis quelques années que la communauté scientifique et médicale s'intéresse à la quantification des CLL dans le LCR. Plusieurs techniques ont été proposées pour prouver la présence d'une synthèse intrathécale de CLL : (i) utiliser la concentration brute de CLL dans le LCR, (ii) le calcul du quotient de CLL qui consiste à pondérer la concentration de CLL du LCR par celle du sérum, (iii) le calcul d'un index de CLL visant à pondérer le quotient de CLL par le quotient albumine ce qui permet de tenir compte du transsudat naturel des CLL à travers la barrière hémato-méningée.

En 2019, l'équipe d'Hansotto Reiber, suite à l'étude du sérum et du LCR de 400 sujets sains, a introduit la notion que la variation du quotient de CLL en fonction du quotient albumine se faisait de manière non linéaire (modèle hyperbolique, **figure 4**). Ce résultat laissait suggérer que, pour des valeurs élevées de quotient albumine, la valeur de l'index kappa serait sous-estimée.⁸³ En modélisant la courbe qu'il a obtenu, il a pu établir un modèle mathématique évaluant la valeur maximale théorique du quotient de CLL des sujets sains ($Q_{CLL} (lim)$) pour chaque valeur de quotient albumine. Ainsi, il suggère qu'une synthèse intrathécale de CLL ne peut être prouvée que si le quotient de CLL d'un patient est supérieur au quotient de CLL maximal théorique des sujets sains ($Q_{CLL} patient > Q_{CLL} (lim)$) (**Figure 4**). A partir de là, l'excès de CLL dans LCR est quantifiable par le calcul de la fraction intrathécale (FI) de CLL via la formule :

FI CLL (%) = [CLL (loc) / CLL LCR (mg/L)] x 100 avec

CLL (loc) = [$Q_{CLL} / Q_{CLL} (lim)$] x CLL sérum (mg/L), avec

$Q_{CLL} kappa (lim) = 3.27 (Quotient Albumine^2 + 33)^{0.5} - 8.2 (10^{-3})$

I.5. Objectifs de la thèse

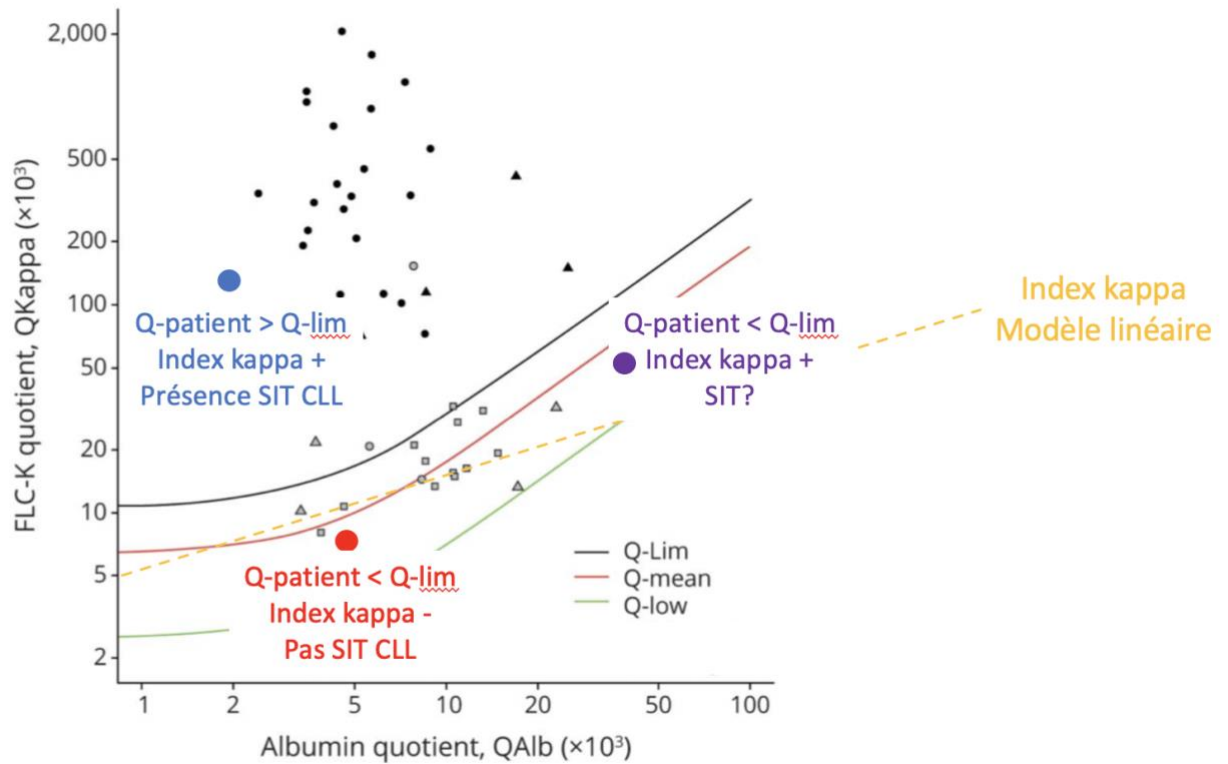
Compte tenu des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le déclenchement de la SEP, et du rôle important de diverses cytokines pro-inflammatoires et des lymphocytes B activés méningés, nous avons émis l'hypothèse que certains biomarqueurs immunologiques permettraient d'aider à la réflexion diagnostique et pronostique chez les patients suspects de SEP. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons mené 3 études successives (dont les articles sont fournis en annexe) dont les objectifs étaient les suivants :

Le premier objectif de cette thèse était d'évaluer la capacité de différents biomarqueurs à identifier, au sein d'une cohorte de patient adressés pour un bilan d'hypersignaux de la substance blanche, les patients SEP. Les biomarqueurs à l'étude étaient :

- un panel de 4 cytokines intrathécales impliquées dans divers mécanismes inflammatoires et dont leur concentration est connue pour être élevée dans certains pathologies inflammatoires qui peuvent mimer la SEP, tant sur le plan clinique que radiologique (i.e. Neuromyérite optique, maladie du spectre des anti-MOG, sarcoidose ou encore maladie de Behçet). Les cytokines étudiées sont l'IL-1 β ,⁵⁵ le récepteur soluble de l'IL-2 (sIL-2R),⁵²⁻⁵⁴ l'IL-6,^{57,59,84-86} et l'IL-10.^{62,63,65}
- les CLL kappa et lambda sériques et intrathécales.

Ce premier travail ayant permis d'identifier que les CLL kappa était le principal biomarqueur d'intérêt, le deuxième objectif de la thèse était d'évaluer la capacité des CLL kappa à identifier les patients SEP à grande échelle via une étude de cohorte multicentrique. Enfin, le troisième objectif était d'évaluer la capacité des CLL kappa à prédire l'évolution clinique et radiologique des patients présentant un premier événement démyélinisant clinique ou un syndrome radiologique isolé (tous deux étant des phases précoces de la SEP).

Figure 4. Schématisation de la modélisation d'une synthèse locale de CLL selon Reiber (modèle hyperbolique)



Légende : Les courbes verte et noire représentent les limites inférieure et supérieure de la variation normale (sujets sains) du quotient de CLL kappa en fonction du quotient albumine. La ligne orange en pointillé schématise la valeur de l'index kappa (valeur constante, modèle linéaire). Le point bleu représente la valeur d'un quotient de CLL d'un patient. Ce dernier est au-dessus de la courbe noire (Q-lim) ce qui signifie que ce patient présente une synthèse locale de CLL. A l'inverse, le point rouge représente le quotient de CLL d'un patient qui se situe en dessous de la courbe noire. Ce patient n'a pas de synthèse locale de CLL. Le point violet correspond à la situation où le patient ne présente pas de synthèse locale de CLL selon le modèle de Reiber mais un index de CLL positif (suggérant l'existence d'une synthèse locale de CLL).⁸³

II. Identification d'un biomarqueur immunologique d'intérêt

II.1. Constitution de la cohorte CyBIRD : méthodologie

Pour répondre au premier objectif, nous avons constitué une cohorte prospective et monocentrique de patients adressés au Centre de Ressource et Compétence – Sclérose En Plaques (CRC-SEP) du Centre Hospitalier Universitaire de Nice (CHUN), à partir du 01/06/2020 : la cohorte CyBIRD (Cytokines and Brain Inflammatory Related Disorders) enregistrée selon l'identifiant NCT05056740 dans ClinicalTrials.gov.

II.1.a Critères d'inclusion et d'exclusion dans la cohorte CyBIRD

Tout patient âgé de 18 ans ou plus, adressé au CRC-SEP du CHUN pour la réalisation d'un bilan standardisé d'hypersignaux de la substance blanche était inclus, indépendamment de leurs caractéristiques cliniques ou radiologiques.

Étaient exclus, les patients qui :

- Ne présentaient pas d'hypersignaux de la substance blanche sur les séquences T2 – FLAIR de l'IRM cérébrale.
- Refusaient ou avaient une contre-indication à la réalisation de la ponction lombaire (i.e. traitement anticoagulant en cours ou trouble de l'hémostase)
- Refusaient la réalisation du bilan sanguin

II.1.b Dosages des biomarqueurs à l'étude

Après information claire, loyale et appropriée ainsi que l'obtention de la non-opposition à la recherche selon la réglementation en vigueur, les patients étaient inclus dans la cohorte CyBIRD. La note d'information en rapport avec l'étude a

été intégrée au manuscrit en annexe. Chaque patient inclus bénéficiait dans le cadre du soin courant d'un bilan biologique et d'une ponction lombaire avec analyses immunologiques (i.e. détermination des facteurs anti-nucléaires ou recherche de bandes oligoclonales surnuméraires dans le LCR).

Sur les tubes envoyés au laboratoire d'immunologie du CHUN, le dosage des biomarqueurs à l'étude étaient réalisés sur les reliquats de matériel biologique de soin courant en utilisant :

- 25 µL de sérum et de LCR pour le dosage des 4 cytokines.
- 300 µL de sérum et de LCR pour le dosage des CLL kappa et lambda.

Le transport des tubes du CRC-SEP au laboratoire d'immunologie du CHUN se faisait par transport interne et les échantillons étaient reçus au laboratoire dans les 2 heures suivant le prélèvement. A l'arrivée des tubes au laboratoire :

- la quantification des CLL sériques et du LCR était réalisée sur prélèvement frais, après centrifugation, par turbidimétrie, grâce à l'antisérum spécifique d'épitope Freelite® (The Binding Site, Birmingham, UK), sur la machine Optilite® (The Binding Site, Birmingham, UK). Le dosage de l'albumine sérique et du LCR était également quantifiée sur le même automate dans le cadre du soin courant.

- le matériel destiné au dosage des cytokines était congelé à -80°C dès son arrivée au laboratoire. Une fois que les échantillons de 15 patients étaient recueillis (plaque 16 puits, 15 puits patients, 1 puit contrôle), ils étaient décongelés juste avant l'analyse. La quantification des 4 cytokines d'intérêt IL-1β, sIL-2R, l'IL-6, et l'IL-10 était réalisé par technique ELISA microfluidique nécessitant un mélange de 25 µL d'échantillon homogénéisé et de Buffer dans

des cartouches Ella (ProteinSimple, Santa Clara, CA, USA) désignées pour la détection des cytokines à l'étude.

La limite de détection basse des automates des différents biomarqueurs à l'étude étaient les suivantes :

- 0,33 mg/L pour les CLL kappa.
- 0,74 mg/L pour les CLL lambda
- 0,32 pg/mL pour l'IL-1 β
- 6,56 pg/mL pour le sIL-2R
- 0,50 pg/mL pour l'IL-6
- 1,16 pg/mL pour l'IL-10

II.1.c Quantification d'une synthèse intrathécale de chaînes légères libres

Une fois le dosage des chaînes légères libres et de l'albumine réalisé, une estimation de la synthèse intrathécale de CLL était établie via les calcul de l'index de CLL (modèle linéaire) et de la fraction intrathécale (FI) de CLL (modèle hyperbolique, via les formules suivantes^{83,88} :

Index (CLL) = Quotient CLL / Quotient albumine avec

Quotient CLL = [CLL LCR (mg/L) / CLL sérum (mg/L)] et

Quotient Albumine = [Albumine LCR (mg/L) / CLL sérum (mg/L)]

FI CLL (%) = [CLL (loc) / CLL LCR (mg/L)] x 100 avec

CLL (loc) = [Quotient CLL / Quotient (lim) CLL] x CLL sérum (mg/L), avec

Quotient (lim) CLL kappa = $3.27 (\text{Quotient Albumine}^2 + 33)^{0.5} - 8.2 (10^{-3})$ et

Quotient (lim) CLL lambda = $3.1276 (\text{Quotient Albumine})^{0.8650}$

II.1.d Analyse statistique de la cohorte CyBIRD

Nous avons analysé les données des patients inclus dans la cohorte CyBIRD la première année pendant la première année de thèse, du 01/06/2020 au 01/06/2021. Les variables continues étaient exprimées par leurs médianes et valeurs interquartiles (IQR) et les variables catégoriques par leurs valeurs et pourcentages.

Les patients étaient séparés en 3 groupes selon leur diagnostic : (i) un groupe SEP comprenant les patients dont les caractéristiques cliniques, biologiques, et radiologiques correspondaient au diagnostic de SEP selon les critères McDonald 2017,²⁰ de syndrome radiologique isolé (SRI) selon les critères 2009,³ ou de SCI (syndrome cliniquement isolé) en cas d'événement clinique démyélinisant typique de SEP mais ne remplissant pas les critères Mc Donald 2017; (ii) un groupe CI (Contrôle Inflammatoire) comprenant les patients dont les caractéristiques correspondaient à une pathologie inflammatoire du SNC mais ne pouvant être classée dans le groupe SEP ; (iii) un groupe CNI (Contrôle Non Inflammatoire) comprenant les patients dont les caractéristiques ne permettaient pas de retenir le diagnostic de maladie inflammatoire du SNC.

Les comparaisons de groupes étaient réalisées en utilisant des tests non-paramétriques : Le test de Mann-Whitney U ou le test Chi² pour la comparaison de 2 groupes, et le test de Kruskal-Wallis pour la comparaison de plus de 2 groupes. La capacité de prédire le diagnostic de SEP versus groupe contrôle de chaque biomarqueur (IL-1 β , sIL-2R, IL-6, IL-10, CLL kappa et CLL lambda) était évaluée par le calcul de l'aire sous la courbe ROC (AUC). La capacité de chaque biomarqueur à prédire le diagnostic de SEP était ensuite évalué par la

comparaison de leurs AUC respectives par la méthode de DeLong. La valeur de chaque biomarqueur permettant de prédire le diagnostic de SEP au mieux était obtenu en maximisant la valeur de l'index de Youden. Selon cette valeur, les patients étaient classés comme étant positif ou négatif pour ce biomarqueur (i.e si la valeur de l'index kappa qui permette de prédire le diagnostic de SEP au mieux est 1, alors les patients dont la valeur d'index kappa est >1 sont considérés positifs et les autres négatifs). A partir de là, le calcul de sensibilité, spécificité et valeurs prédictives positive ou négative de chaque biomarqueur était réalisé. Enfin, l'impact de certaines variables démographiques et cliniques sur la valeur de chaque biomarqueur était étudié en utilisant un modèle de régression linéaire. Pour toutes les analyses statistiques mentionnées, une valeur de $p < 0.05$ était considérée comme significative. Les analyses statistiques étaient réalisées via l'application EasyMedStat version 3.14 (easymedstat.com).

II.2. Résultats de cette première étude

Sur la première année, 217 patients ont été adressés au CRC-SEP pour un bilan d'hypersignaux de la substance blanche. Parmi ces patients, 41 ont été exclus. L'analyse de la cohorte CyBIRD a donc porté sur 176 patients, répartis de la manière suivante : 88 (50%) dans le groupe SEP dont 58 remplissaient les critères McDonald 2017, 8 les critères RIS 2009, et 22 les critères de SCI, 35 (20%) dans le groupe CI, et 53 (30%) dans le groupe CNI.

Les caractéristiques démographiques, cliniques, radiologiques et biologiques des groupes sont détaillées dans le **tableau 2** et les diagnostics retenus au sein de chaque groupe dans le **tableau 3**. Les patients SEP étaient plus jeunes que les patients CI ($p=.002$) et CNI ($p=.001$). Tous les patients SEP à l'exception des patients RIS ($n=80$ (91%)), 22 (63%) patients CI et aucun patient CNI ont présenté

un événement clinique démyélinisant. La proportion de patients exposés à un traitement immuno-actif (corticoïdes, immunomodulateur, immunosuppresseur) au moment du recueil des échantillons était comparable entre chaque groupe. Les patients CI étaient symptomatiques depuis moins longtemps que les patients SEP (médiane de 1.3 vs 5.3 mois, $p < .001$) au moment du recueil.

Tableau 2. Caractéristiques démographiques, cliniques, radiologiques et biologiques de la cohorte CyBIRD

	Groupe SEP n=88	Groupe CI n=35	SEP vs. CI p-value	Groupe CNI n=53	SEP vs. CNI P-value
Age, médiane [IQR]	41.6 ± 13.0	50.7 ± 17.0	0.002	49.5 ± 13.5	0.001
Genre féminin, n (%)	67 (76)	19 (54)	0.028	43 (81)	0.535
Forme clinique, n (%)	80 (91)	22 (63)	< 0.001	0* (0)	<0.001
Névrite optique, n (%)	7 (8)	4 (11)		0 (0)	
Myélite, n (%)	41 (47)	8 (23)		0 (0)	
Fosse postérieure, n (%)	20 (23)	4 (11)		0 (0)	
Autre, n (%)	12 (13)	6 (16)		0 (0)	
Antécédent de maladie autoimmune, n (%)	14 (16)	6 (17)	1	16 (30)	0.056
Traitement immunoactif en cours, n (%)	8 (9)	5 (15)	0.349	6 (11)	0.773
Prise de gadolinium sur l'IRM initiale, n (%)	28 (33)	21 (60)	0.008	2 (4)	<0.001
Début des symptômes (mois), médiane [IQR]	5.3 [1.3 ;35.5]	1.3 [0.3 ;2.9]	<0.001	12.3 [3.8 ;19.5]	0.108
Protéïnorachie (g/L), médiane [IQR]	0.33 [0.27 ;0.40]	0.45 [0.31 ;0.94]	<0.001	0.33 [0.26 ;0.48]	0.667
Céllularité (n/μL), médiane [IQR]	2 [0 ;5]	2 [0 ;25]	<0.001	0 [0 ;1]	0.015
Quotient Albumine (%), médiane [IQR]	0.44 [0.33 ;0.58]	0.71 [0.51 ;1.45]	<0.001	0.47 [0.36 ;0.66]	0.308
Index IgG, médiane [IQR]	0.75 [0.61 ;0.99]	0.60 [0.50 ;0.71]	0.005	0.56 [0.50 ;0.61]	<0.001
CLL kappa sérique (mg/L), médiane [IQR]	13.8 [11.7 ;16.2]	15.0 [11.5 ;19.6]	0.017	13.7 [11.2 ;16.8]	0.258
Présence de BOC, n (%)	52 (60)	4 (11)	<0.001	1 (2)	<0.001

Légende : BOC : Bandes OligoClonales, CI : Contrôle Inflammatoire, CNI : Contrôle Non Inflammatoire, CLL : Chaînes légères libres, IgG : Immunoglobuline G, IQR : Interquartile, SEP : Sclérose En Plaques

Tableau 3. Diagnostics retenus au sein des groupes

	Groupe SEP n=88	Groupe CI n=35	Groupe CNI n=53
Diagnostics finaux	SEP n=58 (66) SCI n=22 (25) SRI n=8 (9)	MLT n=4 (11) NMO/MOG n=5 (14) Vascularite n=9 (26) Lymphome n=3 (9) Encéphalite AI n=2 (6) Infection n=2 (6) Sarcoidose n=2 (6) Autre n=8 (23)	Migraine n=13 (25) Leucopathie vasculaire n=21 (40) Neuropathie optique n=1 (2) Myélopathie carencielle n=3 (6) Atrophie cérébelleuse n=2 (4) Mécanique n=6 (11) Autre n=7 (13)

Légende : AI : AutoImmune, CI : Contrôle Inflammatoire, CNI : Contrôle Non Inflammatoire, MLT : Myélite Longitudinale Transverse (double séronégative), MOG : Maladie su spectre des anti-MOG, NMO : NeuroMyélite Optique, SEP : Sclérose En Plaques répondant aux critères McDonald 2017, SCI : Syndrome Clinique Isolé ne répondant pas aux critères McDonald 2017, SRI : Syndrome Radiologique Isolé répondant aux critères RIS 2009

II.2.a. Quantification des différents biomarqueurs à l'étude

II.2.a.1. Les chaînes légères libres kappa

Le taux médian des biomarqueurs de CLL kappa dans le LCR était supérieur dans le groupe SEP par rapport aux 2 groupes contrôles (**Figure 5**) :

- Le taux médian de CLL kappa dans le LCR était de 2.59 mg/L (IQR 9.18) dans le groupe SEP, 0.16 mg/L (IQR 0.06) dans le groupe CNI ($p < .001$), et 0.43 mg/L (IQR 1.03) dans le groupe CI ($p = .001$).

- Le taux médian d'index kappa était de 37.8 (IQR 132.1) dans le groupe SEP, 2.4 (IQR 1.8) dans le groupe CNI ($p < .001$), et 4.5 (IQR 7.4) dans le groupe CI ($p < .001$).

- Le taux médian de FI kappa était de 95.1% (IQR 22.1) dans le groupe SEP, 10.1% (IQR 38.1) dans le groupe CNI ($p < .001$), et 60.2 (IQR 67.0) dans le groupe CI ($p < .001$).

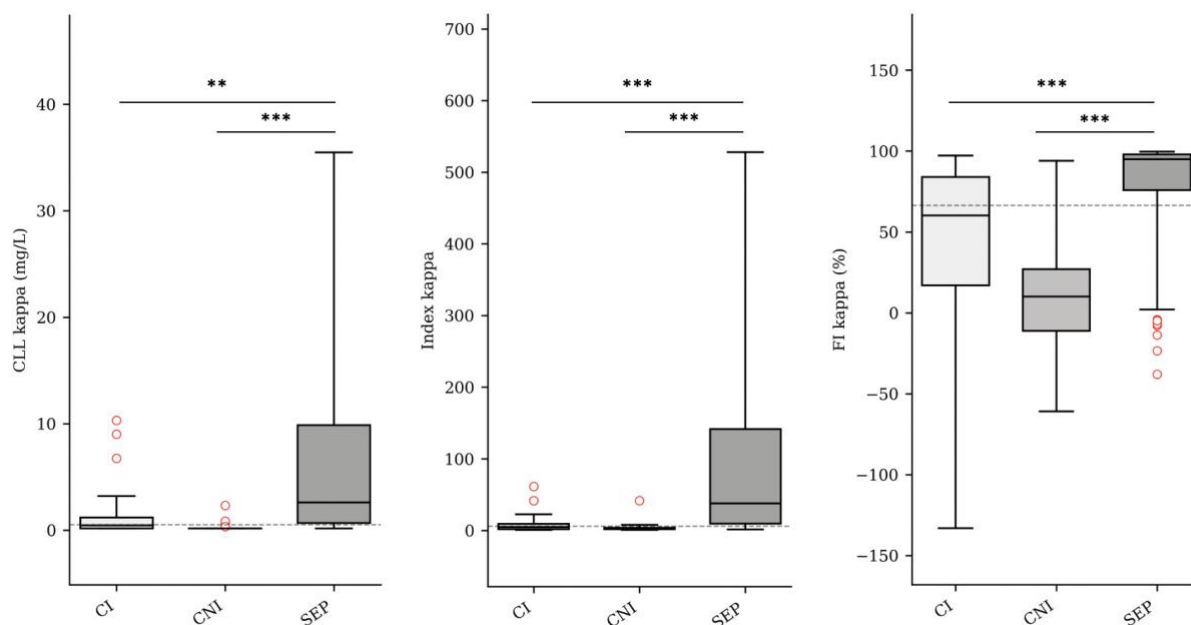
Au sein du groupe SEP, les patients qui remplissaient les critères McDonald 2017 et ceux qui remplissaient les critères RIS 2009 avaient des valeurs de biomarqueurs de CLL kappa supérieurs aux patients SCI (**Figure 6**) :

- Le taux médian de CLL kappa dans le LCR était de 3.80 mg/L (IQR 10.10) chez les patients SEP, 3.40 mg/L (IQR 11.2) chez les patients SRI ($p=0.403$), et 0.63 mg/L (IQR 1.64) chez les patients SCI ($p<.001$ pour les 2 comparaisons).

- Le taux médian d'index kappa était de 69.1 (IQR 161.2) chez les patients SEP, 48.5 (IQR 213.6) chez les patients SRI ($p=0.377$), et 14.2 (IQR 22.2) chez les patients SCI ($p<.001$ pour les 2 comparaisons).

- Le taux médian de FI kappa était de 96.6% (IQR 11.1) chez les patients SEP, 94.2% (IQR 73.9) chez les patients SRI ($p=0.320$), et 75.1% (IQR 87.2) chez les patients SCI ($p<.001$ pour les 2 comparaisons).

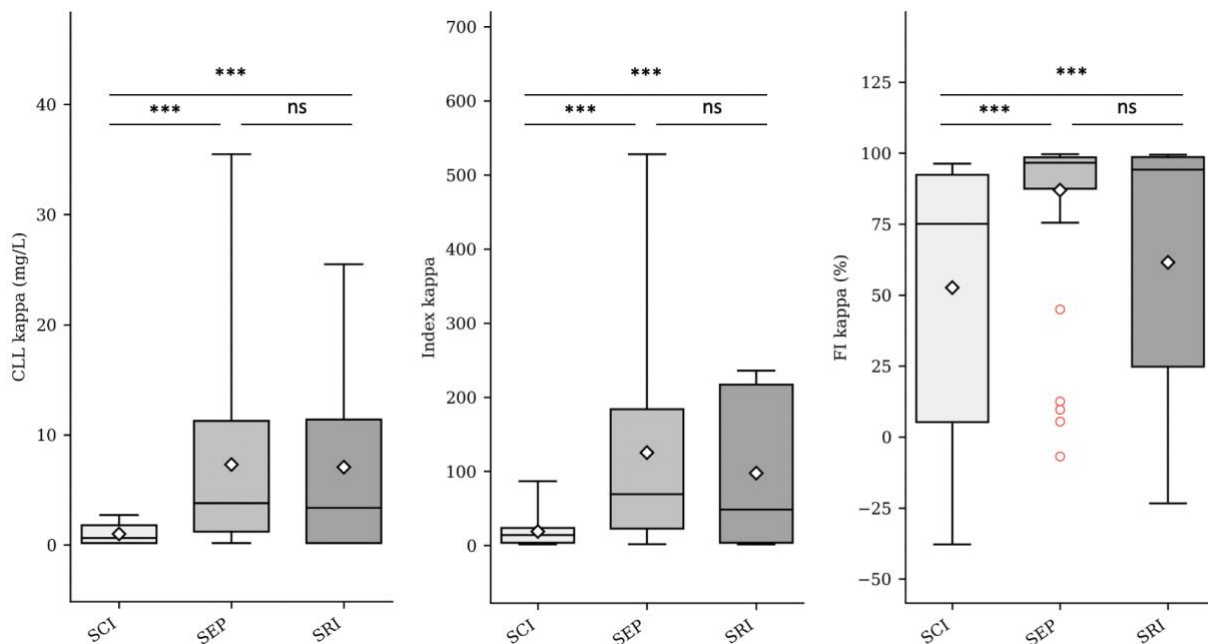
Figure 5. Quantification des biomarqueurs de chaînes légères libres kappa et leur comparaison entre les groupes



Légende : CLL : Chaînes légères libres, CI : Contrôle Inflammatoire, CNI : Contrôle Non Inflammatoire, FI : Fraction Intrathécale, SEP : Sclérose En Plaques.

* signifie p-value < 0.05, ** signifie p-value < 0.01, *** signifie p-value < 0.001.

Figure 6. Quantification des biomarqueurs de chaînes légères libres kappa et leur comparaison au sein du groupe SEP



Légende : CLL : Chaînes légères libres, FI : Fraction Intrathécale, SCI : Syndrome Clinique Isolé, SEP : Sclérose En Plaques, SRI : Syndrome Radiologique Isolé

* signifie p-value < 0.05, ** signifie p-value < 0.01, *** signifie p-value < 0.001.

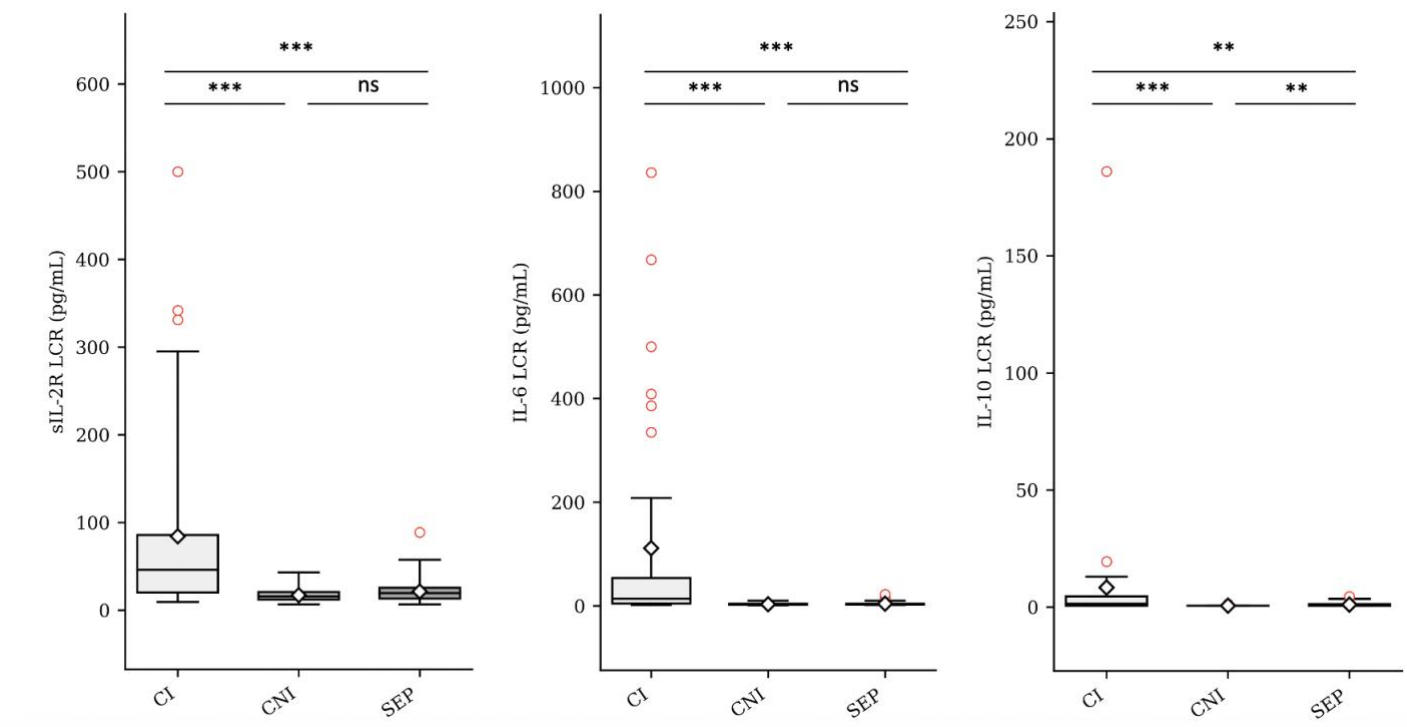
II.2.a.2. Les cytokines intrathécales

Le taux d'IL-1 β et d'IL-10 dans le LCR était en dessous de la limite de détection basse de l'automate chez 68 et 67% des patients, respectivement. Les valeurs médianes d'IL-1 β dans le LCR était de 0.16 pg/mL dans chaque groupe. La valeur médiane d'IL-10 était supérieure dans le groupe CI (1.4 pg/mL (IQR 4.0)) par rapport aux groupes SEP (0.6 pg/mL (IQR 0.7)) et CNI (0.6 pg/mL (IQR 0.1)), p<.001 et p=.002 respectivement.

Le taux médian de sIL-2R (**Figure 7**) était supérieur dans le groupe CI (45.9 pg/mL (IQR 65.8)) par rapport à celui des groupes SEP (19.4 pg/mL (IQR 12.1)) et CNI (15.7 pg/mL (IQR 8.6)), p<.001 pour les 2 comparaisons.

Le taux médian d'IL-6 (**Figure 7**) était supérieur dans le groupe CI (13.6 pg/mL (IQR 48.9)) par rapport à celui des groupes SEP (3.0 pg/mL (IQR 1.7)) et CNI (2.7 pg/mL (IQR 2.1)), $p < .001$ pour les 2 comparaisons.

Figure 7. Quantification des cytokines intrathécales et leur comparaison entre les groupes



Légende : CI : Contrôle Inflammatoire, CNI : Contrôle Non Inflammatoire, IL-6 : Interleukine 6, IL-10 : Interleukine 10, LCR : Liquide Céphalo-Rachidien, sIL-2R : Récepteur soluble de l'interleukine 2, SEP : Sclérose En Plaques.

* signifie p -value < 0.05 , ** signifie p -value < 0.01 , *** signifie p -value < 0.001 .

II.2.b. Capacité de chaque biomarqueur à prédire le diagnostic de SEP

La capacité de chaque biomarqueur (à l'exception de l'IL-1 β , dont les données n'étaient pas exploitables) à identifier le groupe SEP a été évalué par courbes ROC, dans 2 situations : capacité à séparer le groupe SEP du groupe CI, et le groupe SEP du groupe CNI. Le **tableau 4** résume les résultats des différentes courbes ROC et des valeurs seuils obtenues en maximisant l'index de Youden.

II.2.b. Capacité de chaque biomarqueur à prédire le diagnostic de SEP

La capacité de chaque biomarqueur (à l'exception de l'IL-1 β , dont les données n'étaient pas exploitables) à identifier le groupe SEP a été évalué par courbes ROC, dans 2 situations :

- capacité à séparer le groupe SEP du groupe CI
- capacité à séparer le groupe SEP du groupe CNI

Le **tableau 4** résume les résultats des différentes courbes ROC et des valeurs seuils obtenues en maximisant l'index de Youden.

Tableau 4. Capacité de chaque biomarqueur à identifier le groupe SEP comparé aux différents groupes contrôles

	SEP vs. CNI n=141			SEP vs. CI n=123		
	AUC (%)	95%IC	Valeur	AUC (%)	95%IC	Valeur
Index kappa	90.0	[84.9 ;95.2]	8.4	82.3	[74.6 ;90.0]	13.1
FI kappa	88.7	[83.0 ;94.3]	73.1	74.5 ^c	[65.2 ;83.8]	82.8
sIL-2R	59.6 ^b	[50.1 ;69.0]	21.5	77.0 ^d	[65.6 ;88.5]	41.5
IL-6	56.9 ^b	[46.7 ;67.1]	2.0	87.4 ^e	[79.8 ;95.0]	4.1
IL-10	62.7 ^b	[56.5 ;68.8]	1.2	68.0	[56.6 ;79.4]	2.4

Légende : CI : Contrôle Inflammatoire, CNI : Contrôle Non Inflammatoire, FI : Fraction Intrathécale, IC : Intervalle de Confiance, IL-6 : Interleukine 6, IL-10 : Interleukine 10, sIL-2R : Récepteur soluble de l'interleukine 2, SEP : Sclérose En Plaques.

L'index kappa (AUC = 0.90 [0.85 ;0.95]) et la FI kappa (AUC = 0.89 [83.0 ;94.3]) permettaient de séparer le groupe SEP du groupe CNI avec de bonnes performances. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative d'AUC entre l'index et la FI kappa ($p=0.404$). Les valeurs seuils d'index kappa et de FI kappa permettant de séparer au mieux les 2 groupes étaient 8.4 et 73% respectivement. En revanche, les performances des cytokines intrathécales étaient inférieures à celles des CLL kappa : sIL-2R (AUC = 0.60 [0.50 ;0.69]), IL-6 (AUC = 0.57 [0.47 ;0.67]), et IL-10 (AUC = 0.63 [0.57 ;0.69]), $p<.001$ pour toutes les comparaisons d'AUC entre cytokine et index ou FI kappa.

En revanche, l'IL-6 et le sIL-2R permettaient de séparer le groupe SEP du groupe CI avec de bonnes performances : AUC = 0.77 [0.66 ;0.89] pour le sIL-2R, et AUC = 0.87 [0.80 ;0.95] pour l'IL-6. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative d'AUC entre ces 2 cytokines ($p=0.119$). Les valeurs seuils du sIL-2R et de l'IL-6 permettant de séparer au mieux les 2 groupes étaient 41.5 pg/mL et 4.1 pg/mL respectivement. La capacité de l'IL-10 à séparer les groupes SEP et CI restait médiocre avec une AUC de 0.68 [0.57 ;0.79], inférieure à celle de l'IL-6 ($p=0.007$). Les CLL kappa gardaient de bonnes performances pour séparer le groupe SEP du groupe CI puisque l'AUC de l'index kappa était à 0.82 [74.6 ;90.0], statistiquement non différente de celles de l'IL-6 ($p=0.436$), et du sIL-2R ($p=0.358$). La valeur seuil d'index kappa pour séparer les groupes SEP et CI était 13.1, plus élevée que celle permettant de séparer le groupe SEP du groupe CNI.

II.2.c. Calcul des sensibilités et spécificités de chaque biomarqueur

Le calcul des performances diagnostiques (sensibilité, spécificité et valeurs prédictives) étaient déterminées à partir des valeurs seuils obtenues via l'index de Youden. Chaque patient était classé positif ou négatif pour chaque biomarqueur et pour les BOC.

II.2.c.1. Séparation des groupes SEP et CNI

Les performances des cytokines intrathécales pour différencier le groupe SEP du groupe CNI étant faible, leur analyse n'est pas détaillée dans cette thèse (information disponible en annexe, article 1).

Un index kappa positif (> 8.4) permettait de séparer le groupe SEP du groupe CNI avec plus de précision que la présence de BOC (0.82 vs. 0.74). Cela se traduisait par un gain de sensibilité (0.76 vs 0.59) avec, en contrepartie, une perte de spécificité (0.91 vs. 0.98) – **tableau 5**.

Tableau 5. Performances diagnostiques de l'index kappa et des BOC pour séparer les groupe SEP et CNI

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)	Précision (%)
BOC	59.1 [48.1 ;69.5]	98.1 [89.9 ;99.9]	98.1 [88.1 ;99.7]	59.1 [52.8 ;65.1]	73.8 [65.7 ;80.8]
Index kappa > 8.4	76.1 [65.9 ;84.6]	90.6 [79.3 ;96.9]	93.1 [85.2 ;96.9]	69.6 [60.9 ;77.0]	81.6 [74.2 ;87.6]

II.2.c.2. Séparation des groupes SEP et CI

Un index kappa positif (> 13.1), un taux de sIL-2R négatif, et un taux d'IL-6 négatif, permettaient de séparer les groupes SEP et CI avec plus de précision (0.74, 0.85, et 0.78 respectivement) que la présence de BOC (0.67). La présence de BOC et un taux bas d'IL-6 étaient les 2 variables permettant de séparer les 2 groupes avec le plus de spécificité (0.88), alors qu'un taux bas de sIL-2R était le biomarqueur le plus sensible (0.96). L'association de différents biomarqueurs (i.e. index kappa positif et taux d'IL-6 bas) permettait d'accroître la spécificité pour le diagnostic de SEP, mais au prix d'une moins bonne précision diagnostique. Tous les résultats figurent dans le **tableau 6**.

Tableau 6. Performances diagnostiques de l'index kappa, du sIL-2R, et de l'IL-6 pour séparer les groupe SEP et CI

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)	Précision (%)
BOC	59.1 [48.1 ;69.5]	87.9 [71.8 ;96.6]	92.9 [83.6 ;97.1]	44.6 [37.8 ;51.6]	66.9 [57.8 ;75.2]
Index kappa > 13.1	72.7 [62.2 ;81.7]	75.8 [57.7 ;88.9]	88.9 [81.2 ;93.7]	51.0 [41.3 ;60.7]	73.6 [64.8 ;81.2]
sIL-2R < 41.5	95.5 [88.8 ;98.7]	57.6 [39.2 ;74.5]	85.7 [80.1 ;90.0]	82.6 [63.6 ;92.8]	85.1 [77.5 ;90.9]
IL-6 < 4.1	73.9 [63.4 ;82.7]	87.9 [71.8 ;96.6]	94.2 [86.5 ;97.6]	55.8 [46.5 ;64.7]	77.7 [69.2 ;84.8]
sIL-2R < 41.5 & IL-6 < 4.1	71.6 [61.0 ;80.7]	93.9 [79.8 ;99.3]	96.9 [89.1 ;99.2]	55.4 [46.8 ;63.6]	77.7 [69.2 ;84.8]
Index kappa > 13.1 & sIL-2R < 41.5 & IL-6 < 4.1	52.3 [41.4 ;63.0]	100.0 [89.4 ;100.0]	100.0 [-]	44.0 [38.7 ;49.4]	65.3 [56.1 ;73.7]

Légende : BOC : Bandes oligoclonales, VPP : Valeur prédictive positive, VPN : Valeur prédictive négative

II.2.d. Évaluation des facteurs influençant les CLL kappa, sIL-2R et IL-6

Afin de s'assurer que nos résultats soient robustes, nous avons évalué si certaines variables démographiques ou cliniques pouvaient indépendamment modifier la valeur du taux de CLL kappa, sIL-2R, et IL-6 dans le LCR.

Pour cela, un modèle multivarié de régression linéaire incluant l'âge, le sexe, la durée entre les symptômes et le recueil des échantillons, la présence d'un traitement immunoactif au recueil, et le groupe diagnostic, a été réalisé pour chacun des 3 biomarqueurs. Les résultats des modèles sont résumés dans le **tableau 7**.

Tableau 7. Variables démographiques et cliniques pouvant indépendamment influencer les valeurs d'index kappa, de sIL-2R et d'IL-6

	CLL kappa LCR n=176		sIL-2R LCR n=176		IL-6 LCR n=176	
	Coefficient β [IQR]	p-value	Coefficient β [IQR]	p-value	Coefficient β [IQR]	p-value
Age (années) <i>Risque pour chaque augmentation de 1</i>	0.024 [-0.035 ;0.083]	0.423	0.316 [-0.625 ;1.260]	0.508	-0.071 [-1.100 ;0.953]	0.891
Sexe <i>Reference: femme</i>	0.24 [-2.07 ;2.54]	0.840	-7.76 [-34.23 ;18.72]	0.564	40.53 [-3.61 ;84.66]	0.072
Durée de la maladie (mois) <i>Risque pour chaque augmentation de 1</i>	-0.04 [-0.08 ;0.01]	0.093	-0.20 [-0.48 ;0.08]	0.163	-0.42 [-0.97 ;0.12]	0.126
Traitement immunoactif <i>Reference: oui</i>	0.11 [-1.71 ;1.92]	0.906	11.52 [-24.59 ;47.63]	0.530	45.32 [-26.6 ;117.23]	0.215
Groupe diagnostic <i>Reference : SEP</i>						
CNI	-5.53 [-7.53 ;-3.54]	<0.001	-7.24 [-17.04 ;2.55]	0.146	-0.823 [-13.23 ;11.59]	0.896
CI	-4.82 [-7.66 ;-1.98]	0.001	60.55 [10.58 ;110.52]	0.018	93.56 [33.29 ;153.83]	0.003

Légende : CI : Contrôle Inflammatoire, CLL : Chaînes légères libres, CNI : Contrôle Non Inflammatoire, IL-6 : Interleukine 6, IQR : Interquartile range, LCR : Liquide Céphalo-Rachidien, SEP : Sclérose En Plaques, sIL-2R : Récepteur soluble de l'interleukine 2

Ni l'âge, ni le sexe, ni le temps entre les premiers symptômes et le recueil, ni la prise de traitement immunoactif au recueil ne semblait influencer les valeurs de CLL kappa, sIL-2R, et IL-6 dans le LCR. La seule variable associée à une élévation du taux de CLL kappa dans le LCR est le diagnostic de SEP ($p < .001$), et la seule variable associée à une élévation du taux de sIL-2R et du taux d'IL-6 dans le LCR est le diagnostic d'une maladie inflammatoire non SEP ($p = 0.018$ et $p = 0.003$ respectivement).

II.3. Discussion de cette première étude

Ce premier travail, bien que monocentrique, a été réalisé prospectivement sur un nombre non négligeable de patients adressés pour un bilan d'hypersignaux de la substance blanche. Nos résultats suggèrent que l'élévation des CLL kappa (via le calcul de l'index et de la fraction intrathécale) favorise le diagnostic de SEP avec une bonne sensibilité et spécificité, quelle que soit la population contrôle choisie. De plus, il semblerait que l'index kappa ait des performances diagnostiques légèrement supérieures à celle des BOC (précision diagnostique de 82% vs 74% pour séparer les groupes SEP et CNI, et 74% vs 67% pour séparer les groupes SEP et CI), tout en apportant une quantification de l'activité lymphocytaire B dans le LCR, ce que les BOC ne permettent pas de faire. Dans cette étude, les performances diagnostiques de CLL kappa ont pu être sous-estimées puisque le groupe SEP comprenait 25% de patients avec un SCI, dont l'évolution clinico-radiologique n'était pas connue. D'ailleurs, l'analyse en sous-groupe montrait que les patients SCI avaient, en médiane, une valeur de CLL kappa inférieure aux patients SEP et SRI. Cet élément a contribué à la réalisation du second à travail, visant à évaluer à grande échelle, les performances diagnostiques des CLL kappa versus BOC chez les patients SEP remplissant les

critères McDonald 2017. Ce travail constitue la seconde partie de cette thèse, détaillée dans le chapitre III.

Enfin, nos résultats suggèrent que les taux d'IL-1 β , de sIL-2R, d'IL-6, et d'IL-10 dans le LCR ne permettent de pas de favoriser le diagnostic de SEP. Des taux bas de chaque cytokine était noté chez la plupart des patients des groupes SEP et CNI. En revanche, l'élévation dans le LCR du sIL-2R et/ou de l'IL-6 semble constituer un drapeau rouge au diagnostic de SEP, puisque favoriserait un diagnostic de maladie inflammatoire du SNC non SEP (i.e. MOGAD, NMO, autre... etc). Compte tenu de l'hétérogénéité du groupe CI, il ne nous a pas été possible d'identifier des sous-groupes de patients pour lesquels ces cytokines auraient un intérêt diagnostique. En revanche, la littérature semble indiquer que le taux d'IL-6 dans le LCR aurait un intérêt chez les patients ayant des neuromyérites optiques (NMO),^{50,85,89} ou des maladies du spectre des anticorps anti-MOG (MOGAD)^{84,86} – et le taux de sIL-2R dans le LCR dans les maladies granulomateuses touchant le SNC⁵²⁻⁵⁴ ou le lymphome cérébral.⁶² Dans cette cohorte, un taux de sIL-2R dans le LCR > 41.5 pg/mL, était la variable ayant la valeur prédictive positive la plus élevée pour le diagnostic de maladie inflammatoire non SEP.

Nos résultats sont cohérents avec les données publiées jusqu'en 2021 (date à laquelle ce travail s'est terminé). En effet, plusieurs études, américaines et européennes⁹⁰⁻⁹³ ont montré la capacité des CLL kappa à diagnostiquer les patients SEP, en les comparant à diverses populations contrôles. L'étude américaine,⁹⁴ a montré qu'un taux de CLL kappa LCR > 0.1 mg/L permettait de séparer les patients SEP d'une population hétérogène de patients contrôles, après validation sur une cohorte prospective indépendante, avec une sensibilité de 79% et une spécificité de 87%, similaire à celle des BOC. Malheureusement,

l'estimation d'une synthèse intrathécale de CLL kappa, via le calcul de l'index kappa ou de la FI kappa, n'a été évaluée dans cette étude.⁹⁴ La plus large étude européenne⁹³ a montré sur une série rétrospective de 745 patients, que la positivité de l'index kappa (basé sur une valeur seuil de 6.6) permettait de séparer les patients SCI/SEP des patients contrôles avec une sensibilité de 88%, et une spécificité de 83%. Comparativement aux BOC (sensibilité de 82% et spécificité de 92%), la positivité de l'index kappa était plus sensible mais moins spécifique que la présence de BOC.

Toutes ces études tendent à confirmer l'intérêt à l'utilisation des CLL kappa dans la démarche diagnostique face à des patients suspects de SEP. En revanche, aucune étude n'a comparé l'efficacité des différentes mesures de synthèse intrathécales de CLL kappa (faut-il utiliser l'index kappa ? la FI kappa ?), et il n'existe actuellement aucun seuil consensuel qui permette d'établir la présence d'une synthèse spécifique de CLL kappa.

Ce travail (disponible à la fin de la thèse, Annexe 2) a été publié dans le journal *Frontiers in Immunology* (Rang B, IF 8.7).

Points clés de la première étude

- Dans un bilan d'hypersignaux de la substance blanche, un index kappa positif favorise le diagnostic de SEP avec une bonne sensibilité et spécificité
- Dans cette indication, l'index kappa semble avoir de meilleures performances diagnostiques que les BOC
- Une élévation des concentrations d'IL-6 et/ou de sIL-2R dans le LCR est en faveur du diagnostic de maladie inflammatoire du SNC non SEP
- Une concentration normale d'IL-6 et/ou de sIL-2R dans le LCR, n'est pas en faveur du diagnostic de SEP

III. Évaluation des différentes mesures de chaînes légères libres pour le diagnostic de SEP

En l'absence de données claires sur l'outil à utiliser en pratique clinique pour estimer une synthèse intrathécale de CLL kappa, et en l'absence de seuil consensuel permettant d'estimer la présence de cette dernière, nous avons mené un travail rétrospectif multicentrique français tentant de répondre à ces 2 questions.

Grâce à la Société Francophone de la Sclérose En Plaques (SFSEP), un appel à observation a été lancé auprès des CRC-SEP français ayant des données sur la quantification des CLL kappa dans les maladies neurologiques centrales.

L'objectif principal de cette seconde étude était de comparer la capacité diagnostique de différents outils mesurant l'activité lymphocytaire B intrathécale, et de les comparer : le taux de CLL kappa et lambda, le taux d'index kappa et lambda, la FI de CLL kappa et lambda, et les BOC.

III.1. Méthodologie de cette étude SFSEP nationale multicentrique

III.1.a. Population de l'étude

Tout patient majeur, ayant bénéficié d'un bilan diagnostique de soin courant pour une suspicion de maladie du SNC (inflammatoire ou non), et ayant eu une quantification des CLL kappa et d'albumine dans le sérum et le LCR, ainsi que la recherche de BOC par technique d'iso-focalisation était éligible à l'étude.

Les patients éligibles qui avaient (i) une maladie neurologique périphérique isolée, (ii) une maladie infectieuse ou (iii) une maladie tumorale du SNC étaient exclus dans le but de constituer une cohorte de patients contrôles

inflammatoires n'incluant que des patients avec une pathologies auto-immune du SNC.

Les patients éligibles qui avaient (i) une maladie rénale chronique sévère (débit de filtration glomérulaire < 30 ml/mn) ou (ii) une gammopathie monoclonale à l'iso-focalisation étaient également exclus pour favoriser l'interprétation d'une élévation de CLL.

Une fois inclus, les patients étaient séparés en 2 groupes : un groupe SCI/SEP et un groupe contrôle. Des sous-groupes étaient constituer pour diverses analyses statistiques : le groupe SCI/SEP regroupait les sous-groupes SCI et SEP, et le groupe contrôle regroupait les sous-groupes CI (Contrôles Inflammatoires) et CNI (Contrôles Non Inflammatoires). Pour être inclus dans le groupe SEP, les patients devaient remplir les critères diagnostics McDonald 2017.²³

L'étude a reçu l'approbation du CHUN et a été enregistrée sur ClinicalTrials.gov sous le numéro NCT05088473.

III.1.b Données collectées auprès des CRC-SEP

Pour être inclus, chaque dossier devait comporter :

- les données démographiques suivantes : âge et sexe
- les données cliniques suivantes : le diagnostic et la présence d'un traitement immuno-actif (et son nom) dans les 30 jours précédant le recueil
- les données biologiques suivantes : le taux de CLL kappa et d'albumine dans le sérum et le LCR, la présence ou l'absence de BOC, l'automate et le kit utilisé pour doser les CLL et l'albumine, le type d'échantillon utilisé pour quantifier les CLL (échantillon frais ou décongelé), le taux de protéinorachie, d'index IgG et la cellularité du LCR.

Pour les patients du groupe SCI/SEP, l'activité de la maladie au recueil était demandée. Une maladie active correspondait, dans cette étude, à la présence de symptômes spécifiques et/ou d'une prise de contraste à l'IRM cérébrale injectée dans les 30 jours précédant le recueil. Enfin, le phénotype de SEP (i.e. récurrente, primaire ou secondairement progressive) et le type d'événement clinique démyélinisant ayant conduit au diagnostic de SEP étaient recueillis.

Enfin, les données sur la quantification des CLL lambda dans le sérum et le LCR étaient recueillies selon leur réalisation dans les différents centres participatifs.

III.1.c. Estimation d'une synthèse intrathécale de CLL

Une fois les données de CLL kappa (+/- lambda) recueillies, la synthèse spécifique de CLL était déterminée via différentes méthodes :

Le modèle linéaire calculant l'index kappa (+/-lambda) via la formule :

Index (CLL) = Quotient CLL / Quotient albumine avec

Quotient CLL = [CLL LCR (mg/L) / CLL sérum (mg/L)] et

Quotient Albumine = [Albumine LCR (mg/L) / CLL sérum (mg/L)]

Le modèle hyperbolique calculant la fraction intrathécale de CLL kappa (+/- lambda) via les formules^{83,88}:

FI CLL (%) = [CLL (loc) / CLL LCR (mg/L)] x 100 avec

CLL (loc) = [Quotient CLL / Quotient (lim) CLL] x CLL sérum (mg/L), avec

Quotient (lim) CLL kappa = $3.27 (\text{Quotient Albumine}^2 + 33)^{0.5} - 8.2 (10^{-3})$, et

Quotient (lim) CLL lambda = $3.1276 (\text{Quotient Albumine})^{0.8650}$

Lorsque les valeurs de CLL dans le LCR étaient inférieures au seuil de détection basse de l'automate, une valeur commune et arbitraire leur été attribuée. Cette valeur correspondait à la limite de détection de l'automate divisé par 2 (i.e. Si la limite de détection de l'automate était de 0.33 mg/L, la valeur attribuée aux échantillons infra-seuil était de 0.17 mg/L).

III.1.d. Analyse statistique de l'étude SFSEP

Les variables continues étaient exprimées par leurs moyennes et déviations standards (DS) ou leurs médianes et valeurs interquartiles (IQR) selon leur distribution. Les variables catégoriques étaient exprimées par leurs valeurs et pourcentages. La distribution des données était évaluée par le test de Shapiro-Wilk.

Les comparaisons de groupes étaient réalisées en utilisant les tests de Wilcoxon-Mann-Whitney ou le Student t-test selon la distribution des données. Pour la comparaison de 2 groupes, le test de Kruskal-Wallis était utilisé. La comparaison de variables catégoriques était faite via le test du Chi² ou le test de Fischer.

La capacité de chaque biomarqueur à prédire le diagnostic de SCI/SEP ou SEP était ensuite évalué par courbe ROC permettant de déterminer les aires sous la courbe (AUC) et leurs intervalles de confiance à 95% (95IC). La comparaison des AUC par la méthode de DeLong permettait de comparer la capacité diagnostique de chaque biomarqueur. La valeur de chaque biomarqueur permettant de prédire le diagnostic de SCI/SEP ou SEP au mieux était obtenu en maximisant la valeur de l'index de Youden. Selon cette valeur, les patients étaient classés comme étant positifs ou négatifs pour chaque biomarqueur ce qui permettait de calculer les sensibilité, spécificité et valeurs prédictives positive ou négative. Le test de McNemar permettait de comparer la sensibilité et spécificité de 2

biomarqueurs, et la comparaison des valeurs prédictives utilisait la méthode de Moskowitz et Pepe via le Package DTCompair (logiciel R).⁹⁵

Finalement, un modèle univarié de régression linéaire a été utilisé pour identifier les variables pouvant influencer la valeur de l'index kappa au sein du groupe SEP. Chaque variable associée à une variation de l'index kappa dans le modèle univarié et dont la valeur de $p < 0.2$, était implémentée dans un modèle multivarié. La sélection des variables dans le modèle multivarié se faisait pas-à-pas, en retirant à chaque implémentation de variable, la variable la moins significative ($p > .05$). A la fin, le modèle multivarié ne retenait que les variables indépendamment associée à la variation de l'index kappa dans le groupe SEP. Pour chaque analyse statistique, une valeur de $p < .05$ était considérée statistiquement significatif. Les comparaisons de sensibilité, spécificité et valeurs prédictives ont été réalisées en utilisant le logiciel R statistical software version 3.2.1 mix tools package (sesp.mcnemar fonction and pv.rpv fonction des R DTComPair packages). Les autres analyses statistiques étaient réalisées à partir de SAS version 9.4 (SAS Institute, Inc). Les figures étaient faites à partir de l'application EasyMedStat version 3.14 (easymedstat.com).

III.2. Résultats de cette deuxième étude

Treize CRC-SEP français ont participé à l'étude, en fournissant au total les dossiers de 1 917 patients. Après application des critères d'inclusion et d'exclusion, 1 621 patients ont été inclus dans l'analyse : 765 dans le groupe SCI/SEP (675 dans le sous-groupe SEP et 90 dans le sous-groupe SCI) et 856 dans le groupe Contrôle (559 dans le sous-groupe CNI et 297 dans le sous-groupe CI). La liste des centres participants et le nombre de dossiers communiqués par sous-groupe et par centre est résumé dans le **tableau 8**. Le taux de CLL lambda était

disponible chez 825 patients (338 dans le groupe SCI/SEP et 487 dans le groupe Contrôle). Les diagnostics finaux des patients sont résumés dans le **tableau 9**.

Tableau 8. Données concernant les patients inclus et les automates utilisés par chaque centre : étude SFSEP

Centre	Patients inclus (n= 1621)	Patients inclus Groupe SCI/SEP (n=765)	Patients inclus Sous-groupe CI (n=297)	Patients inclus Sous-groupe CNI (n=559)	Type d'échantillon utilisé pour la mesure des CLL	Type d'automate
Dijon	36	36	0	0	Décongelé	Optilite®
Grenoble	66	43	12	11	Décongelé	Optilite®
Lille	84	32	13	39	Décongelé	SPAplus®
Marseille	151	151	0	0	Frais	Optilite®
Montpellier	116	58	25	33	Décongelé	Optilite®
Nantes*	182	80	32	70	Décongelé	Optilite®
Nice*	556	205	122	229	Frais	Optilite®
Nîmes	168	23	27	118	Frais	Optilite®
Paris	27	15	11	1	Décongelé	Optilite®
Saint-Etienne*	73	27	13	33	Décongelé	BN Prospec®
Strasbourg	60	35	8	17	Frais	BNII®
Toulouse	81	39	34	8	Décongelé	Optilite®
Tours	21	21	0	0	Décongelé	SPAplus®

Légende : CI : Contrôle Inflammatoire, CLL : Chaînes Légères Libres, CNI : Contrôle Non Inflammatoire, SCI : Syndrome Cliniquement Isolé, SEP : Sclérose En Plaques. * Centres ayant fourni de données sur les valeurs de CLL lambda

Tableau 9. Diagnostics retenus de la cohorte SFSEP

Sous-groupe	Nombre de patients	Diagnostic
SEP	675	SEP-RR (n=591) ; SEP-SP (n=14) ; SEP-PP (n=69)
SCI	90	Myélite (n=39) ; Névrite optique (n=30) ; Symptômes infratentoriels (n=13) ; Autre (n=8)
CI	297	MOGAD (n=26) ; NMO (n=18) ; ADEM (n=10) ; myélite idiopathique (n=29) ; névrite optique idiopathique (n=29) ; sarcoïdose (n=17) ; vascularite SNC (n=21) ; syndrome de Sjögren (n=5) ; lupus (n=5) ; maladie de Behçet (n=5) ; MLT double séronégative (n=10) ; maladie démyélinisante atypique du SNC (n=17) ; encéphalite autoimmune (n=72) ; pachy/leptoméningite (n=7) ; méningite aseptique (n=10) ; syndrome de Tolosa-Hunt (n=4) ; syndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (n=3) ; CAARI (n=6) ; méningoencéphalomyélite à rechute (n=2) ; hypophysite (n=1)
CNI	559	Symptômes sans substratum organique (n=62) ; douleurs neuropathiques (n=41) ; migraine (n=53) ; Vertiges (n=11) ; démence (n=98) ; épilepsie (n=44) ; leucopathie vasculaire (n=69) ; neuropathie optique non inflammatoire (n=26) ; myélopathie non inflammatoire (n=18) ; encéphalopathie métabolique (n=9) ; SLA (n=20) ; syndrome cérébelleux (n=19) ; hypertension intracrânienne idiopathique (n=21) ; hydrocéphalie à pression normale (n=18) ; Autres maladies neurologiques non inflammatoires (n=50)

Légende : SEP-RR : Sclérose en plaques récurrente-rémittente, SEP-SP : Sclérose en plaques secondairement progressive, SEP-PP : Sclérose en plaques primaire progressive, MOGAD : Maladie du spectre des anticorps anti-MOG, NMO : Neuromyérite optique, ADEM : Encéphalomyélite aiguë disséminée, SNC : système nerveux central, MLT : Myélite longitudinale et transverse, CAARI : Angiopathie amyloïde cérébrale inflammatoire, SLA : Sclérose latérale amyotrophique.

Il n'y avait pas de différence d'âge, de sexe ratio, de prise de traitement immuno-actif au moment du recueil, de valeur médiane de protéinorachie, cellularité, quotient albumine, taux de CLL kappa et lambda dans le sérum entre les patients des sous-groupes SCI et SEP ($p > .05$ pour toutes les comparaisons). En revanche, le sous-groupe SEP présentait un taux médian d'index IgG plus élevé (0.82 vs 0.64, $p = .001$) et la présence BOC plus fréquemment (0.84 vs 0.63, $p < .001$) que le sous-groupe SCI. Les patients des sous-groupes CI et CNI n'étaient pas

comparable aux patient des groupes SEP et SCI. Toutes les caractéristiques de la cohorte sont détaillées dans le **tableau 10**.

Tableau 10. Caractéristiques cliniques et biologiques de base de la cohorte SFSEP en fonction des sous-groupes

	SEP (n=675)	SCI (n=90)	SEP vs SCI p-value	CI (n=297)	SEP vs CI p-value	CNI (n=559)	SEP vs CNI p-value
Age (années), médiane [Q1 ;Q3]	37 [29 ; 48]	37 [28 ;50]	0.873 ^a	46 [35 ;60]	<0.001^a	54 [39 ;69]	<0.001^a
Sexe (féminin), n (%)	481 (71)	68 (76)	0.455 ^b	169 (56.9)	<0.001^b	349 (62)	0.001^b
Traitement immune-actif, n (%)	57 (9.3)	4 (4.9)	0.217 ^b	45 (16.6)	0.003^b	23 (4.5)	0.002^b
Protéines LCR (g/L), médiane [Q1 ;Q3]	0.35 [0.28 ;0.46]	0.36 [0.28 ;0.41]	0.363 ^a	0.41 [0.29 ;0.54]	<0.001^a	0.36 [0.28 ;0.48]	0.012^a
Cellularité LCR (/mL), médiane [Q1 ;Q3]	2 [0 ;6]	1 [0 ;8]	0.667 ^a	3 [0 ;8]	<0.001^a	0 [0 ;1]	<0.001^a
Quotient albumine (%), médiane [Q1 ;Q3]	0.51 [0.37 ;0.69]	0.51 [0.36 ;0.62]	0.177 ^a	0.61 [0.44 ;0.88]	<0.001^a	0.54 [0.39 ;0.75]	0.001^a
Index IgG, médiane [Q1 ;Q3]	0.82 [0.62 ;1.25]	0.64 [0.60 ;0.87]	0.001^a	0.56 [0.48 ;0.66]	<0.001^a	0.52 [0.47 ;0.58]	<0.001^a
Présence de BOC, n (%)	570 (84.4)	57 (63.3)	<0.001^b	64 (21.6)	<0.001^b	19 (3.4)	<0.001^b
CLL kappa sérum (mg/L), médiane [Q1 ;Q3]	13.5 [10.8 ;16.4]	12.6 [10.6 ;15.4]	0.073 ^a	13.8 [10.9 ;17.8]	<0.001^a	14.9 [11.9 ;19.4]	<0.001^a
CLL lambda sérum (mg/L), médiane [Q1 ;Q3]	11.3 [9.1 ;14.2]	11.1 [9.1 ;13.1]	0.303 ^a	12.4 [9.9 ;15.0]	0.0130^a	12.5 [10.1 ;15.7]	0.001^a

Légende : n : nombre, Q1 : Premier quartile, Q3 : 3eme quartile, IgG : Immunoglobuline G, BOC : Bandes oligoclonales, CLL : Chaînes légères libres. ^a : comparaison des groupes à l'aide d'un test de Wilcoxon-Mann-Whitney, ^b : comparaison des groupes à l'aide d'un test de Fischer.

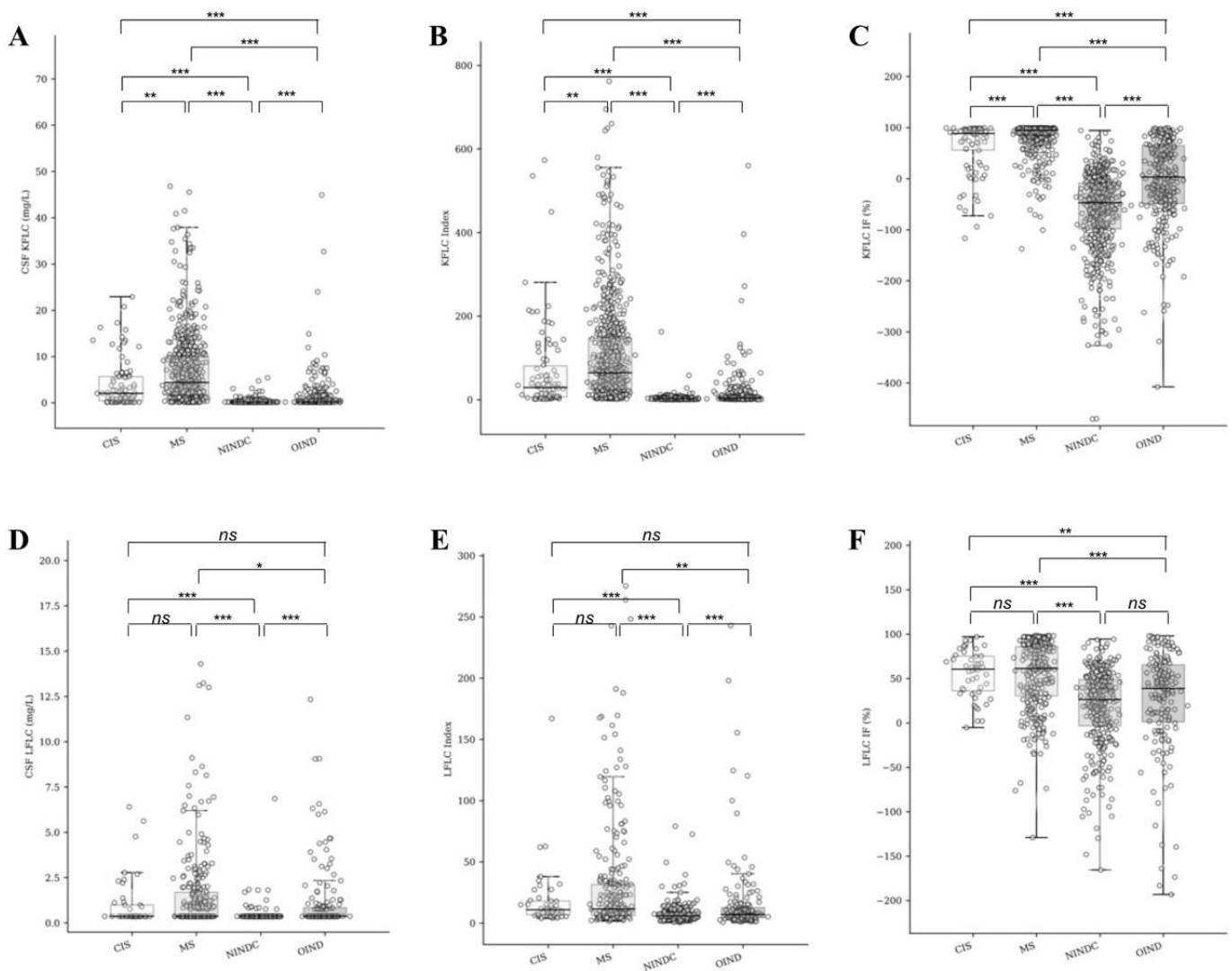
III.2.a Quantification des biomarqueurs de CLL entre les groupes

Le taux médian de CLL kappa dans le LCR était supérieur dans le sous-groupe SEP (4.4 mg/L [1.8 ; 10.0]) par rapport aux sous-groupes SCI (2.0 mg/L [0.5 ; 5.7], $p=.006$), CI (0.17 mg/L [0.17 ; 0.93], $p<.001$) et CNI (0.17 mg/L [0.17 ; 0.17], $p<.001$). Des résultats similaires étaient retrouvés lorsque l'index kappa ou la FI kappa étaient utilisés ($p<.001$ pour toutes les comparaisons de sous-groupe). Le taux médian d'index kappa était de 64.2, 29.0, 3.8, et 2.4 dans les sous-groupes SEP, SCI, CI, et CNI respectivement. Le taux de FI kappa était de 94.6%, 88.3%, 3.2%, et -47.2% dans les sous-groupes SEP, SCI, CI, et CNI respectivement.

Au sein du sous-groupe SEP, le taux médian de CLL kappa LCR n'était pas différent entre les SEP rémittentes (4.8 mg/L [1.8 ; 10.3]) et les SEP progressives (3.6 mg/L [1.2 ; 8.4]), $p=0.292$. En revanche, le taux médian d'index kappa (68.8 [27.7 ; 158.3] vs 44.6 [12.1 ; 98.0]) et le taux médian de FI kappa (95.8% [77.5 ; 98.6] vs. 86.9 [69.1 ; 94.1]) étaient supérieurs chez les patients SEP rémittentes par rapport aux SEP progressives ($p<.05$).

Enfin, le taux médian de CLL lambda dans le LCR, d'index lambda et de FI lambda étaient supérieurs dans le sous-groupe SEP par rapport aux sous-groupes CI et CNI ($p<.001$ pour toutes les comparaisons). En revanche, il n'y avait pas de différence entre les sous-groupes SEP et SCI. La **figure 8** résume la quantification des biomarqueurs de CLL au sein des sous-groupes.

Figure 8. Quantification et comparaison du taux de CLL kappa et lambda et leurs biomarqueurs (index et FI) entre les sous-groupes



Légende : CIS : sous-groupe SCI, MS : sous-groupe SEP, NINDC : sous-groupe CNI, OIND : sous-groupe CI. La figure montre la quantification du taux de CLL kappa LCR (A), index kappa (B), FI kappa (C), CLL lambda LCR (D), index lambda (E), et FI lambda (F) en fonction des sous-groupes. Légende statistique : ns : non significatif ($p > .05$), * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$.

III.2.b. Performances des biomarqueurs de CLL

Pour évaluer la capacité diagnostique des biomarqueurs de CLL, la courbe de ROC et le calcul de l'aire sous la courbe (AUC) correspondante a été établit pour chaque biomarqueur dans deux situations : (i) sur l'ensemble de la cohorte en

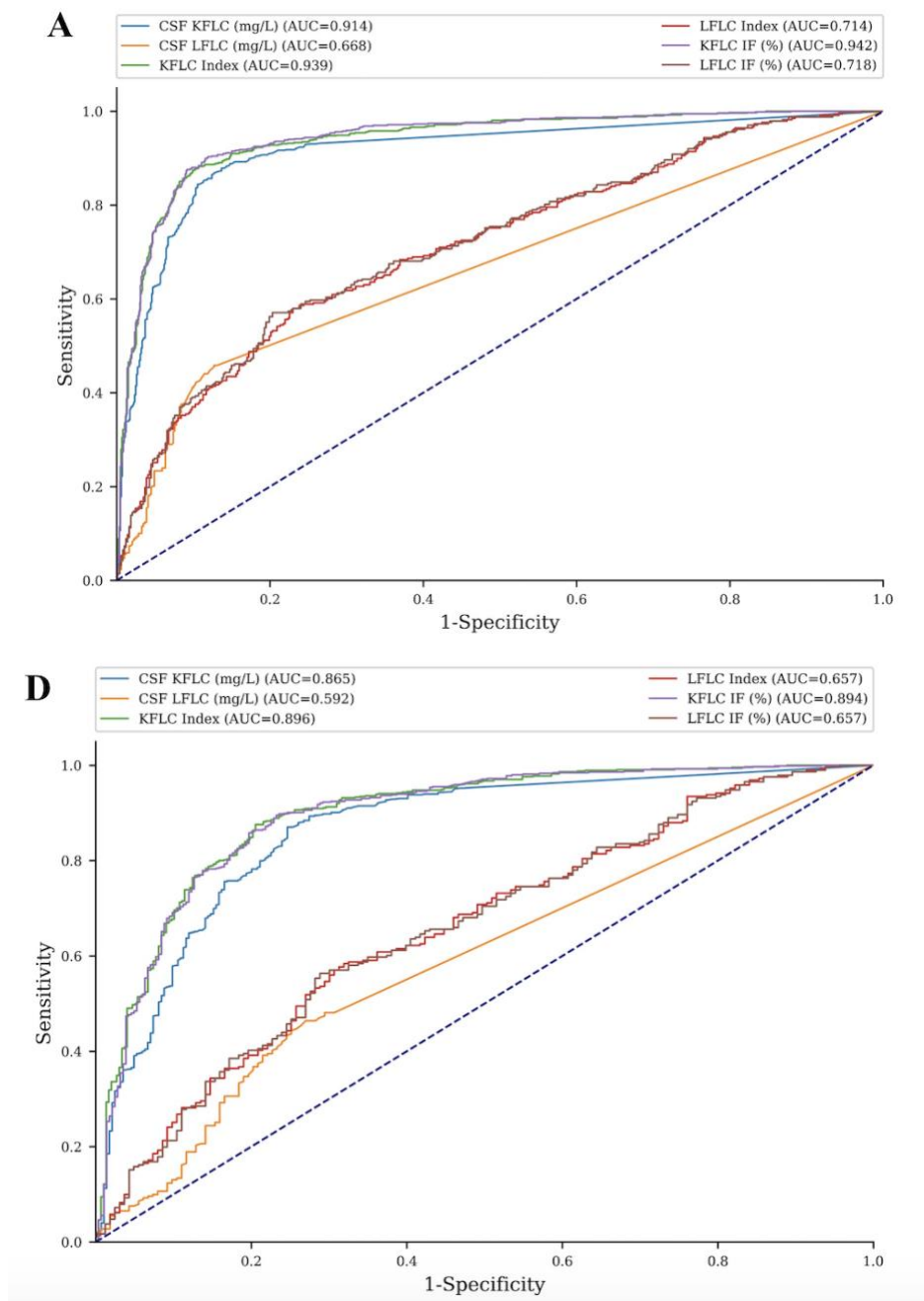
comparant le groupe SCI/SEP (n=765) au groupe Contrôle (n=856), et (ii) en comparant le sous-groupe SEP (n=675) au sous-groupe CI (n=297)

Dans chacune de ces 2 situations, les biomarqueurs de CLL kappa avaient des AUC supérieures aux biomarqueurs de CLL lambda ($p < .001$ pour toutes les combinaisons kappa vs lambda possibles). Les résultats des courbes ROC sont disponibles dans la **figure 9**.

Sur l'analyse de toute la cohorte (SCI/SEP vs contrôle), l'index kappa (AUC 0.94 [0.93 ;0.95]) et la FI kappa (AUC 0.94 [0.93 ;0.95]) avaient des performances similaires ($p=0.123$), et leurs performances étaient supérieures à celle du taux de CLL kappa LCR (AUC 0.91 [0.90 ;0.93]), $p < .001$ pour les deux comparaisons, **tableau 11**. En maximisant l'index de Youden, les valeurs seuils obtenues étaient 8.92 pour l'index kappa et 67.3% pour la FI kappa.

La capacité des biomarqueurs de CLL kappa à séparer les sous-groupes SEP et CI était inférieure à ce qui a été décrit précédemment, puisque les AUC étaient de 0.86 [0.84 ;0.89] pour les CLL kappa LCR, 0.90 [0.87 ;0.92] pour l'index kappa et 0.89 [0.87 ;0.92] pour la FI kappa (**tableau 12**). L'index kappa et la FI kappa avaient des performances similaires ($p=0.991$) et meilleures que les CLL kappa LCR ($p < .001$ pour les deux comparaisons). Les valeurs seuils obtenues étaient 11.56 pour l'index kappa et 67.9% pour la FI kappa.

Figure 9. Analyse des courbes ROC évaluant la capacité des biomarqueurs de CLL à séparer les patients SEP des contrôles



Légende : Courbe bleue : CLL kappa LCR, courbe violette : FI kappa, courbe verte : index kappa, courbe jaune : CLL lambda LCR, courbe marron : FI lambda, courbe rouge : index lambda. La figure A représente les courbes ROC permettant de séparer les groupes SCI/SEP et Contrôles (n= 1621 patients) et la figure D représente les courbes ROC permettant de séparer les sous-groupes SEP et CI.

Tableau 11. Résultats de l'analyse des courbes ROC des biomarqueurs de CLL kappa pour séparer les groupes SCI/SEP et Contrôle (n=1621 patients)

Variable	CLL kappa LCR	Index kappa	FI kappa
AUC	0.9142 ^a	0.9391 ^a	0.9416 ^a
IC 95%	[0.8995 ; 0.9289]	[0.9274 ; 0.9508]	[0.9298 ; 0.9534]
Index de Youden	0.7437	8.9248	67.3251
Sensibilité (%)	87.9 [85.3 ; 90.1]	88.2 [85.7 ; 90.4]	87.6 [85.0 ; 89.9]
Spécificité (%)	86.3 [83.8 ; 88.6]	89.3 [87.0 ; 91.3]	90.8 [88.6 ; 92.7]
VPP (%)	85.4 [82.7 ; 87.9]	88.0 [85.5 ; 90.2]	89.7 [87.2 ; 91.8]
VPN (%)	88.6 [86.2 ; 90.8]	89.5 [87.2 ; 91.4]	88.9 [86.6 ; 91.0]

Légende : AUC : aire sous la courbe ROC, IC 95% : intervalle de confiance à 95%, VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative. ^a : Comparaison d'AUC selon la méthode de Delong : Les AUC de l'index kappa et de la FI kappa ne sont pas statistiquement différentes (p=0.123) mais sont supérieures à l'AUC des CLL kappa LCR (p<.001 pour les 2 comparaisons).

Tableau 12. Résultats de l'analyse des courbes ROC des biomarqueurs de CLL kappa pour séparer les sous-groupes SEP et CI (n=972 patients)

Variable	CLL kappa LCR	Index kappa	FI kappa
AUC	0.8645 ^a	0.8962 ^a	0.8943 ^a
IC 95%	[0.8380 ; 0.8910]	[0.8737 ; 0.9187]	[0.8708 ; 0.9178]
Index de Youden	0.94	11.5593	67.8591
Sensibilité (%)	87.0 [84.2 ; 89.5]	87.6 [84.8 ; 90.0]	89.5 [86.9 ; 91.8]
Spécificité (%)	75.4 [69.9 ; 80.3]	79.5 [74.4 ; 83.9]	0.76.8 [71.4 ; 81.6]
VPP	88.9 [86.3 ; 91.3]	90.6 [88.1 ; 92.8]	89.8 [87.2 ; 92.0]
VPN	71.8 [66.3 ; 76.9]	73.8 [68.6 ; 78.5]	76.2 [70.9 ; 81.0]

Légende : AUC : aire sous la courbe ROC, IC 95% : intervalle de confiance à 95%, VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative. ^a : Comparaison d'AUC selon la méthode de Delong : Les AUC de l'index kappa et de la FI kappa ne sont pas statistiquement différentes (p=0.991) mais sont supérieures à l'AUC des CLL kappa LCR (p<.001 pour les 2 comparaisons).

III.2.c. Comparaison des performances diagnostiques de l'index kappa et de la FI kappa avec celle des BOC pour le diagnostic de SEP

III.2.c.1. Performances pour séparer les groupes SCI/SEP et Contrôle

La capacité diagnostique du groupe SCI/SEP vs Contrôle de l'index kappa et de la FI kappa ont été évaluées, dans un premier temps, par régression logistique. L'Odds ratio de l'index kappa était de 1.07 [1.06 ;1.08] (probabilité diagnostique augmentant de 7% à chaque élévation de 1 de l'index kappa, $p < .001$). Celui de la FI kappa était de 1.04 [1.04 ;1.04], $p < .001$.

Ensuite, les valeurs seuils d'index kappa (8.92) et de FI kappa (67.3%) étaient appliquées. A chaque patient correspondait donc une valeur binaire (positif ou négatif) pour les variables suivantes : index kappa, FI kappa et BOC. Les résultats comparant les performances des biomarqueurs kappa vs BOC sont renseignés dans le **tableau 13**.

Un index kappa positif (AUC 0.89 [0.87 ;0.90]) ou une FI kappa positive (AUC 0.89 [0.88 ;0.91]) permettait de séparer les patients SCI/SEP des Contrôles de manière plus efficace que les BOC (AUC 0.86 [0.84 ;0.88]). Cette différence, bien que faible, était statistiquement significative ($p < .001$ pour les 2 comparaisons). Cette meilleure capacité diagnostique se traduisait par un gain significatif de sensibilité (88% vs 82%, $p < .001$) pour une même spécificité (89%-90%, $p > .05$).

III.2.c.2. Performances pour séparer les sous-groupes SEP et CI

La capacité diagnostique du sous-groupe de SEP vs. CI de l'index kappa et de la FI kappa a été évalué par régression logistique. L'Odd ratio de l'index kappa était de 1.03 [1.03 ;1.04] (probabilité diagnostique augmentant de 3% à chaque élévation de 1 de l'index kappa, $p < .001$); Celui de la FI kappa était similaire (1.03 [1.03 ;1.04], $p < .001$).

Les seuils de 11.56 pour l'index kappa et 67.9% pour la FI kappa étaient ensuite appliqués pour définir la positivité.

Dans cette situation, la positivité de l'index kappa, de la FI kappa ou des BOC avait la même performance diagnostique : index kappa (AUC 0.83 [0.81 ;0.86]), FI kappa (AUC 0.83 [0.80 ;0.86]), et BOC (AUC 0.81 [0.79 ;0.84]). Une tendance se dégagait en faveur de l'utilisation de l'index kappa ($p=0.065$) ou de la FI kappa ($p=0.138$) par rapport aux BOC du fait d'un gain significatif de sensibilité (87-88% vs 84%). Ces résultats sont renseignés dans le **tableau 14**.

Tableau 13. Capacité de l'index kappa, FI kappa et des BOC à séparer le groupe SCI/SEP du groupe contrôle (n=1621)

Variable	BOC	Index kappa positif	BOC vs index kappa p-value	FI kappa positive	BOC vs FI kappa p-value
AUC	0.861 [0.844 ;0.878]	0.887 [0.872 ;0.903]	0.0007^a	0.892 [0.876 ;0.908]	0.0002^a
Sensibilité (%)	81.99 [79.21 ;84.77]	88.24 [85.95 ;90.52]	<0.0001^b	87.59 [85.2 ;89.97]	0.0001^b
Spécificité (%)	90.16 [88.1 ;92.22]	89.36 [87.29 ;91.42]	0.3390 ^b	90.91 [88.92 ;92.9]	0.4461 ^b
VPP (%)	88.38 [85.97 ;90.79]	88.12 [85.83 ;90.41]	0.8515 ^c	89.79 [87.57 ;92.01]	0.1694 ^c
VPN (%)	84.58 [82.16 ;87]	89.46 [87.4 ;91.52]	<0.0001^c	88.92 [86.77 ;91.06]	0.0003^c
Bonne classification des patients (%)	86.4	88.8		89.3	

Légende : AUC : aire sous la courbe, BOC : bandes oligoclonales, VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative

^a : Comparaison des AUC par la méthode de Delong ; ^b : Comparaison des sensibilités et spécificités par le test de McNemar ; ^c : Comparaison des valeurs prédictives par le Package DTCompair.

Tableau 14. Capacité de l'index kappa, FI kappa et des BOC à séparer le sous-groupe SEP du sous-groupe CI (n=972)

Variable	BOC	Index kappa positif	BOC vs index kappa p-value	FI kappa positive	BOC vs FI kappa p-value
AUC	0.814 [0.787;0.841]	0.835 [0.809;0.861]	0.0649 ^a	0.831 [0.803;0.858]	0.1375 ^a
Sensibilité (%)	84.26 [81.46;87.06]	87.56 [85.07;90.05]	0.0260^b	89.35 [86.98;91.73]	0.0003^b
Spécificité (%)	78.09 [73.27;82.91]	79.73 [75.15;84.31]	0.5271 ^b	77.03 [72.13;81.93]	0.6473 ^b
VPP (%)	89.8 [87.4;92.21]	90.78 [88.56;93.01]	0.3309 ^c	89.91 [87.58;92.23]	0.9130 ^c
VPN (%)	68.42 [63.35;73.49]	73.75 [68.93;78.57]	0.0209^c	75.96 [71.01;80.9]	0.0008^c
Bonne classification des patients (%)	82.6	85.1		85.5	

Légende : AUC : aire sous la courbe, BOC : bandes oligoclonales, VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative

^a : Comparaison des AUC par la méthode de Delong ; ^b : Comparaison des sensibilités et spécificités par le test de McNemar ; ^c : Comparaison des valeurs prédictives par le Package DTCompair.

III.2.d. Faut-il utiliser les CLL kappa seules ou en combinaison les BOC ?

Nous avons évalué si l'utilisation combinée d'un biomarqueur de CLL kappa positif et de la présence de BOC avait une meilleure capacité diagnostique que l'utilisation d'un biomarqueur de CLL kappa seul. Ainsi, ce « biomarqueur composite » était considéré positif lors que l'index kappa était supérieur à 11.56 (ou la FI kappa > 67.3%) et qu'il y avait la présence de BOC. Dans le cas où seul l'un des 2 (ou les 2) biomarqueurs était négatif, le « biomarqueur composite » était considéré négatif.

Une fois obtenu, la capacité du « biomarqueur composite » à séparer les patients SEP des CI était estimée par courbe ROC. La comparaison des AUC

permettaient de comparer sa capacité diagnostique avec celle de l'index kappa ou de la FI kappa.

L'association index kappa positif et BOC (AUC 0.83 [0.80 ;0.85]) avait une capacité diagnostique similaire à celle de l'index kappa positif seul (AUC 0.84 [0.81 ;0.86]), $p=0.231$. Le gain de spécificité (86% vs. 80%, $p<.001$) du « biomarqueur composite » ne compensait pas la perte de sensibilité (79% vs. 88%, $p<.001$). Des résultats similaires étaient obtenus en utilisant la FI kappa (**tableau 15**).

Tableau 15. Comparaison d'un biomarqueur composite associant CLL kappa et BOC aux CLL kappa seules pour séparer les sous-groupes SEP et CI (n=972)

	AUC	Sensibilité	Spécificité
Index kappa positif	0.835 [0.809; 0.861]	87.6 [85.1; 90.1]	79.7 [75.2; 84.3]
Index kappa positif + présence de BOC	0.826 [0.801; 0.849]	79.4 [76.2; 82.4]	85.8 [81.3; 89.6]
P-value	0.231 ^a	<0.001	<0.001
<hr/>			
FI kappa positive	0.831 [0.803; 0.858]	89.4 [86.0; 91.7]	77.0 [72.1; 81.9]
FI kappa positive + présence de BOC	0.828 [0.802; 0.851]	79.9 [76.6; 82.9]	85.8 [81.3; 89.6]
P-value	0.666 ^a	<0.001	<0.001

^a : Comparaison des AUC par la méthode de DeLong

^b : Comparaison des sensibilités et spécificités par le test de McNemar

III.2.e. Facteurs pouvant influencer la valeur de l'index kappa

La sensibilité de l'index kappa (ou de la FI kappa) étant d'environ 88%, il existe un faible nombre de patients SEP ayant un index kappa (ou FI kappa) négatif.

Nous avons évalué, à l'aide d'un modèle de régression logistique, s'il existait, chez les patients SEP, des variables qui pouvaient influencer la valeur de l'index kappa.

En analyse univariée (comparaisons de groupes ou corrélations entre 2 variables quantitatives) : le jeune âge ($\rho = -0.14$, $p < .001$), le sexe féminin ($p < .001$), l'activité de la maladie ($p < .001$), le phénotype de SEP ($p = .005$), et le type d'automate ($p = .042$) étaient des variables semblant influencer la valeur de l'index kappa. En revanche l'utilisation d'échantillons frais vs. décongelés ($p = .765$), la prise de traitement immuno-actif au moment du recueil ($p = .251$), ou de type d'événement démyélinisant ayant conduit au diagnostic de SEP ($p = .867$) n'influençaient pas la valeur de l'index kappa.

Dans le modèle multivarié, seul le jeune âge ($\beta = -1.02$ [-1.82 ; -0.21], $p = .013$), le sexe féminin ($\beta = 32.0$ [10.7 ; 53.3], $p = .003$), et l'activité de la maladie ($\beta = 39.8$ [17.3 ; 62.3], $p < .001$) étaient indépendamment associés à une élévation de l'index kappa chez les patients SEP (**tableau 16**).

III.2.f Reproductibilité du dosage des CLL kappa dans le LCR

Afin d'évaluer la reproductibilité de la quantification des biomarqueurs de CLL kappa entre les centres et évaluer un potentiel effet centre à nos résultats, nous avons comparé les médianes de CLL kappa LCR, index kappa et FI kappa chez patients SEP entre chaque centre ayant inclus au moins 40 patients (i.e. Marseille, Montpellier, Nantes, et Nice). Les centres ayant inclus moins de 40 SEP étaient regroupés en un cinquième centre.

La médiane d'index kappa et de FI kappa des patients SEP n'était pas différentes entre les différents centres ($p=.268$ et $p=.091$ pour l'index kappa et la FI kappa respectivement). Cependant, il y avait une différence entre la médiane de CLL kappa LCR entre 2 centres (médianes à 7.2 mg/L vs. 3.5 mg/L) mais cette différence restait statistiquement non significative lors de l'analyse de l'ensemble des centres ($p=.067$). Les résultats sont disponibles dans le **tableau 17**.

Tableau 16. Évaluation des variables pouvant influencer la valeur de l'index kappa dans le sous-groupe SEP

	Analyse univariée		Analyse multivariée						
	Coefficient de corrélation / Médiane d'index kappa (IQR)	P-value	Ordre de retrait des variables	Coefficient β	IC 95%	P-value			
Age ($n=675$)	$\rho = -0.14$	<0.0001^f		-1.02	[-1.82;-0.21]	0.0132			
Sexe									
Féminin ($n=481$),	73.7 (136.7)	0.0004^d							
Masculin ($n=194$)	48.3 (81.8)						-31.99	[-53.26;-10.73]	0.0033
Activité de la maladie									
Oui ($n=425$)	80.8 (139.2)	<0.0001^d							
Non ($n=177$)	45.7 (100.6)						-39.78	[-62.25;-17.31]	0.0005
Type d'automate									
Optilite® ($n=581$)	65.3 (121.9)	0.0415^e	1	11.57	[-26.31;49.46]	0.5488			
SPAplus® ($n=43$)	92.8 (140.5)								
BN ProSpec® / BNII® ($n=51$)	39.1 (120.4)								
Phénotype de SEP									
SEP-RR ($n=591$)	68.8 (130.6)	0.0005^e	2						
SEP-SP ($n=14$)	76.1 (109.2)						-23.39	[-91.34;44.56]	0.2342
SEP-PP ($n=69$)	36.1 (64.2)						-22.106	[-58.56;14.35]	0.4992

Légende : ^d: test de Wilcoxon Mann Whitney, ^e: test de Kruskal Wallis, ^f: corrélation de spearman

Tableau 17. Comparaison des valeurs médianes des biomarqueurs de CLL kappa dans la SEP entre les centres

	Marseille (n=146)	Montpellier (n=45)	Nantes (n=68)	Nice (n=174)	Autres centres (n=242)	P-value
CLL kappa LCR (mg/L), médiane [Q1 ; Q3]	4.88 [1.83 ; 10.83]	4.85 [2.64 ; 7.27]	7.15 [2.50 ; 12.88]	4.67 [1.77 ; 10.16]	3.52 [1.72 ; 8.99]	0.067 ^e
Index kappa, médiane [Q1 ; Q3]	71.53 [23.83 ; 155.62]	63.88 [41.24 ; 124.16]	96.35 [30.46 ; 191.43]	67.25 [30.46 ; 147.43]	56.95 [23.43 ; 143.79]	0.268 ^e
FI kappa (%), médiane [Q1 ; Q3]	95.67 [86.36 ; 97.74]	94.64 [91.91 ; 97.07]	96.56 [88.86 ; 98.32]	94.83 [86.83 ; 99.24]	93.77 [86.66 ; 97.33]	0.091 ^e

^e : test de Kruskal Wallis. Q1 : Premier quartile, Q3 : Troisième quartile

III.3. Discussion de cette seconde étude

Ce travail est actuellement l'étude de cohorte évaluant l'intérêt diagnostique des CLL dans la SEP ayant inclus le plus de patients et l'une des premières comparant en face à face différentes mesures de synthèse locale de CLL (valeur brute des CLL kappa dans le LCR, index kappa ou FI kappa). Nos résultats suggèrent que :

III.3.1 Les CLL lambda sont peu performantes pour prouver la présence d'une activité lymphocytaire B dans le LCR.

Ces résultats sont en ligne avec l'ensemble des études ayant évalué l'intérêt diagnostique des CLL lambda LCR.⁹⁰⁻⁹³ Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat. La première est technique, car contrairement aux CLL kappa (monomériques, 22.5kD), les CLL lambda sont dimériques (45kD) ce qui peut rendre la fixation de l'antisérum difficile et fausser l'analyse spectrométrique.⁹⁶ La seconde hypothèse, plus physiopathologique, est la

sécrétion par les lymphocytes B activés méningés de patients atteints de SEP, d'une immunoglobuline monoclonale de nature IgX/kappa avec production de CLL kappa monoclonale. Cette hypothèse est conforté par la connaissance de la nature oligo-monoclonale du répertoire lymphocytaire B activé méningé chez les patients atteints de SEP.³⁶

III.3.2 L'importance de la prise en compte de la perméabilité de la barrière hémato-méningée via le quotient albumine, pour prouver une synthèse locale de CLL.

Nous avons montré que les performances de l'index kappa ou de la FI kappa (tous deux intégrant le quotient albumine dans leur formule) sont supérieures à celle des CLL kappa LCR. Ce résultat est cohérent avec d'autres études rétrospectives montrant la supériorité des modèles linéaires et/ou hyperboliques vs. la valeur brute de CLL kappa LCR^{83,90,97-99} dans l'estimation d'une synthèse locale d'immunoglobulines.

Il existe un débat sur la manière d'utiliser ces biomarqueurs de CLL kappa (index kappa ou FI kappa) dans la communauté scientifique européenne, et il n'existe actuellement aucun seuil consensuel qui permette de diagnostiquer une synthèse locale de CLL.¹⁰⁰ Les équipes allemande et suisse préconisent l'utilisation d'un modèle hyperbolique (diagramme de Reiber) suggérant qu'une valeur de quotient de CLL (CLL LCR/CLL sérum) supérieure à la valeur maximale théorique de ce même quotient chez des témoins sains, suffit à prouver une synthèse locale de CLL, dont l'intensité peut être évaluée par le calcul de la FI kappa.⁸³ La justification de l'utilisation de ce type de méthode est double : (i) à la fois physiopathologique puisque cela prend en considération la variation normale du quotient de CLL chez les sujets sains (flux normal du LCR), et (ii)

théorique puisque les études menées par leurs équipes ont montré une supériorité de l'utilisation de ce modèle vs. le calcul de l'index kappa.^{83,97,101}

A l'inverse, les équipes autrichienne et espagnole utilisent l'index kappa avec des résultats qui semblent comparables aux autres travaux européens.^{88,90,100,102}

En pratique clinique, il existe une limite importante à ce débat : la limite de détection basse des automates. En effet, la plupart des patients ayant une FI kappa positive et un index kappa négatif (considéré comme un faux négatif) ont des taux de CLL kappa LCR très faibles, et majoritairement infra-seuil de détection des automates utilisés en soin courant. Cette situation reste rare puisque le taux médian de FI kappa des patients SEP est de 90%. L'amélioration des seuils de détection en pratique courante nécessiterai des manipulations longues et coûteuses, alors même que la quantification des CLL kappa est moins longue et coûteuse que la détermination des BOC.^{103,104}

Pour une utilisation en pratique clinique quotidienne : l'index kappa et la FI kappa ont une capacité diagnostique équivalente, affirmation renforcée par les résultats de la méta-analyse publiée récemment à ce sujet.¹⁰⁰

III.3.3 L'index kappa et la FI kappa sont aussi performants que les BOC pour le diagnostic de SEP

Nos résultats ont montré que l'index kappa ou la FI kappa ont des performances diagnostiques légèrement supérieures à celle des BOC. En pratique courante, l'analyse la plus intéressante est celle comparant les patients SEP aux patients CI (groupe composé de patients ayant une maladie inflammatoire du SNC non infectieuse et non tumorale) – situation où les CLL kappa et les BOC ont des performances équivalentes mais non additionnelles. Dans cette analyse, les performances de l'index ou FI kappa ont été évaluées avec des seuils majorés (i.e. 11.6 vs 8.9 pour l'index kappa). Cet élément est primordial dans la

compréhension de l'absence de consensus actuel sur la valeur seuil qui permette d'établir avec certitude une synthèse locale de CLL. Des recommandations d'experts, publiés à postériori, estiment que l'interprétation d'un index kappa compris entre 2.4 et 20 (valeurs seuils minimales et maximales publiées à ce jour) doit être prudente puisqu'il s'agit d'une « zone grise » au sein de laquelle des conclusions ne peuvent être rendues avec certitude.¹⁰⁵

Dans notre étude, l'analyse de régression logistique montrait que plus l'index kappa était élevé, plus la probabilité diagnostique était grande (Odds ratio 1.03, $p < .001$). Ce résultat suggère que l'une des utilisations en pratique courante serait de tirer avantage de l'information quantitative que les CLL apporte. En appliquant nos résultats à une situation clinique concrète, un patient ayant un index kappa à 120 aurait 3 fois plus de risque d'avoir un diagnostic de SEP qu'un patient ayant un index kappa à 30, malgré que les 2 résultats soient positifs. Cette attitude est adoptée par certains auteurs qui suggèrent que la probabilité d'avoir un diagnostic de SEP lorsque l'index kappa est > 100 est proche de 100%.¹⁰⁶ En pratique, dans notre cohorte, 9 des 856 (1%) patients contrôles avaient un index kappa > 100 et 8 d'entre eux faisaient partie du sous-groupe CI.

L'autre utilisation en pratique courante proposée par certains auteurs est séquentielle : utilisation de l'index ou FI kappa avec des seuils de détection bas (ayant une grande sensibilité) pour détecter rapidement et à moindre coût la présence d'une activité lymphocytaire B intrathécale, puis, en cas de résultat positif, la recherche de BOC est réalisée afin de confirmer la synthèse locale.^{103,107-109} Cette attitude, évaluée en pratique courante, permettrait une réduction de la recherche de BOC et une économie de temps et d'argent

(quantification des CLL kappa 8 fois plus rapide et 3 fois moins cher que la recherche de BOC).¹⁰⁴

III.3.4 La valeur de l'index kappa dépend de l'âge, du sexe et de l'activité de la maladie au moment du recueil

De manière intéressante, la valeur de l'index kappa ne semble pas être influencée par la prise de traitement immuno-actif (traitement dominé par la prise de corticoïdes dans notre étude). Ce résultat, est concordant avec les données de la littérature¹¹⁰⁻¹¹² et renforce l'intérêt de ce biomarqueur. Une étude a rapporté la comparaison des taux de CLL kappa chez des patients SEP traités et a montré que le taux médian de FI kappa était plus bas chez les patients traités par traitements de haute efficacité.¹⁰¹ En revanche, les auteurs ne constataient pas de différence entre les taux médian de FI kappa entre les patients SEP non traités et ceux traités par traitement immunomodulateurs¹⁰¹ laissant à penser un impact faible des traitements sur les CLL dans le LCR.

Enfin, nos résultats suggèrent que l'âge jeune, le sexe féminin et l'activité de la maladie (combinaison symptômes cliniques et/ou prise de contraste radiologique dans les 30 jours) sont des facteurs influençant la valeur de l'index kappa chez les patients SEP. Ce résultat soulève la question de la capacité des CLL kappa à prédire l'évolution à court terme de la maladie, puisqu'il est couramment accepté que les patients actifs au diagnostic ont un risque accru de seconde poussée.

Ce travail (disponible à la fin de la thèse, Annexe 3) a été publié dans le journal *Neurology Neuroimmunology Neuroinflammation* (Rang A, IF 11.36)

Points clés de la seconde étude

- Les chaînes légères libres lambda ne sont ni sensibles, ni spécifiques pour le diagnostic de SEP
- L'index kappa et la fraction intrathécale (FI) de CLL kappa peuvent être utilisés de manière équivalente pour prouver une synthèse intrathécale d'Ig dans la SEP
- La concentration des CLL kappa dans le LCR est moins performante que l'index kappa (ou la FI kappa)
- La capacité diagnostique de l'index kappa est légèrement supérieure à celle des BOC dans la SEP (plus sensible et aussi spécifique).
- Dans la SEP, la valeur de l'index kappa n'est pas influencée par la prise de corticoïdes ou la présentation clinique mais dépend de l'âge, du sexe, et de l'activité de la maladie

IV. Rôle pronostic des chaînes légères libres kappa dans la SEP

Suite aux données recueillies de l'étude SFSEP, l'index kappa est un outil sensible et spécifique pour le diagnostic de SEP. Il est indépendamment associé à l'activité de la maladie au moment du recueil laissant entrevoir un possible rôle pronostic chez les patients présentant un premier événement clinique évocateur de SEP.

La principale limite de l'étude SFSEP est que les performances diagnostiques ont été calculées sans tenir compte de la présentation clinique et/ou radiologique initiales. Cette limitation a été minimisée en ne sélectionnant que des patients avec maladie auto-immune du SNC comme CI, mais leurs caractéristiques cliniques n'étaient pas renseignées. Ainsi, le rôle diagnostique de l'index kappa chez des patients présentant un événement clinique démyélinisant n'est pas connu.

La mise en évidence d'une synthèse locale d'immunoglobulines par la détection des BOC permet, en pratique clinique, de surseoir aux critères de dissémination temporelle chez les patients ayant présenté un premier événement démyélinisant ²⁰ du fait de leur capacité à prédire, indépendamment d'autres facteurs pronostics, l'apparition d'une seconde poussée de la maladie.^{18,113,114} Le but de ce troisième travail consistait à évaluer la capacité de l'index kappa à prédire l'évolution clinique (poussée) ou radiologique (apparition d'une nouvelle lésion T2 sur l'IRM) de patients présentant un premier événement clinique démyélinisant ou un SRI.

IV.1 Méthodologie

IV.1.a schéma de l'étude

Nous avons mené une étude rétrospective de tous les patients adressés au CRC-SEP du CHUN entre le 01/05/2018 et le 01/07/2021 pour bilan d'une suspicion clinique et/ou radiologique isolés.

Pour être inclus, les patients devaient être âgés d'au moins 18 ans, avoir un diagnostic établi de premier événement démyélinisant, que le patient remplisse ou non les critères McDonald 2017²³ ou de syndrome radiologique isolé (critères RIS 2009),³ et devaient avoir un suivi clinique et/ou une IRM de contrôle à 1 an du diagnostic.

Étaient exclus les patients dont le recueil du couple sérum – LCR excédait de 6 mois l'événement clinique démyélinisant, les patients bénéficiant d'un traitement immuno-actif avant le recueil du couple sérum – LCR (corticoïdes autorisés), et les patients qui présentaient au moment du recueil un nombre de poussées > 1.

Selon notre protocole de soin courant, chaque patient bénéficiait durant la phase diagnostique d'un bilan sérique et d'une ponction lombaire comprenant une analyse de l'albumine, des CLL kappa et une recherche BOC, ainsi que d'une IRM cérébrale et médullaire. Durant la phase de suivi, chaque patient bénéficiait d'une visite annuelle au cours de laquelle était pratiqué un examen clinique neurologique et une IRM cérébrale non injectée. Sur choix du clinicien, le suivi pouvait être plus rapproché (à 3 ou 6 mois).

Les données utiles à la réalisation de l'étude étaient recueillies rétrospectivement à partir des dossiers patients informatisés. Les patients inclus étaient séparés en 2 groupes : un groupe SCI regroupant les patients présentant un premier événement démyélinisant (indépendamment de leurs

caractéristique cliniques et radiologiques) et un groupe SRI comprenant des patients asymptomatiques remplissant les critères de RIS 2009.³

Cette étude a été approuvée par la Direction de Recherche Clinique et Innovation du CHUN et a été enregistrée sous l'identifiant 2022-EI-026.

IV.1.b Données collectées

Le données recueillies durant la phase diagnostique étaient les suivantes : âge, sexe, date du recueil, le temps entre les symptômes et le recueil du couple sérum – LCR, l'utilisation de corticoïdes en amont du recueil, le type d'événement clinique (névrite optique, myélite... etc), le nombre et le type de localisation(s) classant(s) pour la dissémination spatiale présentant des lésions hyperintense T2 sur l'IRM initiale, la présence de lésions rehaussées sur les séquences T1-gadolinium de l'IRM initiale, la protéinorachie, la cellularité du LCR, le taux sérique et LCR d'albumine, d'IgG, de CLL kappa, et la présence de BOC.

Les données recueillies annuellement au cours du suivi étaient : l'apparition d'une poussée clinique et sa date, l'apparition d'une nouvelle lésion T2 sur IRM de suivi, et l'instauration d'un traitement immuno-actif.

IV.1.c Analyse de l'IRM

Tous les patients bénéficiaient d'une IRM cérébrale initiale avec coupes cervicale haute (C1-C4) selon le protocole standardisé OFSEP.¹¹⁵ Chaque imagerie comprenait des séquences T2, 3D-FLAIR, et T1. L'IRM initiale comprenait des séquences T1-injectées chez la majorité des patients inclus (88%). Toutes les images étaient obtenues via IRM 3Tesla avec des coupes axiales et sagittales de 1mm d'épaisseur. Chaque patient bénéficiait d'au moins une IRM par an dans le suivi. La lecture des IRM était réalisée par 2 neuro-radiologues expérimentés,

dans le cadre du soin courant et en aveugle des données biologiques (CLL kappa et/ou BOC).

IV.1.d Analyses biologiques

Toutes les analyses biologiques étaient réalisées au sein du laboratoire d'immunologie du CHUN. La quantification de l'albumine, du taux d'IgG et du taux de CLL kappa dans le sérum et le LCR était réalisée par turbimétrie via l'automate Optilite® (The Binding Site, Birmingham, UK) avec l'utilisation d'antisérum spécifique Freelite® (The Binding Site, Birmingham, UK) selon les recommandations du fabricant. Les BOC étaient déterminées par technique de focalisation isoélectrique sur gel d'agarose avec des techniques de révélation utilisant des auto-anticorps IgG-spécifiques (Plateforme Hydrasys, Sebia, France). Le résultat était interprété par des biologistes expérimentés et rendu positif ou négatif. Un nombre de 2 bandes surnuméraires dans le LCR permettait de retenir le résultat comme positif. L'index kappa était calculé selon la formule précédemment citée. En accord avec les résultats obtenus sur l'étude SFSEP, un seuil de 8.9 était retenu pour définir la positivité de l'index kappa.

IV.1.e Analyses statistiques

Les variables continues étaient exprimées par leurs médianes et valeurs interquartiles (IQR) et les variables catégoriques étaient exprimées par leurs valeurs et pourcentages. L'association entre l'index kappa et les covariables au diagnostic était analysée via des tests non-paramétriques : le test de Wilcoxon rank-sum pour les comparaisons de variables binaires et le test de Kruskal Wallis pour les comparaisons de variables à plus de 2 niveaux.

La performance prédictive de l'index kappa (variable quantitative) était évaluée par courbes ROC temps-dépendant pour tenir compte des données censurées :

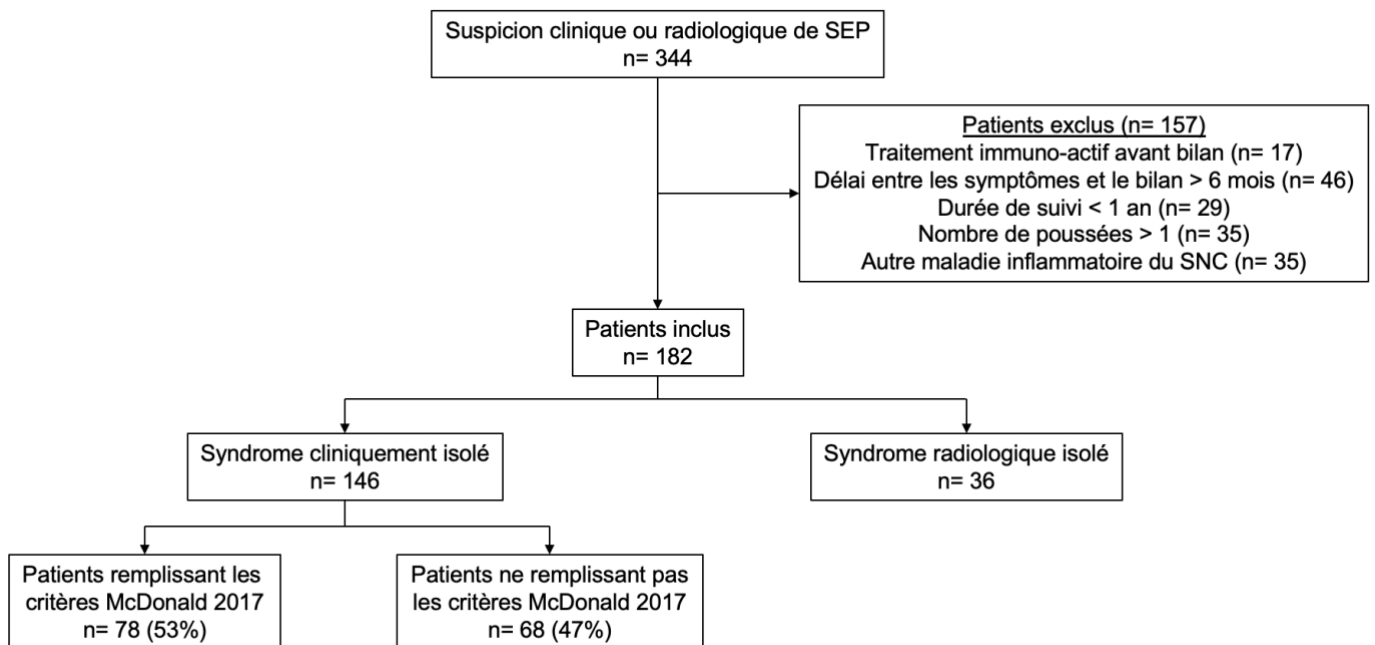
l'aire sous la courbe (AUC) était calculée à différents moments au cours du suivi. Les seuils optimaux d'index kappa étaient obtenus en maximisant l'index de Youden par une méthode bootstrap permettant d'estimer l'intervalle de confiance à 95% de chaque valeur, à 12, 24, et 36 mois. Les sensibilités, spécificités, et valeurs prédictives positives et négatives étaient déterminées à 12, 24, et 36 mois pour les BOC et l'index kappa (en utilisant la valeur de 8.9 comme seuil pour définir la positivité de l'index kappa).

Le délai d'apparition d'une poussée clinique ou d'une nouvelle lésion radiologique T2 était estimé par les courbes de survie de Kaplan-Meier en séparant les groupes selon le résultat de l'index kappa ou des BOC. La différence statistique était calculée par le test du Log-rank. Des régressions de Cox univariées étaient construites pour chaque covariable afin de déterminer le hazard ratio (HR) du temps écoulé jusqu'à la poussée clinique ou la première lésion T2. Le risque proportionnel a été évalué à l'aide des résidus de Schoenfeld. L'indice-c de Harrel était calculé pour comparer chaque variable en fonction de la qualité d'ajustement du modèle univarié (indice de concordance). L'indice-c allant d'une valeur de 0.5 (différence observée non meilleure que le hasard) à 1 (concordance parfaite). Des valeurs de $p < .05$ étaient considérées comme statistiquement significatives. Les analyses statistiques ont été faites en utilisant le logiciel R, version 4.0.3, avec le « time-ROC package » pour la réalisation des courbes ROC dépendantes du temps.¹¹⁶

IV.2 Résultats de cette troisième étude

Sur les 344 patients adressés au CRC-SEP durant la période d'étude, 182 patients (146 SCI et 36 SRI) étaient inclus. L'organigramme est résumé par la **figure 10**.

Figure 10. Organigramme



Parmi les inclus, 127 (70%) étaient de sexe féminin et l'âge médian à l'inclusion était de 39 [30 ; 48] ans. Les patients SRI étaient plus âgés et plus fréquemment de sexe féminin que les SCI. La durée médiane de suivi était plus longue dans le groupe SRI (25 mois) que dans le groupe SCI (20 mois). Les données cliniques, biologiques et radiologiques sont détaillées dans le **tableau 18**.

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les 2 groupes concernant le taux médian d'index kappa (36.9 [4.1 ; 105.8] vs 18.9 [3.1 ; 111.9], $p=.440$) ou la présence de BOC (54% vs 44%, $p=.0393$). Chez 149 (82%) patients, le résultat des BOC concordait avec celui de l'index kappa (positivité établie selon le seuil de 8.9). Chez les 33 patients restants, 30 présentaient un index kappa positif et une recherche de BOC négative.

Dans le groupe SCI, 48% des patients présentaient au moins une lésions T1 rehaussée par le gadolinium et 78 (53%) remplissaient les critères McDonald 2017. Parmi ces 78 patients, le critère de dissémination temporelle était rempli grâce à la présence de BOC chez 29 (37%). Chez ces 29 patients, la valeur

médiane d'index kappa était de 103.0 [53.6 ; 231.2] avec une valeur minimale de 35.3.

Tableau 18. Données clinico-biologiques et radiologiques des patients SCI et SRI

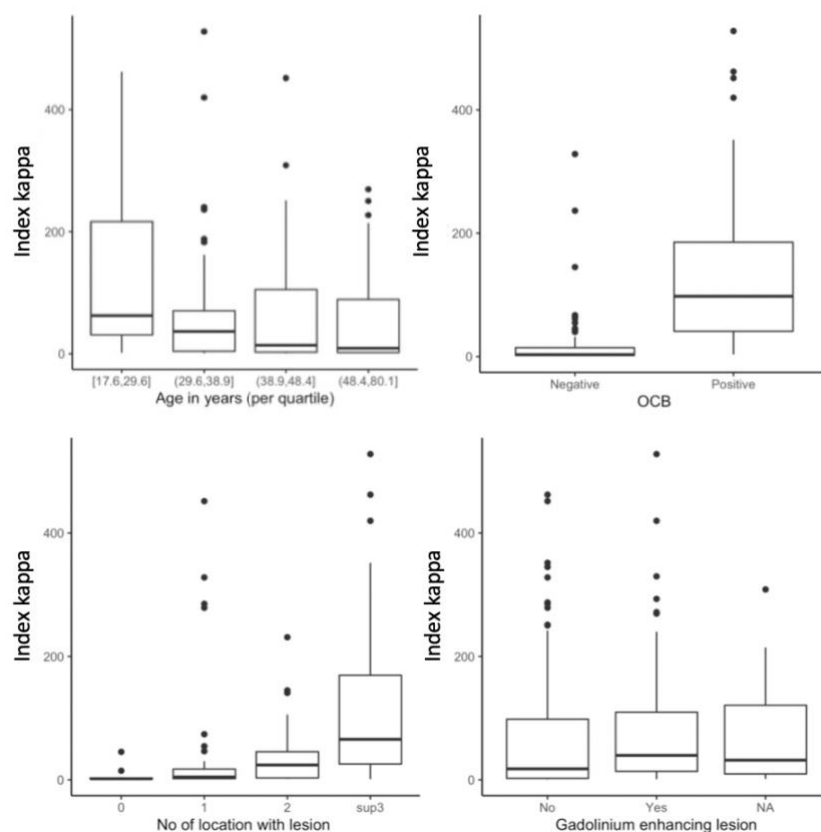
	SCI n=146	SRI n=36
Age (années), médiane [Q1; Q3]	38 [29; 46]	46 (33 ; 56)
Sexe (féminin), n (%)	96 (66)	31 (86)
Patients remplissant les critères McDonald 2017, n (%)	78 (53)	-
Type d'événement clinique :		
Névrite optique, n (%)	40 (28)	-
Myélite, n (%)	64 (44)	-
Symptômes infratentoriels, n (%)	37 (25)	-
Patients sous corticoïdes avant recueil, n (%)	12 (8)	0 (0)
Délai entre symptômes et recueil (jours), médiane [Q1; Q3]	22 [7; 62]	-
Patients avec lésion T2 dans les localisations :		
Péri ventriculaire, n (%)	94 (64)	36 (100)
Juxta/Corticale, n (%)	83 (57)	31 (86)
Infratentorielle, n (%)	76 (52)	13 (36)
Moelle épinière, n (%)	97 (66)	9 (25)
Patients avec lésion(s) T1 rehaussée(s), n (%)	62/130 (48)	2/31 (6)
Index IgG, médiane [Q1; Q3]	0.68 [0.58; 1.00]	0.61 (0.54; 0.98)
Présence de BOC, n (%)	79 (54)	16 (44)
Index kappa, médiane [Q1; Q3]	37 [4; 106]	19 (3; 112)
Durée de suivi (mois), médiane [Q1; Q3]	20 [13; 33]	25 (16; 35)
Nombre d'IRM/an/patient, médiane [Q1; Q3]	1.5 [1.1; 1.9]	1.1 (0.8 ; 1.5)
Patients avec poussée durant le suivi, n (%)	21 (14)	7 (19)
Traitement débuté avant poussée clinique, n (%)	69 (47)	0 (0)
Patients avec nouvelle lésion T2 durant le suivi, n (%)	85 (58)	20 (56)
Traitement débuté avant nouvelle lésion T2, n (%)	20 (14)	0 (0)

Légende : BOC : bandes oligoclonales, IgG : immunoglobuline G, Q1 : Premier quartile, Q3 : Troisième quartile, SCI : syndrome cliniquement isolé, SRI : syndrome radiologique isolé,

Au diagnostic, la valeur d'index kappa était plus élevée chez les patients présentant : une lésions T1 rehaussée après injection de gadolinium ($p=.049$), une dissémination spatiale radiologique sur les séquences T2 ($p<.001$), une positivité des BOC ($p<.001$), et un jeune âge ($p=.001$). Le sexe ($p=.074$) et le type d'événement clinique ($p=.171$) n'influençaient pas la valeur de l'index kappa (**figure 11**).

Pendant le suivi, 28 (15%) patients ont présenté une poussée clinique (21 dans le groupe SCI et 7 dans le groupe SRI) et 105 (58%) ont présenté une nouvelle lésion T2 (85 dans le groupe SCI et 20 dans le groupe SRI).

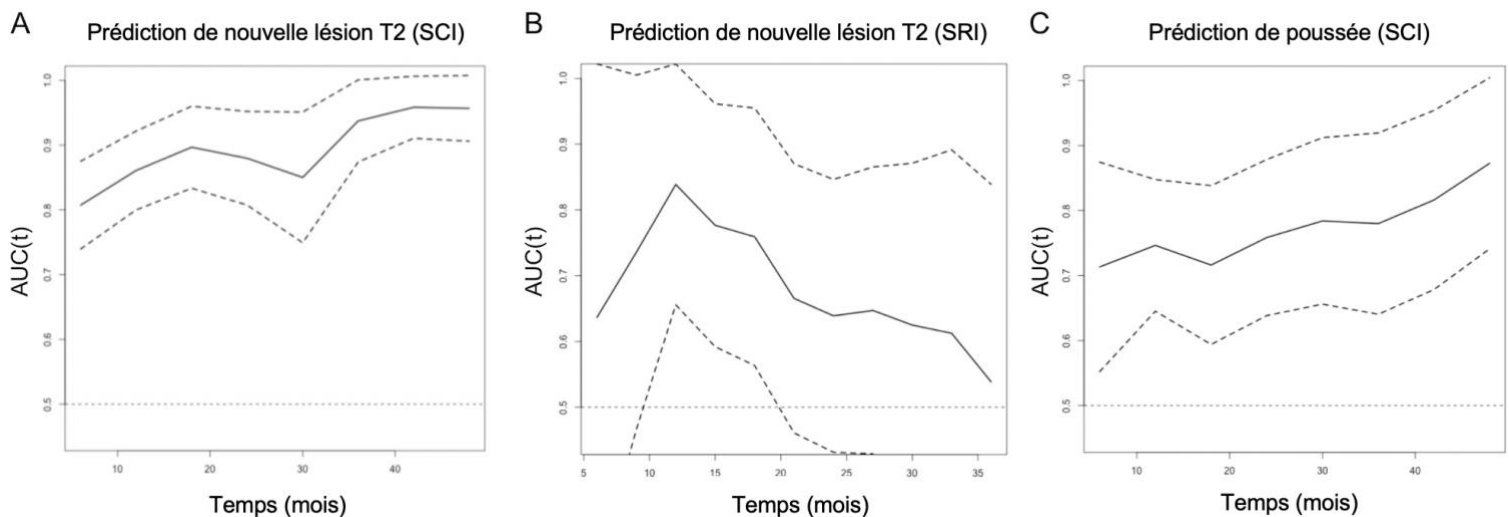
Figure 11. Évaluation de l'association entre l'index kappa et les autres covariables prédictives



IV.2.a. Capacité de prédiction d'une nouvelle lésion T2 dans le groupe SCI

L'analyse de la courbe ROC dépendante du temps montrait que l'index kappa pouvait prédire l'apparition d'une nouvelle lésion T2 au cours du suivi avec une AUC allant de 0.86 [0.80; 0.92] à 12 mois à 0.96 [0.91; 1.00] à 48 mois (**Figure 12A**). Après maximisation de l'index de Youden, les valeurs seuils optimales d'index kappa étaient décroissantes au cours du suivi : 30.5 [11.6; 36.7] à 12 mois, 14.9 [9.6; 40.9] à 24 mois, et 13.6 [5.9; 46.6] à 36 mois.

Figure 12. Analyse des courbes ROC dépendantes du temps pour la prédiction des différents objectifs



Légende : La figure montre la capacité de l'index kappa à prédire au cours du temps (aire sous la courbe ROC temps-dépendante) l'apparition d'une nouvelle lésion T2 chez les patients SCI (A), l'apparition d'une nouvelle lésion T2 chez les patients SRI (B), et l'apparition d'une poussée clinique chez les patients SCI (C). La capacité de l'index kappa à prédire une poussée clinique ou une nouvelle lésion T2 augmente au cours du temps chez les patients SCI, mais pas chez les patients SRI. Les lignes en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95% de l'AUC.

La régression de Cox montrait que le risque de nouvelle lésion T2 chez les patients SCI augmentait de 6% à chaque fois que l'index kappa augmentait de 10 points (**tableau 19**). Enfin, l'index kappa était la variable ayant la plus grande

capacité de prédiction de nouvelle lésion T2 (indice-c à 0.77), plus élevée que le nombre de localisation atteintes sur IRM initiale (indice-c à 0.72), que la présence de lésion T1 rehaussée (indice-c à 0.55) et que la présence de BOC (indice-c à 0.69).

Tableau 19. Hazard ratio et indices de concordances estimant le risque de nouvelle lésion T2 chez les patients SCI

	n	Valeur	Hazard Ratio	IC 95%	p-value	Indice-c
Aucune	-	-	-	-	-	0.50
Sexe (masculin)	146	-	0.76	[0.47; 1.21]	0.244	0.51
Age	146	Pour chaque 10 ans	0.60	[0.48; 0.73]	<0.001	0.67
Évènement clinique	146	Névrite optique	0.56	[0.32; 1.01]	0.051	0.59
	146	Myélite	0.52	[0.31; 0.86]	0.012	0.59
Nombre de localisations validant un critères de DIS avec lésion T2 sur l'IRM initiale	146	1	1.23	[0.26; 5.82]	0.790	0.72
	146	2	6.69	[1.46; 30.55]	0.014	0.72
	146	3 ou 4	10.59	[2.59; 43.36]	0.001	0.72
Présence d'une lésion T1 rehaussée à l'IRM initiale	130	Oui	1.40	[0.89; 2.19]	0.144	0.55
Index kappa	146	Pour chaque augmentation de 10	1.06	[1.04; 1.07]	<0.001	0.77
Index kappa positif (>8.9)	146	Positif	17.17	[7.41; 39.79]	<0.001	0.73
BOC	146	Positif	4.59	[2.80; 7.53]	<0.001	0.69

Légende : BOC : bandes oligoclonales, IC : intervalle de confiance

En utilisant l'index kappa comme variable binaire (positive ou négative selon le seuil de 8.9), l'apparition d'une nouvelle lésion T2 au cours du temps était

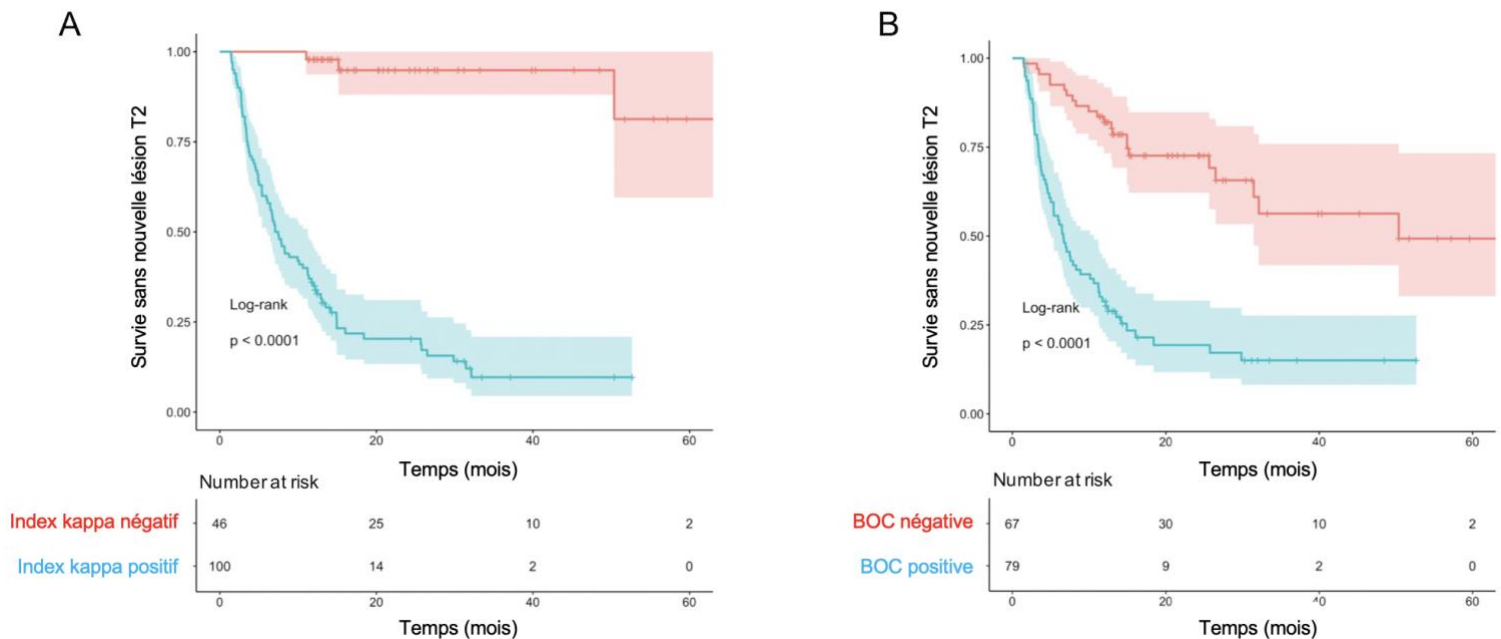
prédite avec une meilleure sensibilité et une spécificité équivalente à celle des BOC (**tableau 20**). L'analyse de survie montrait qu'un index kappa positif ($p < .0001$), et la présence de BOC ($p < .0001$) prédisaient l'apparition d'une nouvelle lésion T2 chez les patients SCI (**figure 13**). La durée médiane d'apparition d'une nouvelle lésion T2 était de 6 mois chez les patients avec index kappa positif, et 14 mois chez les patients avec index kappa négatif.

Tableau 20. Performances de l'index kappa (binaire) et des BOC pour prédire l'apparition d'une nouvelle lésion T2 au cours du temps chez les patients SCI

	Index kappa positif (>8.9)			Présence de BOC		
Temps (mois)	12	24	36	12	24	36
Sensibilité	0.98 [0.96; 1.00]	0.97 [0.93; 1.00]	0.98 [0.94; 1.00]	0.82 [0.72; 0.91]	0.77 [0.68; 0.87]	0.70 [0.59; 0.81]
Spécificité	0.55 [0.44; 0.66]	0.59 [0.42; 0.75]	0.79 [0.57; 1.00]	0.67 [0.57; 0.78]	0.74 [0.59; 0.88]	0.79 [0.57; 1.00]
VPP	0.65 [0.55; 0.74]	0.75 [0.65; 0.85]	0.90 [0.80; 1.00]	0.67 [0.57; 0.78]	0.79 [0.68; 0.90]	0.87 [0.74; 0.99]
VPN	0.98 [0.93; 1.00]	0.94 [0.86; 1.00]	0.94 [0.86; 1.00]	0.82 [0.72; 0.91]	0.72 [0.60; 0.84]	0.57 [0.41; 0.74]

Légende : BOC : bandes oligoclonales, VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative

Figure 13. Analyse de survie évaluant le risque de nouvelle lésion T2 chez les patients SCI



Légende : La figure montre le délai d'apparition d'une nouvelle lésion T2 selon le statut positif (ligne bleue) ou négatif (ligne rouge) de l'index kappa (A) ou des BOC (B) chez les patients SCI

IV.2.b. Capacité de prédiction d'une nouvelle lésion T2 dans le groupe SRI

L'analyse de la courbe ROC dépendante du temps montrait que l'index kappa pouvait prédire l'apparition d'une nouvelle lésion T2 au cours du suivi avec une AUC allant de 0.84 [0.66; 1.00] à 12 mois à 0.64 [0.43; 0.85] à 24 mois (**Figure 12B**). Après maximisation de l'index de Youden, les valeurs seuils optimales d'index kappa étaient décroissantes au cours du suivi : 30.2 [21.2; 227.2] à 12 mois, et 17.7 [2.1; 227.2] à 24 mois.

La régression de Cox montrait que le risque de nouvelle lésion T2 chez les patients SRI augmentait de 8% à chaque fois que l'index kappa augmentait de 10 points (**tableau 21**). Enfin, l'index kappa était la variable ayant la plus grande capacité de prédiction de nouvelle lésion T2 (indice-c à 0.70), plus élevée que le nombre de localisation atteintes sur IRM initiale (indice-c à 0.54), que la

présence de lésion T1 rehaussée (indice-c à 0.58) et que la présence de BOC (indice-c à 0.62).

Tableau 21. Hazard ratio et indices de concordances estimant le risque de nouvelle lésion T2 chez les patients SRI

	n	Valeur	Hazard Ratio	IC 95%	p-value	Indice-c
Aucune	-	-	-	-	-	0.50
Sexe (masculin)	36	-	0.43	[0.10; 1.87]	0.260	0.55
Age	36	Pour chaque 10 ans	0.85	[0.60; 1.21]	0.370	0.58
Nombre de localisations validant un critères de DIS avec lésion T2 sur l'IRM initiale	36	2	1.84	[0.16; 20.62]	0.620	0.54
	36	3 ou 4	2.65	[0.35; 20.03]	0.344	
Présence d'une lésion T1 rehaussée à l'IRM initiale	31	Oui	10.55	[1.90; 58.60]	0.007	0.58
Index kappa	36	Pour chaque augmentation de 10	1.08	[1.03; 1.13]	0.002	0.70
Index kappa positif (>8.9)	36	Positif	3.61	[1.46; 8.90]	0.005	0.70
BOC	36	Positif	2.10	[0.85; 5.19]	0.107	0.62

Légende : BOC : bandes oligoclonales, IC : intervalle de confiance

En utilisant l'index kappa comme variable binaire (positive ou négative selon le seuil de 8.9), l'apparition d'une nouvelle lésion T2 au cours du temps était prédite avec une meilleure sensibilité et une moins bonne spécificité qu'avec les BOC (**tableau 22**). L'analyse de survie montrait qu'un index kappa positif

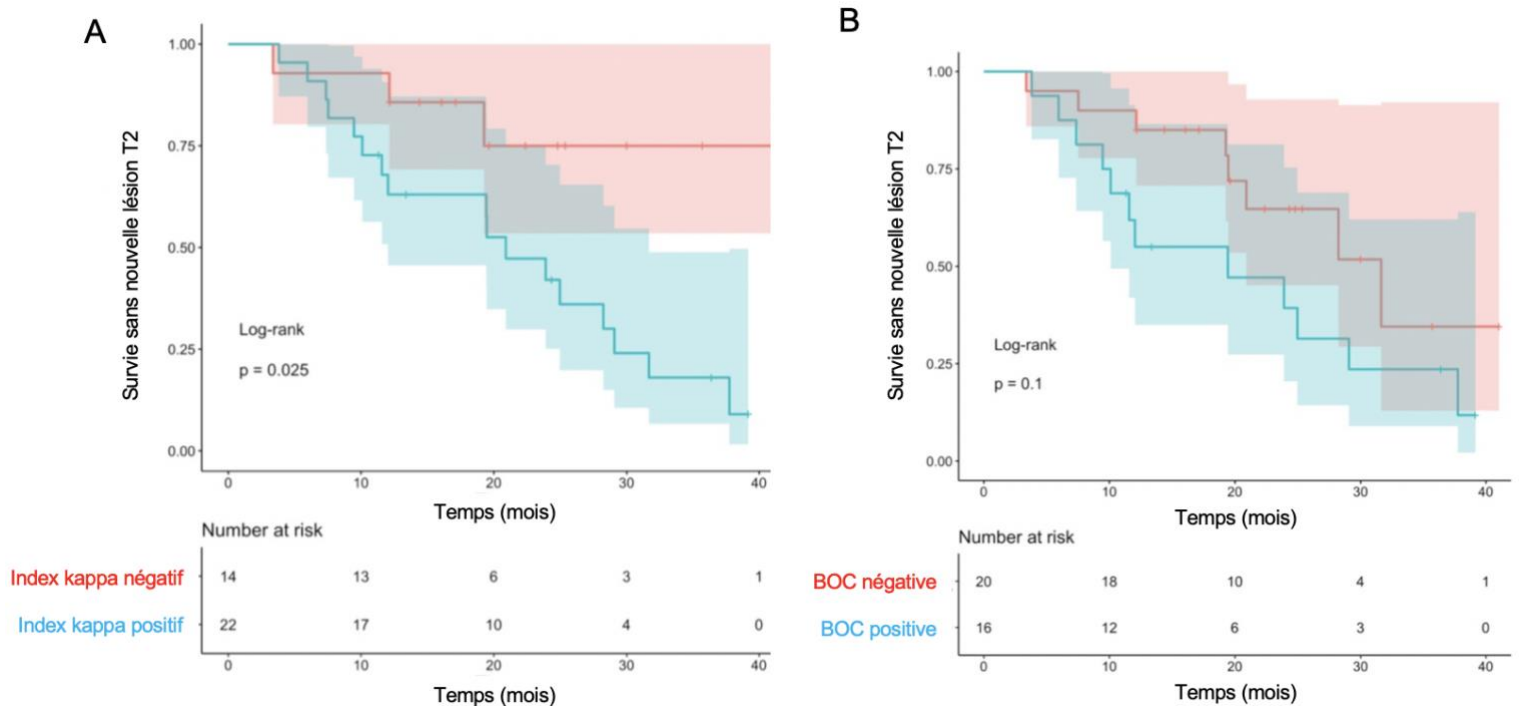
($p=.025$), contrairement à la présence de BOC ($p=.100$) prédisait l'apparition d'une nouvelle lésion T2 chez les patients SRI (**figure 14**). La durée médiane d'apparition d'une nouvelle lésion T2 était de 19 mois chez les patients SRI avec index kappa positif et n'était pas évaluable chez les patients SRI avec index kappa négatif (3 évènements).

Tableau 22. Performances de l'index kappa (binaire) et des BOC pour prédire l'apparition d'une nouvelle lésion T2 au cours du temps chez les patients SRI

	Index kappa positif (>8.9)			Présence de BOC		
	12	24	36	12	24	36
Temps (mois)	12	24	36	12	24	36
Sensibilité	0.88 [0.64; 1.00]	0.80 [0.60; 1.00]	0.87 [0.72; 1.00]	0.75 [0.45; 1.00]	0.58 [0.33; 0.84]	0.55 [0.31; 0.78]
Spécificité	0.48 [0.29; 0.67]	0.38 [0.12; 0.65]	0.25 [0.01; 0.68]	0.67 [0.49; 0.85]	0.62 [0.35; 0.88]	0.25 [0.01; 0.68]
VPP	0.33 [0.12; 0.74]	0.53 [0.31; 0.76]	0.72 [0.49; 0.94]	0.39 [0.14; 0.64]	0.57 [0.30; 0.84]	0.61 [0.34; 0.89]
VPN	0.93 [0.80; 1.00]	0.69 [0.38; 1.00]	0.46 [0.01; 1.00]	0.90 [0.77; 1.00]	0.63 [0.38; 0.88]	0.20 [0.01; 0.53]

Légende : BOC : bandes oligoclonales, VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative

Figure 14. Analyse de survie évaluant le risque de nouvelle lésion T2 chez les patients SRI



Légende : La figure montre le délai d'apparition d'une nouvelle lésion T2 selon le statut positif (ligne bleue) ou négatif (ligne rouge) de l'index kappa (A) ou des BOC (B) chez les patients SRI

IV.2.c. Capacité de prédiction d'une poussée clinique dans le groupe SCI

L'analyse de la courbe ROC dépendante du temps montrait que l'index kappa pouvait prédire l'apparition d'une poussée clinique au cours du suivi avec une AUC allant de 0.75 [0.65; 0.85] à 12 mois à 0.87 [0.74; 1.00] à 48 mois (**Figure 12C**). Après maximisation de l'index de Youden, les valeurs seuils optimales d'index kappa étaient décroissantes au cours du suivi : 23.6 [20.0; 98.4] à 12 mois, et 9.6 [6.9; 80.5] à 24 mois. La régression de Cox montrait que le risque de nouvelle poussée clinique chez les patients SCI augmentait de 4% à chaque fois que l'index kappa augmentait de 10 points (**tableau 23**). L'index kappa était la

variable ayant la plus grande capacité de prédiction de nouvelle poussée clinique (indice-c à 0.71), plus élevée que le nombre de localisation atteintes sur IRM initiale (indice-c à 0.65), que la présence de lésion T1 rehaussée (indice-c à 0.50) et que la présence de BOC (indice-c à 0.62).

Tableau 23. Hazard ratio et indices de concordances estimant le risque de nouvelle poussée clinique chez les patients SCI

	n	Valeur	Hazard Ratio	IC 95%	p-value	Indice-c
Aucune	-	-	-	-	-	0.50
Sexe (masculin)	146	-	0.44	[0.15; 1.31]	0.142	0.56
Age	146	Pour chaque 10 ans	0.69	[0.46; 1.03]	0.071	0.64
Évènement clinique	146	Névrite optique	0.59	[0.17; 2.09]	0.412	0.57
	146	Myélite	0.80	[0.29; 2.26]	0.667	
Nombre de localisations validant un critères de DIS avec lésion T2 sur l'IRM initiale	146	1	-	-	-	0.65
	146	2	-	-	-	
	146	3 ou 4	-	-	-	
Présence d'une lésion T1 rehaussée à l'IRM initiale	130	Oui	0.88	[0.36; 2.12]	0.772	0.50
Index kappa	146	Pour chaque augmentation de 10	1.04	[1.01; 1.07]	0.007	0.71
Index kappa positif (>8.9)	146	Positif	-	-	-	0.68
BOC	146	Positif	2.56	[0.99; 6.60]	0.053	0.62

Légende : Les HR ne pouvaient pas être estimés pour certaines variables (-) car aucun événement (poussée) n'était documenté dans l'un ou plusieurs des sous-groupes. BOC : bandes oligoclonales, IC : intervalle de confiance

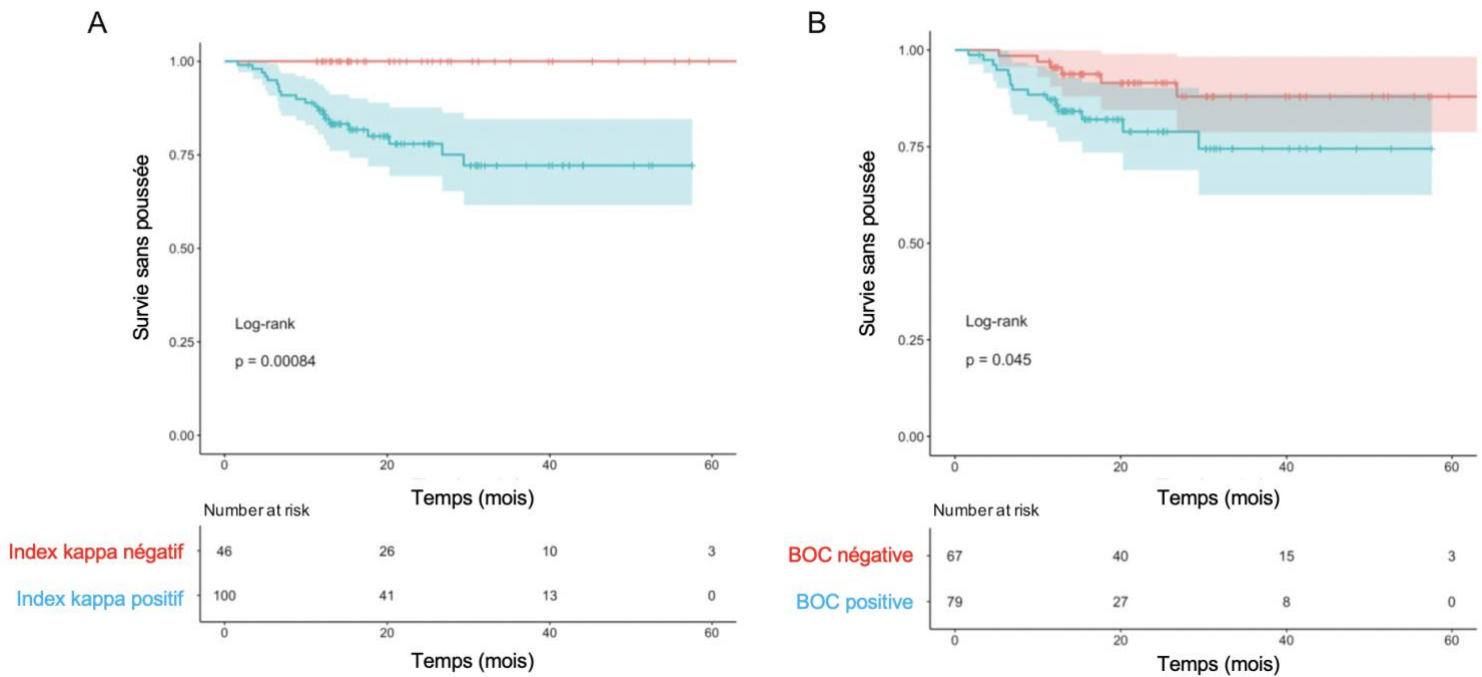
En utilisant l'index kappa comme variable binaire (positive ou négative selon le seuil de 8.9), l'apparition d'une nouvelle poussée clinique au cours du temps était prédite avec une meilleure sensibilité et une moins bonne spécificité qu'avec les BOC (**tableau 24**). L'analyse de survie montrait qu'un index kappa positif ($p=.008$), et la présence de BOC ($p=.045$) prédisaient l'apparition d'une nouvelle poussée clinique chez les patients SCI (**figure 15**). La durée médiane d'apparition d'une nouvelle poussée clinique était de 10 mois chez les patients SCI avec index kappa positif et ne pouvait être estimée chez les patients SCI avec index kappa négatif puisqu'aucun événement n'a été relevé durant le suivi.

Tableau 24. Performances de l'index kappa (binaire) et des BOC pour prédire l'apparition d'une nouvelle poussée clinique au cours du temps chez les patients SCI

	Index kappa positif (>8.9)			Présence de BOC		
	12	24	36	12	24	36
Temps (mois)	12	24	36	12	24	36
Sensibilité	1.00 [-; -]	1.00 [-; -]	1.00 [-; -]	0.77 [0.54; 1.00]	0.72 [0.51; 0.93]	0.68 [0.45; 0.91]
Spécificité	0.35 [0.27; 0.44]	0.40 [0.26; 0.53]	0.42 [0.23; 0.61]	0.49 [0.40; 0.58]	0.58 [0.45; 0.72]	0.65 [0.47; 0.84]
VPP	0.13 [0.06; 0.20]	0.23 [0.13; 0.32]	0.29 [0.16; 0.42]	0.13 [0.05; 0.21]	0.23 [0.12; 0.35]	0.31 [0.14; 0.49]
VPN	1.00 [-; -]	1.00 [-; -]	1.00 [-; -]	0.96 [0.91; 1.00]	0.92 [0.86; 0.99]	0.90 [0.81; 0.99]

Légende : BOC : bandes oligoclonales, VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive

Figure 15. Analyse de survie évaluant le risque de nouvelle poussée clinique chez les patients SCI



Légende : La figure montre le délai d'apparition d'une nouvelle poussée clinique selon le statut positif (ligne bleue) ou négatif (ligne rouge) de l'index kappa (A) ou des BOC (B) chez les patients SCI

IV.3. Discussion pour cette troisième étude

Notre étude met en évidence l'intérêt de l'index kappa pour prédire, dès l'identification de lésion suggestive de SEP symptomatique ou non, le risque de nouvelle lésion inflammatoire radiologique ou le risque de nouvelle poussée clinique (uniquement chez les patients SCI). Malgré la courte durée du suivi (environ 2 ans), nos résultats sont renforcés par la comparaison de l'index kappa avec les BOC, puisque ces dernières sont connues pour prédire le risque de poussée clinique chez les patients ayant présenté un premier événement démyélinisant.¹⁸

IV.3.a Prédiction clinique et radiologique chez les patients SCI

Nos résultats suggèrent que les patients SCI avec index kappa positif ont un risque 17 fois supérieur de nouvelle lésion radiologique T2 comparé aux patients avec index kappa négatif. Ce risque n'est pas calculable lorsqu'il s'agit d'estimer le risque de nouvelle poussée clinique puisqu'aucun patient SCI avec un index kappa négatif n'a présenté de poussée durant le suivi. Nos résultats montrent que l'utilisation de l'index kappa permet également de quantifier le risque de nouvelle lésion T2, puisque ce dernier est multiplié par 2 pour chaque augmentation de 150 points de l'index kappa. En pratique clinique, cela implique que l'index kappa peut être utilisé de manière dichotomique pour exclure les patients à risque en cas d'index négatif puis, en cas d'index positif, de stratifier ce risque sur la base de la valeur de l'index.

A notre connaissance, seules 3 autres études se sont intéressées à évaluer si l'index kappa permettait de prédire l'évolution clinique ou radiologique chez les patients ayant un premier événement démyélinisant.^{117,118}

L'étude autrichienne,¹¹⁷ monocentrique et rétrospective, s'est intéressée à évaluer si l'index kappa au diagnostic pouvait prédire l'apparition d'une seconde poussée à 4 ans, chez 88 patients SCI (dont 80% remplissaient les critères McDonald 2017). Trente-huit (43%) patients ont présenté une poussée durant le suivi. Grâce à un modèle de Cox multivarié ajusté sur l'âge, le sexe, le nombre de lésion radiologique T2 et T1 rehaussée par le gadolinium sur l'IRM initiale, et l'introduction d'un traitement immuno-actif au cours du suivi, ils ont montré que l'index kappa permettait de prédire l'apparition d'une seconde poussée ($p=.009$) et que ce risque était multiplié par 2 à 1 an et par 4 à 2 ans pour chaque augmentation de 100 points de l'index kappa.¹¹⁷

L'étude espagnole,¹¹⁸ basée sur l'étude rétrospective de leur cohorte nationale, s'est intéressée à évaluer si la positivité de l'index kappa (selon différents seuils) permettait de prédire (i) l'apparition d'une nouvelle poussée clinique ou (ii) la satisfaction des critères de DIS et DIT, à 5 ans, chez 214 patients (dont 56% remplissaient les critères McDonald 2017). Cent-quarante-neuf (70%) patients ont présenté une poussée et 168 (79%) les critères de DIS et DIT durant le suivi. Grâce à un modèle de Cox multivarié incluant l'âge, le nombre de lésion T2, et les BOC comme covariables, un index kappa positif prédisait le risque de poussée clinique avec un Hazard ratio de 2.1 ($p=.035$). Les BOC ne prédisait pas ce risque de manière statistiquement significative (Hazard ratio 1.6, $p=.139$).

Le même modèle était utilisé pour prédire la capacité à satisfaire les critères de DIS et DIT au cours du suivi. Dans ce modèle, la positivité de l'index kappa (Hazard ratio 4.9, $p<.0001$) et la positivité des BOC (Hazard ratio 2.2, $p=.004$) prédisaient la DIS et DIT.

Enfin cette étude a aussi évalué les performances des critères McDonald 2017 pour prédire le diagnostic de SEP en comparant l'utilisation des BOC à celle de la positivité de l'index kappa. En faisant cela, l'utilisation de l'index kappa à la place des BOC au sein des critères McDonald 2017 permet d'augmenter leur précision de 4.2% (-2.6 ; 11.1) avec un gain de sensibilité de 3.3% (-4.4 ; 11.0) et de spécificité de 6.5% (-3.8 ; 19.4).

L'ensemble des données disponibles à ce jour suggèrent donc que l'index kappa peut être utilisé au même titre que les BOC, dans la réflexion diagnostique et pronostique des patients présentant un premier événement démyélinisant.

IV.3.b Prédiction clinique et radiologique chez les patients SRI

Nos résultats suggèrent que, comme chez les patients SCI, l'index kappa prédit le risque de nouvelle lésion T2 au cours du suivi. En effet, les patients SRI avec un index kappa positif ont un risque de nouvelle lésion T2 3.6 fois plus élevé que les patients avec index kappa négatif. Ce risque est multiplié par 2 à chaque augmentation de 120 point de l'index kappa. Malheureusement, compte tenu de la faible proportion de patients SRI ayant présenté un événement clinique au cours du suivi (n= 7), l'estimation d'un risque clinique n'a pas pu être calculé.

Les critères diagnostics du SRI ont été révisés récemment¹¹⁹ et ont intégré deux éléments nouveaux : (i) la présence de BOC, et (ii) l'apparition de nouvelles lésions T2 au cours des IRM de suivi, tous deux étant des marqueurs prédictifs de maladie cliniquement définie.^{4-6,119,120} Nos résultats nécessitent donc d'être explorés sur un plus large échantillon afin de déterminer si l'index kappa permet de prédire l'évolution clinique chez les patients SRI. Cette question est d'importance aujourd'hui, puisqu'il a été montré dans 2 essais thérapeutiques randomisés indépendants, que l'utilisation de traitements immuno-actifs chez les patients SRI retarde l'apparition des premiers symptômes de la maladie.^{121,122} Ces résultats sont aujourd'hui difficilement applicables en pratique clinique en l'absence de biomarqueur prédictif fiable qui permette de sélectionner les patients à traiter, puisqu'environ 50% des patients SRI ne développent pas d'événement clinique à 10 ans.⁵

IV.3.c Prédiction du handicap chez les patients SEP

Une équipe suédoise¹²³ a évalué la capacité de l'index kappa à prédire l'aggravation du handicap neurologique indépendant des poussées (PIRA)^{1,2} chez 131 patients SCI (87% remplissant les critères McDonald 2017) recrutés

rétrospectivement à partir de données de registre. Le délai médian de suivi était de 41 mois, au cours duquel 18 (14%) patients ont été classés PIRA (progression indépendante of relapse activity). Grâce à un modèle de Cox multivarié, ajusté sur l'âge, le sexe, l'initiation d'un traitement immuno-actif, et l'activité de la maladie au diagnostic, les auteurs montraient que l'index kappa prédisait le PIRA (Hazard ratio 1.005, $p=.002$). Les patients ayant un index kappa > 100 avait un risque multiplié par 4 de développer un PIRA par rapport aux patients avec index kappa faible.

Une équipe espagnole ¹²⁴ a étudiée si l'index kappa permettait de prédire le temps d'apparition d'un handicap neurologique (basé sur le fait que les patients devaient atteindre un EDSS ≥ 3.0) en étudiant rétrospectivement 52 patients SEP. La durée du suivi était de 5 ans et le score EDSS médian à l'inclusion était à 2.0. Sept (13%) patients ont atteints un score EDSS à 3.0 durant l'étude. Le modèle de Cox multivarié incluant comme covariable l'âge, le sexe, et l'EDSS initial montrait qu'un index kappa > 58 prédisait le handicap neurologique à 5 ans (Hazard ratio 12.4, $p=.047$).

En l'absence d'étude validant ces données préliminaires, aucune conclusion ne peuvent être clairement établies même s'il semblerait que l'index kappa pourrait avoir un rôle dans la prédiction du handicap neurologique.

Ce travail (disponible à la fin de la thèse, Annexe 4) a été publié dans le journal *Neurology Neuroimmunology Neuroinflammation* (Rang A, IF 11.36).

Points clés de la troisième étude

- L'index kappa, mesuré à la phase diagnostique, prédit l'apparition de nouvelles lésions radiologiques à court terme chez les patients SCI et SRI
- L'index kappa, mesuré à la phase diagnostique, prédit l'apparition d'une nouvelle poussée clinique à court terme chez les patients SCI
- L'index kappa semble mieux prédire l'évolution clinico-radiologique à court terme que les BOC
- L'utilisation de l'index kappa comme variable quantitative permet de mesurer le risque évolutif des patients SCI et SRI

V. Conclusions et perspectives

La synthèse intrathécale d'immunoglobulines, actuellement prouvée par la présence de BOC surnuméraires dans le LCR, est un élément qui permet de prouver indirectement la présence d'une activité lymphocytaire B méningée. Cet outil est primordial dans la démarche diagnostique des patients suspects de maladie inflammatoire neurologique centrale – mais également pronostique chez les patients atteints de SEP si bien que les critères diagnostics actuels incluent la présence de BOC comme biomarqueur remplaçant la dissémination temporelle.

Les résultats de cette thèse, en accord avec d'autres travaux menés de manière indépendante, montrent que la mise en évidence d'une synthèse locale de CLL kappa, par le calcul de l'index ou de la FI kappa, est un outil diagnostique au moins aussi efficace que les BOC pour identifier les patients atteints de SEP. Notre travail démontre que l'utilisation en pratique clinique de l'index kappa est équivalente à celle de la FI kappa, décrite par certaines équipes comme supérieure. L'index kappa est un outil d'autant plus robuste que sa valeur n'est pas influencée par la présentation clinique de la maladie ou la prise de traitement immuno-actif avant le recueil, élément important, puisqu'une corticothérapie est parfois débutée en urgence.

La dernière partie de cette thèse met également en avant l'intérêt pronostic de l'index kappa, étant un marqueur d'évolution clinique et radiologique des patients présentant un premier événement clinique évocateur de SEP. Ce travail, associé à celui de Arrambide et al. et Berek et al.^{117,118} doivent faire considérer le dosage des CLL kappa, au même titre que les BOC, comme référence pour prouver une synthèse locale d'immunoglobulines, permettant de satisfaire la dissémination temporelle chez les patients présentant un premier événement clinique démyélinisant.

L'intérêt des CLL kappa chez les patients SRI n'est pas aussi clairement démontrée. Notre travail suggère que l'index kappa est un outil prédictif d'évolution radiologique avec des performances, encore une fois, au moins équivalentes à celle des BOC. En revanche, aucune conclusion ne peut être tirée sur sa capacité à prédire le risque de conversion clinique. Cette question devra faire l'objet d'une étude spécifique avec des effectifs plus importants, dont les conclusions pourraient aboutir à des recommandations thérapeutiques.

De nombreuses questions restent non résolues :

Malgré la bonne sensibilité des CLL kappa pour le diagnostic de SEP, il n'en demeure pas moins qu'une faible proportion (environ 10%) de patients ne présentent pas de synthèse locale de CLL.

Il n'existe, à notre connaissance, aucune étude ayant décrit le phénotype clinico-radiologique de ces patients. Nous menons actuellement une étude rétrospective et monocentrique, dont l'objectif est de décrire le phénotype des patients ayant (i) un diagnostic de SEP et (ii) un index kappa < 10. Une seconde étude sera initiée, sur cette même cohorte, visant à doser une nouvelle fois les CLL kappa sur échantillon congelé afin de vérifier la reproductibilité de la mesure. Cette étude permettra de déterminer l'intérêt d'un second dosage chez des patients hautement suspect de SEP et pour lesquels la première détermination des CLL kappa est négative.

Certaines maladies auto-immunes du SNC peuvent aussi présenter une forte activité lymphocytaire B méningée, comme la neuroborreliose ¹⁰² ou l'astrocytopathie à anticorps anti-GFAP.^{125,126} Même s'il ne s'agit pas de pathologies frontières avec la SEP, leur sous-représentation au sein des populations contrôles tend à surestimer les capacités diagnostiques des CLL kappa dans la SEP. Nous menons actuellement une étude rétrospective bi-

centrique en collaboration avec le Centre de Référence des syndromes neurologiques paranéoplasiques et encéphalites auto-immunes de Lyon dont le but est de comparer les valeurs d'index kappa entre des patients SEP, anti-GFAP, et anti-LGI1 (patient contrôle négatif) et de déterminer l'intérêt pronostic de l'index kappa chez les patients avec maladie médiée par les anti-GFAP.

VI. Références bibliographiques

1. Portaccio, E. *et al.* Progression is independent of relapse activity in early multiple sclerosis: a real-life cohort study. *Brain* **145**, 2796–2805 (2022).
2. Lublin, F. D. *et al.* How patients with multiple sclerosis acquire disability. *Brain* **145**, 3147–3161 (2022).
3. Okuda, D. T. *et al.* Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: The radiologically isolated syndrome. *Neurology* **72**, 800–805 (2009).
4. Okuda, D. T. *et al.* Radiologically Isolated Syndrome: 5-Year Risk for an Initial Clinical Event. *PLoS ONE* **9**, e90509 (2014).
5. Lebrun-Frenay, C. *et al.* Radiologically Isolated Syndrome: 10-YEAR Risk Estimate of a Clinical Event. *Ann. Neurol.* **88**, 407–417 (2020).
6. Lebrun-Frenay, C. *et al.* Radiologically isolated syndrome. *Lancet Neurol.* **22**, 1075–1086 (2023).
7. Cen, S., Gebregziabher, M., Moazami, S., Azevedo, C. J. & Pelletier, D. Toward precision medicine using a “digital twin” approach: modeling the onset of disease-specific brain atrophy in individuals with multiple sclerosis. *Sci. Rep.* **13**, 16279 (2023).
8. Rival, M. *et al.* Neurofilament Light Chain Levels Are Predictive of Clinical Conversion in Radiologically Isolated Syndrome. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **10**, e200044 (2023).
9. Dahlke, F. *et al.* Characterisation of MS phenotypes across the age span using a novel data set integrating 34 clinical trials (NO.MS cohort): Age is a key contributor to presentation. *Mult. Scler. J.* **27**, 2062–2076 (2021).
10. Lublin, F. D., Reingold, S. C., & National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis*. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* **46**, 907–911 (1996).

11. Polman, C. H. *et al.* A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **354**, 899–910 (2006).
12. Hauser, S. L. *et al.* Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **376**, 221–234 (2017).
13. Hauser, S. L. *et al.* Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **383**, 546–557 (2020).
14. Steinman, L. *et al.* Ublituximab versus Teriflunomide in Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **387**, 704–714 (2022).
15. Kappos, L. *et al.* Safety and efficacy of daclizumab beta in patients with relapsing multiple sclerosis in a 5-year open-label study (EXTEND): final results following early termination. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **14**, 175628642098794 (2021).
16. Montalban, X. *et al.* Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **376**, 209–220 (2017).
17. Tintore, M. *et al.* Contribution of the symptomatic lesion in establishing MS diagnosis and prognosis. *Neurology* **87**, 1368–1374 (2016).
18. Dobson, R., Ramagopalan, S., Davis, A. & Giovannoni, G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **84**, 909–914 (2013).
19. Poser, C. M. *et al.* New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann. Neurol.* **13**, 227–231 (1983).
20. McDonald, W. I. *et al.* Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **50**, 121–127 (2001).
21. Polman, C. H. *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* **69**, 292–302 (2011).

22. Lublin, F. D. *et al.* Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* **83**, 278–286 (2014).
23. Thompson, A. J. *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* **17**, 162–173 (2018).
24. Filippi, M. *et al.* Prediction of a multiple sclerosis diagnosis in patients with clinically isolated syndrome using the 2016 MAGNIMS and 2010 McDonald criteria: a retrospective study. *Lancet Neurol.* **17**, 133–142 (2018).
25. Van Der Vuurst De Vries, R. M. *et al.* Application of the 2017 Revised McDonald Criteria for Multiple Sclerosis to Patients With a Typical Clinically Isolated Syndrome. *JAMA Neurol.* **75**, 1392 (2018).
26. Gaetani, L. *et al.* 2017 revisions of McDonald criteria shorten the time to diagnosis of multiple sclerosis in clinically isolated syndromes. *J. Neurol.* **265**, 2684–2687 (2018).
27. Miller, D. *et al.* Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult. Scler. J.* **14**, 1157–1174 (2008).
28. Solomon, A. J., Naismith, R. T. & Cross, A. H. Misdiagnosis of multiple sclerosis: Impact of the 2017 McDonald criteria on clinical practice. *Neurology* **92**, 26–33 (2019).
29. Solomon, A. J. *et al.* Challenges in multiple sclerosis diagnosis: Misunderstanding and misapplication of the McDonald criteria. *Mult. Scler. J.* **27**, 250–258 (2021).
30. Landes-Chateau, C. *et al.* Identification of demyelinating lesions and application of McDonald criteria when confronted with white matter lesions on brain MRI. *Rev. Neurol. (Paris)* S0035378723010135 (2023)
doi:10.1016/j.neurol.2023.04.006.
31. Hedström, A. K. *et al.* DRB1–environment interactions in multiple sclerosis etiology: results from two Swedish case–control studies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **92**, 717–722 (2021).

32. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium & The Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* **476**, 214–219 (2011).
33. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium *et al.* Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* **365**, eaav7188 (2019).
34. Greer, J. M. The Role of HLA in MS Susceptibility and Phenotype. in *Emerging and Evolving Topics in Multiple Sclerosis Pathogenesis and Treatments* (eds. La Flamme, A. C. & Orian, J. M.) vol. 26 1–27 (Springer International Publishing, 2014).
35. Bjornevik, K. *et al.* Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* **375**, 296–301 (2022).
36. Lanz, T. V. *et al.* Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature* **603**, 321–327 (2022).
37. Hernan, M. A. Cigarette Smoking and Incidence of Multiple Sclerosis. *Am. J. Epidemiol.* **154**, 69–74 (2001).
38. Harroud, A. *et al.* Childhood obesity and multiple sclerosis: A Mendelian randomization study. *Mult. Scler. J.* **27**, 2150–2158 (2021).
39. Mexhitaj, I. *et al.* Abnormal effector and regulatory T cell subsets in paediatric-onset multiple sclerosis. *Brain* **142**, 617–632 (2019).
40. Segal, B. The Diversity of Encephalitogenic CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis and Its Animal Models. *J. Clin. Med.* **8**, 120 (2019).
41. Couloume, L. *et al.* Mass Cytometry Identifies Expansion of T-bet+ B Cells and CD206+ Monocytes in Early Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* **12**, 653577 (2021).
42. Michel, L. *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B

- lymphocyte migration across central nervous system barriers. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaaw0475 (2019).
43. Cayrol, R. *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat. Immunol.* **9**, 137–145 (2008).
44. Sabatino, J. J. *et al.* Anti-CD20 therapy depletes activated myelin-specific CD8⁺ T cells in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 25800–25807 (2019).
45. Attfield, K. E., Jensen, L. T., Kaufmann, M., Friese, M. A. & Fugger, L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 734–750 (2022).
46. Bar-Or, A. & Li, R. Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions, checks, and balances. *Lancet Neurol.* **20**, 470–483 (2021).
47. Machado-Santos, J. *et al.* The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8⁺ T lymphocytes and B cells. *Brain* **141**, 2066–2082 (2018).
48. Morille, J. *et al.* Multiple Sclerosis CSF Is Enriched With Follicular T Cells Displaying a Th1/Eomes Signature. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **9**, e200033 (2022).
49. Ott, M., Demisch, L., Engelhardt, W. & Fischer, P.-A. Interleukin-2, soluble interleukin-2-receptor, neopterin, l-tryptophan and ?2-microglobulin levels in CSF and serum of patients with relapsing-remitting or chronic-progressive multiple sclerosis. *J. Neurol.* **241**, 108–114 (1993).
50. Uzawa, A. *et al.* Markedly increased CSF interleukin-6 levels in neuromyelitis optica, but not in multiple sclerosis. *J. Neurol.* **256**, 2082–2084 (2009).
51. Lebrun, C. *et al.* Interleukin 17 alone is not a discriminant biomarker in early demyelinating spectrum disorders. *J. Neurol. Sci.* **368**, 334–336 (2016).
52. Vlad, B., Neidhart, S., Hilty, M., Ziegler, M. & Jelcic, I. Differentiating

- neurosarcoidosis from multiple sclerosis using combined analysis of basic CSF parameters and MRZ reaction. *Front. Neurol.* **14**, 1135392 (2023).
53. Otto, C., Wengert, O., Unterwalder, N., Meisel, C. & Ruprecht, K. Analysis of soluble interleukin-2 receptor as CSF biomarker for neurosarcoidosis. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **7**, e725 (2020).
54. Petereit, H.-F. *et al.* Soluble CSF interleukin 2 receptor as indicator of neurosarcoidosis. *J. Neurol.* **257**, 1855–1863 (2010).
55. Belghith, M. *et al.* Increased T-bet/GATA-3 and ROR- γ t /Foxp3 Ratios in Cerebrospinal Fluid as Potential Criteria for Definite Neuro-Behçet's Disease. *J. Clin. Med.* **11**, 4415 (2022).
56. Hou, M.-M. *et al.* Proportions of Th17 cells and Th17-related cytokines in neuromyelitis optica spectrum disorders patients: A meta-analysis. *Int. Immunopharmacol.* **75**, 105793 (2019).
57. Wang, Y. *et al.* Cytokine and Chemokine Profiles in Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Neuroimmunomodulation* **23**, 352–358 (2016).
58. Wang, Y. *et al.* NMO-IgG Induce Interleukin-6 Release via Activation of the NF- κ B Signaling Pathway in Astrocytes. *Neuroscience* **496**, 96–104 (2022).
59. Kaneko, K. *et al.* CSF cytokine profile in MOG-IgG+ neurological disease is similar to AQP4-IgG+ NMOSD but distinct from MS: a cross-sectional study and potential therapeutic implications. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **89**, 927–936 (2018).
60. Fujihara, K. *et al.* Interleukin-6 in neuromyelitis optica spectrum disorder pathophysiology. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **7**, e841 (2020).
61. Guo, T. *et al.* Soluble TREM2 is a potential biomarker for the severity of primary angiitis of the CNS. *Front. Immunol.* **13**, 963373 (2022).
62. Maeyama, M. *et al.* Multi-marker algorithms based on CXCL13, IL-10, sIL-2 receptor, and β 2-microglobulin in cerebrospinal fluid to diagnose CNS

lymphoma. *Cancer Med.* **9**, 4114–4125 (2020).

63. Ferreri, A. J. M. *et al.* MYD88 L265P mutation and interleukin-10 detection in cerebrospinal fluid are highly specific discriminating markers in patients with primary central nervous system lymphoma: results from a prospective study. *Br. J. Haematol.* **193**, 497–505 (2021).

64. Ungureanu, A. *et al.* CSF interleukin 6 is a useful marker to distinguish pseudotumoral CNS inflammatory diseases from primary CNS lymphoma. *J. Neurol.* **268**, 2890–2894 (2021).

65. Rubenstein, J. L. *et al.* CXCL13 plus interleukin 10 is highly specific for the diagnosis of CNS lymphoma. *Blood* **121**, 4740–4748 (2013).

66. Michel, L. *et al.* B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation. *Front. Immunol.* **6**, (2015).

67. Bar-Or, A. *et al.* Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann. Neurol.* **67**, 452–461 (2010).

68. Duddy, M. *et al.* Distinct Effector Cytokine Profiles of Memory and Naive Human B Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* **178**, 6092–6099 (2007).

69. Li, R. *et al.* Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci. Transl. Med.* **7**, (2015).

70. Li, R. *et al.* Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* **6**, (2016).

71. Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E. & Aloisi, F. Detection of Ectopic B-cell Follicles with Germinal Centers in the Meninges of Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Brain Pathol.* **14**, 164–174 (2004).

72. Magliozzi, R. *et al.* Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical

- pathology. *Brain* **130**, 1089–1104 (2006).
73. Ramesh, A. *et al.* A pathogenic and clonally expanded B cell transcriptome in active multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 22932–22943 (2020).
74. Comi, G. *et al.* Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann. Neurol.* **89**, 13–23 (2021).
75. Hauser, S. L. *et al.* B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **358**, 676–688 (2008).
76. Lechner-Scott, J. *et al.* The frequency of CSF oligoclonal banding in multiple sclerosis increases with latitude. *Mult. Scler. J.* **18**, 974–982 (2012).
77. Nakano, T. *et al.* Free immunoglobulin light chain: Its biology and implications in diseases. *Clin. Chim. Acta* **412**, 843–849 (2011).
78. Basile, U. *et al.* Free light chains: Eclectic multipurpose biomarker. *J. Immunol. Methods* **451**, 11–19 (2017).
79. Bradwell, A. R. *et al.* Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin. Chem.* **47**, 673–680 (2001).
80. Dispenzieri, A. *et al.* International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* **23**, 215–224 (2009).
81. Gertz, M. A. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2022 update on diagnosis, prognosis, and treatment. *Am. J. Hematol.* **97**, 818–829 (2022).
82. Rudick, R. A., Pallant, A., Bidlack, J. M. & Herndon, R. M. Free kappa light chains in multiple sclerosis spinal fluid. *Ann. Neurol.* **20**, 63–69 (1986).
83. Reiber, H., Zeman, D., Kušnierová, P., Mundwiler, E. & Bernasconi, L. Diagnostic relevance of free light chains in cerebrospinal fluid – The hyperbolic reference range for reliable data interpretation in quotient diagrams. *Clin. Chim. Acta* **497**, 153–162 (2019).

84. Kothur, K. *et al.* B Cell, Th17, and Neutrophil Related Cerebrospinal Fluid Cytokine/Chemokines Are Elevated in MOG Antibody Associated Demyelination. *PLOS ONE* **11**, e0149411 (2016).
85. Barros, P. O. *et al.* Prediction of disease severity in neuromyelitis optica by the levels of interleukin (IL)-6 produced during remission phase. *Clin. Exp. Immunol.* **183**, 480–489 (2016).
86. Kothur, K., Wienholt, L., Brilot, F. & Dale, R. C. CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: A systematic review. *Cytokine* **77**, 227–237 (2016).
87. Martellosio, J.-P., Leleu, X., Roblot, P., Martin, M. & Puyade, M. Dosage des chaînes légères libres : indications et méthodes. *Rev. Médecine Interne* **40**, 297–305 (2019).
88. Hegen, H. *et al.* Free light chains in the cerebrospinal fluid. Comparison of different methods to determine intrathecal synthesis. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM* **57**, 1574–1586 (2019).
89. Uzawa, A. *et al.* Interleukin-6 analysis of 572 consecutive CSF samples from neurological disorders: A special focus on neuromyelitis optica. *Clin. Chim. Acta* **469**, 144–149 (2017).
90. Presslauer, S. *et al.* Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: A multicenter study. *Mult. Scler. J.* **22**, 502–510 (2016).
91. Senel, M. *et al.* Cerebrospinal Fluid Immunoglobulin Kappa Light Chain in Clinically Isolated Syndrome and Multiple Sclerosis. *PLoS ONE* **9**, e88680 (2014).
92. Ferraro, D. *et al.* Kappa Index versus CSF Oligoclonal Bands in Predicting Multiple Sclerosis and Infectious/Inflammatory CNS Disorders. *Diagnostics* **10**, 856 (2020).
93. Leurs, C. *et al.* Kappa free light chains is a valid tool in the diagnostics of MS: A large multicenter study. *Mult. Scler. J.* **26**, 912–923 (2020).

94. Saadeh, R. S. *et al.* CSF Kappa Free Light Chains: Cutoff Validation for Diagnosing Multiple Sclerosis. *Mayo Clin. Proc.* **97**, 738–751 (2022).
95. Moskowitz, C. S. & Pepe, M. S. Comparing the predictive values of diagnostic tests: sample size and analysis for paired study designs. *Clin. Trials* **3**, 272–279 (2006).
96. Tate, J., Bazeley, S., Sykes, S. & Mollee, P. Quantitative serum free light chain assay--analytical issues. *Clin. Biochem. Rev.* **30**, 131–140 (2009).
97. Schwenkenbecher, P. *et al.* Reiber's Diagram for Kappa Free Light Chains: The New Standard for Assessing Intrathecal Synthesis? *Diagnostics* **9**, 194 (2019).
98. Senel, M. *et al.* CSF Free Light Chains as a Marker of Intrathecal Immunoglobulin Synthesis in Multiple Sclerosis: A Blood-CSF Barrier Related Evaluation in a Large Cohort. *Front. Immunol.* **10**, 641 (2019).
99. Konen, F. F. *et al.* The Increasing Role of Kappa Free Light Chains in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Cells* **10**, 3056 (2021).
100. Hegen, H. *et al.* Cerebrospinal fluid kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult. Scler. J.* **29**, 169–181 (2023).
101. Süße, M. *et al.* Decreased Intrathecal Concentrations of Free Light Chains Kappa in Multiple Sclerosis Patients Taking Very High Effective Disease-Modifying Treatment. *Diagnostics* **12**, 720 (2022).
102. Hegen, H. *et al.* Cerebrospinal fluid free light chains as diagnostic biomarker in neuroborreliosis. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM* **56**, 1383–1391 (2018).
103. Sanz Diaz, C. T., De Las Heras Flórez, S., Carretero Perez, M., Hernández Pérez, M. Á. & Martín García, V. Evaluation of Kappa Index as a Tool in the Diagnosis of Multiple Sclerosis: Implementation in Routine Screening Procedure. *Front. Neurol.* **12**, 676527 (2021).

104. Abid, M. A. *et al.* Evaluation of CSF kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis (MS): a comparison with oligoclonal bands (OCB) detection via isoelectric focusing (IEF) coupled with immunoblotting. *J. Clin. Pathol.* **76**, 353–356 (2023).
105. Hegen, H. *et al.* Cerebrospinal fluid kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus statement. *Mult. Scler. J.* **29**, 182–195 (2023).
106. Cavalla, P. *et al.* Kappa free light chains index in the differential diagnosis of Multiple Sclerosis from Neuromyelitis optica spectrum disorders and other immune-mediated central nervous system disorders. *J. Neuroimmunol.* **339**, 577122 (2020).
107. Monreal, E. *et al.* Establishing the best combination of the kappa free light chain index and oligoclonal bands for an accurate diagnosis of multiple sclerosis. *Front. Immunol.* **14**, 1288169 (2023).
108. Alves Martins, D. *et al.* Kappa free light chains: Diagnostic performance in multiple sclerosis and utility in a clinical laboratory. *Clin. Chim. Acta* **528**, 56–64 (2022).
109. Tortosa-Carreres, J. *et al.* Improving the efficiency of free kappa light chains as diagnostic biomarker of Multiple Sclerosis by using a novel algorithm. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **79**, 104997 (2023).
110. Kowarik, M. C. *et al.* Differential Effects of Fingolimod and Natalizumab on B Cell Repertoires in Multiple Sclerosis Patients. *Neurotherapeutics* **18**, 364–377 (2021).
111. Greenfield, A. L. *et al.* Longitudinally persistent cerebrospinal fluid B-cells can resist treatment in multiple sclerosis. *JCI Insight* (2019) doi:10.1172/jci.insight.126599.
112. Konen, F. F. *et al.* The Impact of Immunomodulatory Treatment on Kappa Free Light Chains as Biomarker in Neuroinflammation. *Cells* **9**, 842 (2020).

113. Rojas*, J. I., Tizio*, S., Patrucco, L. & Cristiano, E. Oligoclonal bands in multiple sclerosis patients: worse prognosis? *Neurol. Res.* **34**, 889–892 (2012).
114. Arrambide, G. *et al.* The value of oligoclonal bands in the multiple sclerosis diagnostic criteria. *Brain* **141**, 1075–1084 (2018).
115. Cotton, F., Kremer, S., Hannoun, S., Vukusic, S. & Dousset, V. OFSEP, a nationwide cohort of people with multiple sclerosis: Consensus minimal MRI protocol. *J. Neuroradiol.* **42**, 133–140 (2015).
116. Blanche, P., Dartigues, J. & Jacqmin-Gadda, H. Review and comparison of ROC curve estimators for a time-dependent outcome with marker-dependent censoring. *Biom. J.* **55**, 687–704 (2013).
117. Berek, K. *et al.* Kappa-Free Light Chains in CSF Predict Early Multiple Sclerosis Disease Activity. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **8**, e1005 (2021).
118. Arrambide, G. *et al.* The kappa free light chain index and oligoclonal bands have a similar role in the McDonald criteria. *Brain* **145**, 3931–3942 (2022).
119. Lebrun-Fréney, C. *et al.* The radiologically isolated syndrome: revised diagnostic criteria. *Brain* **146**, 3431–3443 (2023).
120. Lebrun-Fréney, C. *et al.* Risk Factors and Time to Clinical Symptoms of Multiple Sclerosis Among Patients With Radiologically Isolated Syndrome. *JAMA Netw. Open* **4**, e2128271 (2021).
121. Lebrun-Fréney, C. *et al.* Teriflunomide and Time to Clinical Multiple Sclerosis in Patients With Radiologically Isolated Syndrome: The TERIS Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* **80**, 1080 (2023).
122. Okuda, D. T. *et al.* Dimethyl Fumarate Delays Multiple Sclerosis in Radiologically Isolated Syndrome. *Ann. Neurol.* **93**, 604–614 (2023).
123. Rosenstein, I. *et al.* Intrathecal kappa free light chain synthesis is associated with worse prognosis in relapsing–remitting multiple sclerosis. *J.*

Neurol. **270**, 4800–4811 (2023).

124. Castillo-Villalba, J. *et al.* High Levels of Cerebrospinal Fluid Kappa Free Light Chains Relate to IgM Intrathecal Synthesis and Might Have Prognostic Implications in Relapsing Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* **13**, 827738 (2022).

125. Fang, B. *et al.* Autoimmune Glial Fibrillary Acidic Protein Astrocytopathy: A Novel Meningoencephalomyelitis. *JAMA Neurol.* **73**, 1297 (2016).

126. Gravier-Dumonceau, A. *et al.* Glial Fibrillary Acidic Protein Autoimmunity: A French Cohort Study. *Neurology* **98**, e653–e668 (2022).

VII. Annexes

Annexe 1

Formulaire d'information patient de la cohorte CyBIRD

Identification des profils cytokiniques impliqués dans les maladies auto-immunes du système nerveux central

Titre abrégé : CyBIRD study

IDRCB :

Promoteur de l'étude : CHU de Nice – Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation- 4, avenue Reine Victoria - BP 1179 - 06003 Nice Cedex1 - Tel: 04 92 03 40 11 - Fax: 04 92 03 40 75

Investigateur coordonnateur: Michael LEVRAUT - Unité de recherche clinique URRIS-UR2CA - Hôpital Pasteur2 - 30 voie Romaine - 06000 – Nice - Tel : 04.92.03.80.15 – Fax : 04.92.03.90.17

Lettre d'information aux Patients

Introduction

Vous êtes pris en charge au sein de L'Hôpital de Jour (l'HDJ) de Neurologie du Centre Hospitalier Universitaire de Nice (CHU de Nice) pour une suspicion de maladie inflammatoire. Lors de votre prise en charge, un bilan biologique est systématiquement réalisé.

A l'occasion de ce bilan, nous souhaitons utiliser des échantillons biologiques destinés à des fins de recherche exclusivement.

Avant de prendre votre décision, il est important que vous compreniez pourquoi cette étude est réalisée et ce qu'elle implique. Ce document est une lettre d'information, prenez le temps nécessaire pour la lire, et discutez-en avec vos proches si vous le souhaitez. N'hésitez pas à poser toutes vos questions au médecin qui vous suit dans le cadre de cette étude si vous souhaitez plus d'informations.

Si vous refusez de participer faites le savoir au médecin et à l'équipe de l'HDJ. Un refus de votre part ne modifiera en rien votre prise en charge médicale ultérieure. Vous êtes libre d'interrompre votre participation à tout moment. Une copie de cette lettre d'information vous sera remise.

Quel est l'objectif de cette étude ?

L'objectif est d'identifier des biomarqueurs spécifiques pour le diagnostic des maladies inflammatoires.

Pourquoi me propose-t-on de participer à cette étude ?

Vous avez été choisi(e) car votre profil correspond aux besoins de l'étude : vous venez à l'HDJ de Neurologie pour un bilan diagnostique.

Suis-je obligé(e) de participer ?

Votre participation à cette étude est entièrement libre et volontaire. Cette étude ne modifie pas les soins et les traitements qui vous seront dispensés.

Combien de personnes participeront à cette étude ?

Cette étude représente entre 50 et 75 patients par an.

Que dois-je faire si je participe ?

Si vous êtes d'accord, nous utiliserons 25 µL de sang et 25 µL de liquide céphalorachidien recueillis lors de votre bilan pour cette étude.

Quels sont les risques prévisibles de cette étude ?

Cette étude est dite « non interventionnelle », c'est-à-dire qu'elle ne modifie pas votre prise en charge, ni les rapports que vous avez avec votre médecin. Il n'y a pas

de risque attendu à participer à cette étude.

Toutes les précautions nécessaires sont prises pour assurer la sécurité de vos données médicales personnelles, identifiées par un numéro de participation sans mention de vos nom et prénom. Les informations qui peuvent vous identifier sont présentes uniquement dans un répertoire sécurisé et seront détruites en fin d'étude.

Conformément à la législation française en vigueur, le protocole a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personne XXX en date du XX/XX/XXXX. Ce comité a pour mission de vérifier la pertinence scientifique de l'étude, les conditions requises pour votre protection et le respect de vos droits.

Quels sont les bénéfices liés à ma participation à cette étude ?

Cette étude est destinée uniquement à la recherche. Vous ne tirerez aucun bénéfice direct de votre participation à l'étude. Les résultats de l'étude pourront aider les médecins neurologues dans le futur pour diagnostiquer les maladies.

Que se passera-t-il si je décide de me retirer de l'étude ?

Vous pouvez à tout moment décider de vous retirer de cette étude pour quelle que raison que ce soit, sans que cela ne modifie la relation que vous avez avec le médecin qui vous suit dans le cadre de cette étude ou avec votre médecin traitant. Si vous changez d'avis et décidez de ne plus participer à cette étude, vous pourrez demander la destruction des données collectées vous concernant.

Ma participation à l'étude restera-t-elle confidentielle ?

Dans le cadre de la recherche médicale à laquelle le service vous propose de participer, un traitement de vos données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche au regard de l'objectif de cette dernière.

A cette fin, les données médicales vous concernant et les données relatives à vos habitudes et votre qualité de vie, seront transmises au promoteur de la recherche ou aux personnes agissant pour son compte, en France. Ce recueil concerne vos données de santé et seront identifiées par un numéro de code et la première lettre de votre nom ainsi que la première lettre de votre prénom.

Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux

autorités de santé françaises ou étrangères, à d'autres entités du CHU de NICE. Le traitement de ces données est conforme à la loi Informatique et Libertés n° 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée et ainsi qu'au règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 applicable à compter du 25 mai 2018 (règlement général sur la protection des données). La base juridique de ce traitement est l'intérêt légitime poursuivi par le CHU de Nice pour améliorer la prise en charge de cette pathologie.

Le responsable du traitement informatique est le Directeur Général du CHU de Nice. Le CHU de Nice a désigné un Délégué à la Protection des Données (DPO) que vous pouvez joindre au dpo@chu-nice.fr et qui pourra répondre à toutes vos questions concernant la protection des données personnelles.

Vous pouvez exercer votre droit d'accès et de rectification aux informations qui vous concernent, ou une limitation du traitement relatif à votre personne en écrivant au Délégué à la Protection des Données (DPO) du CHU de NICE. De même vous aurez le droit de vous opposer au traitement automatisé des données vous concernant et vous avez également le droit de porter une réclamation auprès de la Commission nationale Informatique et Libertés si vos données ne sont pas traitées conformément à la réglementation des données personnelles

Les données de l'étude pourront être publiées dans des journaux médicaux et scientifiques sans que votre identité soit révélée. Le promoteur est responsable du traitement des données de l'étude qui seront conservées 15 ans.

Gestion des données et publication des résultats

Les données recueillies à l'occasion de cette recherche feront l'objet d'un traitement informatisé à des fins de saisie, d'analyse statistique et d'édition de résultats, coordonné et réalisé par le Centre Hospitalier Universitaire de Nice. Les résultats de l'étude pourront être publiés dans des revues scientifiques, mais votre identité ne sera jamais révélée. Vous pouvez être tenu(e) informé(e) des résultats globaux de la recherche une fois que celle-ci sera achevée, comme le prévoit l'article L1122-1 du code de la Santé Publique. Pour cela veuillez en faire la demande au médecin qui vous suit pour l'étude.

Nous vous remercions d'avoir pris connaissance de ce document et de votre éventuelle participation à l'étude. Si vous avez des questions, n'hésitez pas à les poser au médecin investigateur.

Michael LEVRAUT
Unité de recherche clinique URRIS-UR2CA
Hôpital Pasteur2
30 voie Romaine
06000 - Nice
Tel : 04.92.03.80.15

Annexe 2

Article 1

Journal (rang)

Frontiers in Immunology (B)



Kappa Free Light Chains, Soluble Interleukin-2 Receptor, and Interleukin-6 Help Explore Patients Presenting With Brain White Matter Hyperintensities

Michael Levraut^{1,2*}, Cassandre Landes¹, Lydiane Mondot^{1,3,4}, Mikael Cohen^{1,3}, Saskia Bresch³, Vesna Brglez^{5,6}, Barbara Seitz-Polski^{5,6} and Christine Lebrun-Frenay^{1,3}

¹ URRIS-UR2CA, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France, ² Département de Médecine Interne, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France, ³ Département de Neurologie, CRC SEP, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France, ⁴ Département de Radiologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France, ⁵ ImmunoPredict-UR2CA, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France, ⁶ Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Darin T. Okuda,
University of Texas Southwestern
Medical Center, United States

Reviewed by:

Jan Nils Lycke,
University of Gothenburg, Sweden
Noriko Isobe,
Kyushu University, Japan

*Correspondence:

Michael Levraut
michael.levraut@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Autoimmune and
Autoinflammatory Disorders,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 28 January 2022

Accepted: 01 March 2022

Published: 25 March 2022

Citation:

Levraut M, Landes C, Mondot L,
Cohen M, Bresch S, Brglez V,
Seitz-Polski B and Lebrun-Frenay C
(2022) Kappa Free Light Chains,
Soluble Interleukin-2 Receptor,
and Interleukin-6 Help Explore
Patients Presenting With Brain
White Matter Hyperintensities.
Front. Immunol. 13:864133.
doi: 10.3389/fimmu.2022.864133

Introduction: Many patients are referred to multiple sclerosis (MS) tertiary centers to manage brain white matter hyperintensities (WMH). Multiple diagnoses can match in such situations, and we lack proper tools to diagnose complex cases.

Objective: This study aimed to prospectively analyze and correlate with the final diagnosis, cerebrospinal fluid (CSF) interleukin (IL)-1 β , soluble IL-2 receptor (CD25), IL-6, IL-10, and kappa free light chains (KFLC) concentrations in patients presenting with brain WMH.

Methods: All patients over 18 years addressed to our MS tertiary center for the diagnostic workup of brain WMH were included from June 1, 2020, to June 1, 2021. Patients were separated into three groups—MS and related disorder (MSARD), other inflammatory neurological disorder (OIND), and non-inflammatory neurological disorder (NIND) groups—according to clinical presentation, MRI characteristics, and biological workup.

Results: A total of 176 patients (129 women, mean age 45.8 \pm 14.7 years) were included. The diagnosis was MSARD ($n = 88$), OIND ($n = 35$), and NIND ($n = 53$). Median CSF KFLC index and KFLC intrathecal fraction (IF) were higher in MSARD than in the OIND and NIND groups; $p < 0.001$ for all comparisons. CSF CD25 and IL-6 concentrations were higher in the OIND group than in both the MSARD and NIND groups; $p < 0.001$ for all comparisons. KFLC index could rule in MSARD when compared to NIND (sensitivity, 0.76; specificity, 0.91) or OIND (sensitivity, 0.73; specificity, 0.76). These results were similar to those with oligoclonal bands (sensitivity, 0.59; specificity, 0.98 compared to NIND; sensitivity, 0.59; specificity, 0.88 compared to OIND). In contrast, elevated CSF CD25 and IL-6 could rule out MSARD when compared to OIND (sensitivity, 0.58 and 0.88; specificity, 0.95 and 0.74, respectively).

Discussion: Our results show that, as OCBs, KFLC biomarkers are helpful tools to rule in MSARD, whereas elevated CSF CD25 and IL-6 rule out MSARD. Interestingly, CSF IL-6 concentration could help identify neuromyelitis optica spectrum disorder, myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease, and central nervous system (CNS) vasculitis. These results need to be confirmed within more extensive and multicentric studies. Still, they sustain that KFLC, CSF CD25, and CSF IL-6 could be reliable biomarkers in brain WMH diagnostic workup for differentiating MSARD from other brain inflammatory MS mimickers.

Keywords: white matter hyperintensities, multiple sclerosis, biomarker, IL-6, sIL-2R, kappa free light chains

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory and demyelinating central nervous system (CNS) disease. It presents as relapsing clinical demyelinating events or a progressive worsening neurological deficit disease with suggestive white matter hyperintensities on the brain or spinal cord MRI T2-weighted images. Clinical research has focused on diagnosing MS as early as possible to prevent relapse and disability by initiating disease-modifying treatments. In this condition, many patients may have an early demyelinating disease diagnosis: i) after a single demyelinating event (1, 2) or ii) before any clinical event (3, 4). In early-MS patients, biology may have an essential role in identifying an intrathecal B-cell activation by the detection of cerebrospinal fluid (CSF) oligoclonal bands (OCBs) on isoelectric focusing, which can replace dissemination in time in patients presenting with a typical first demyelinating event (1, 2). Unfortunately, misdiagnosis may occur in such situations (5, 6), while many other neurological diseases may mimic early MS (6, 7).

The immunopathology of MS is complex and implicates a large number of cells. CD4+ Th1 and Th17 cells are thought to promote while CD4+ Th2 and Treg cells are thought to downregulate inflammation in MS (8–10). B cells are also crucial effector cells in MS (11). In contrast, i) B cell-depletive therapies are effective in relapsing MS (12, 13), and ii) intrathecal immunoglobulin synthesis is part of the MS diagnostic criteria (1). However, we lack a reliable biomarker that could help separate MS from other inflammatory-mimicking diseases to avoid misdiagnosis.

During the last decade, many biomarkers have been explored. Kappa free light chains (KFLC), low-weighted immunoglobulin compounds, are a reliable biomarker in MS (14–16). This activated B-cell biomarker has the advantage, compared to OCBs, to quantify intrathecal B-cell activity by an automatized procedure. However, prospective data on the effectiveness of KFLC biomarkers are poor (14). Cytokines are low-molecular-weight proteins secreted by many cells, implicated in many immune functions, such as chemotaxis, activation, or repression of the immune cells. In autoimmune CNS diseases, cytokine measurement may reflect a unique immunopathological profile and help etiological diagnosis. It has been shown that CSF interleukin (IL)-6 is increased in neuromyelitis optica spectrum

disorders (NMOSD) or in myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease (MOGAD) compared to MS (17). Soluble IL-2 receptor (s-IL2R), also called CD25, is increased in many CNS granulomatosis, such as neurosarcoidosis or in infectious meningitis (18), and CSF IL-10 is now part of the diagnostic workup in CNS lymphoma (19). However, our knowledge about cytokine expression in such diseases comes from retrospective cohorts. Based on these data, our MS tertiary center included OCBs, KFLC, and CSF IL-1 β , sIL-2R, IL-6, and IL-10 concentration measurement in the routine diagnostic workup of patients presenting with white matter hyperintensities suggestive of MS.

Therefore, in this study, we prospectively evaluated the expression of KFLC biomarkers and CSF concentration of IL-1 β , sIL-2R (CD25), IL-6, and IL-10, and we correlated each biomarker measurement with diagnosis in patients referred to our MS center for suspected MS.

METHODS

Patients

All patients referred to our MS tertiary center in the University Hospital of Nice, France, were eligible for the study from June 1, 2020, to June 1, 2021. Patients were included if they i) were at least 18 years old and ii) had brain white matter hyperintensities on MRI T2-weighted images. According to routine care, all patients underwent the same diagnostic workup with a blood and CSF analysis and 3-T brain MRI.

At the end of the diagnostic workup, patients were separated into three groups according to their diagnosis. First, patients were divided as having an inflammatory or a non-inflammatory CNS disorder according to clinical presentation, MRI (topography, number, size, and gadolinium enhancement of the lesions), and biology (identification of blood or CSF red flags for MS). All non-inflammatory diagnoses were pooled together as a control group named non-inflammatory neurological disorder (NIND). Patients identified as having an inflammatory CNS disorder were separated into two groups. Patients who fulfilled the 2017 McDonald criteria for MS and clinically isolated syndrome (CIS) (1), or the 2009 criteria for radiologically isolated syndrome (RIS) (3, 20), were pooled together into the MS and related disorder (MSARD) group.

The other inflammatory patients were pooled together as having another inflammatory disease: the other inflammatory neurological disease (OIND) group.

A non-opposition to research was obtained for each patient according to French law. Our institutional review board approved the study design, and the study was registered on Clinical Trial (NCT05056740) as the CyBIRD (Cytokine and Brain Inflammatory Related Disorders) Study.

Kappa Free Light Chains and Cytokine Measurement

Blood and CSF were collected the same day for all patients. Fluids were sent within 2 h after collection into the Immunology Laboratory of Nice's University Hospital.

Detection of OCBs was performed by isoelectric focusing and subsequent immunoglobulin using IgG-specific antibody staining. OCB patterns were evaluated by experienced biologists and classified as negative or positive. A cutoff ≥ 2 CSF-restricted bands was used to define OCB positivity. CSF KFLC was measured on fresh samples using the turbidimetric analyzer Optilite[®] (The Binding Site, Birmingham, UK) with the serum-free light chain immunoassay Freelite[®] (The Binding Site, Birmingham, UK). Serum and CSF albumin were also measured with the same turbidimetric analyzer and permitted to calculate KFLC index and KFLC intrathecal fraction (KFLC IF) as follows:

- (i) KFLC index = KFLC quotient/albumin quotient with:

$$KFLC_{quotient} = CSFKFLC / serumKFLC$$

$$Albuminquotient = CSFalbumin / serumalbumin$$

- (ii) KLC IF was determined with Reiber's formula (21):

$$KFLC_{IF}(\%) = (KFLC_{loc} / CSFKFLC) \times 100 \text{ with}$$

$$KFLC_{loc} = (KFLC_{quotient} / KFLC_{quotient}(\text{lim})) \times \text{serum KFLC with}$$

$$KFLC_{quotient}(\text{lim}) = 3.27 (\text{albuminquotient}^2 + 33)^{0.5} - 8.2 (\times 10^{-3})$$

The turbidimetric analyzer's lower detection limit (LDL) for KFLC was 0.33 mg/L. For patients with CSF KFLC concentration lower than the LDL, an empirical value of KFLC = LDL/2 = 0.16 mg/L was assigned.

For cytokine measurement, CSF was directly centrifuged and kept frozen at -80°C until there were enough stored samples to perform analysis (16-well cartridges). CSF was thawed once, just before cytokine analysis. CSF IL-1 β , sIL-2R (or CD25), IL-6, and IL-10 concentration were determined using a mixture of 25 μl of CSF and buffer, in a custom-designed cartridge Ella (ProteinSimple, Santa Clara, CA, USA) for the detection of IL-1 β , sIL-2R, IL-6, and IL-10, according to the manufacturer's instructions. The LDL of ELISA kits for cytokine measurement was 0.32 pg/ml for IL-1 β , 6.56 pg/ml for sIL-2R, 0.5 pg/ml for IL-6, and 1.16 pg/ml for IL-10. As for CSF KFLC measurement, when the CSF cytokine concentration was under the LDL, an empirical CSF cytokine value of LDL/2 was assigned.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the online application EasyMedStat (version 3.14; www.easymedstat.com).

Data were presented as means with their SD for continuous values and counts and percentages for categorical variables for descriptive statistics. The data's normality and heteroscedasticity were assessed using the Shapiro–Wilk and Levene's tests. Constant values were compared using the Mann–Whitney U test. When more than two groups needed to be compared, the Kruskal–Wallis test was performed with a *post hoc* Conover's multiple comparison test. Categorical variables were compared using the chi-square test. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to assess the ability of each biomarker to predict MSARD diagnosis and to calculate the area under the curve (AUC). DeLong's test was performed to make pairwise comparisons of the predictive biomarkers according to MSARD diagnosis. The test implementation follows "Fast Implementation of DeLong's Algorithm for Comparing the Areas Under Correlated Receiver Operating Characteristic Curves, by Xu Sun and Weichao Xu." An optimal threshold that best discriminates MSARD from control populations was then determined with Youden's index. Based on the defined threshold values, patients were classified as positive or negative for each biomarker as a binary result. Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were then calculated for each biomarker. All comparisons were two-tailed. To identify the impact of demographic and clinical features on each biomarker concentration, CSF KFLC, IL-6, and CD25 were included in a multivariate linear regression model. According to the three identified groups, the explanatory variables were age, gender, disease duration, immune-modifying drug use at sampling, and final diagnosis. Data were checked for multicollinearity with the Belsley–Kuh–Welsch test. Patients with missing data were excluded from the analysis. The differences were considered significant when the *p*-value was < 0.05 .

RESULTS

Study Cohort

In the study period, two hundred seventeen patients have been referred to our center for brain white matter T2 hyperintensities. Forty-one patients were excluded because of subnormal brain MRI or age < 18 years. One hundred seventy-six patients were included in the study. After the diagnostic workup, patients were separated into the following groups: 88 patients (50%) in the MSARD group, 35 (20%) in the OIND group, and 53 (30%) in the NIND group (flowchart available in the **Supplementary Material, Figure S1**). MSARD patients were younger than OIND ($p = 0.002$) and NIND patients ($p = 0.001$). All MSARD patients, except for RIS, experienced a clinical demyelinating event, while 63% and 0% in the OIND and NIND groups, respectively, experienced the same ($p < 0.001$ for both comparisons). All groups were comparable for immune treatment exposure at sampling. MSARD patients had lower CSF protein level ($p < 0.001$), CSF white blood cell count ($p < 0.001$), and albumin quotient ($p < 0.001$) than had OIND patients but had a higher level of CSF immunoglobulin G (IgG) and positive OCB status ($p = 0.005$ and $p < 0.001$, respectively). All characteristics are shown in **Table 1**.

Quantification of Kappa Free Light Chains Biomarkers

Median values of CSF KFLC (**Figure 1A**), KFLC index (**Figure 1B**), and KFLC IF (**Figure 1C**) were higher in the MSARD group (2.59 (IQR 9.18) mg/L; 37.80 (IQR 132.07); 95.06% (IQR 22.09%), respectively) than in the NIND group (0.16 (IQR 0.06) mg/L, $p < 0.001$ for CSF KFLC; 2.38 (IQR 1.82), $p < 0.001$ for KFLC index; 10.11% (IQR 38.10%), $p < 0.001$ for KFLC IF) and the OIND group (0.43 (IQR 1.03) mg/L, $p = 0.001$ for CSF KFLC; 4.53 (IQR 7.35), $p < 0.001$ for KFLC index; 60.21% (IQR 66.98%), $p < 0.001$ for KFLC IF).

In the MSARD group, median values of CSF KFLC (figure in the **Supplementary Material, Figure S2A**), KFLC index (**Figure S2B**), and KFLC IF (**Figure S2C**) were lower in CIS (0.63 (IQR 1.64) mg/L, 14.2 (IQR 22.2), and 75.1% (IQR 87.19%), respectively) than in MS patients (3.8 (IQR 10.1) mg/L, 69.1 (IQR 161.23), and 96.6% (IQR 11.1%), respectively; $p < 0.001$ for all comparisons). There was no difference of KFLC biomarkers values between MS and RIS patients (3.4 (IQR 11.2) mg/L, 48.5 (IQR 213.6), and 94.2% (IQR 73.9%), for CSF KFLC ($p = 0.403$), KFLC index ($p = 0.377$), and KFLC IF ($p = 0.320$), respectively).

Quantification of Cerebrospinal Fluid IL-1 β , CD25, IL-6, and IL-10

CSF concentration of IL-1 β was often under the LDL of the analyzer (68% of the all cohort). Therefore, median values of

CSF IL-1 β (**Figure 2A**) were similar between groups: 0.16 (IQR 0.20) pg/ml in the MSARD group, 0.16 (IQR 0.17) pg/ml in the NIND group, and 0.16 (IQR 0.32) pg/ml in the OIND group. Median values of CSF CD25 (**Figure 2B**) were higher in the OIND group (45.9 (IQR 65.75) pg/ml) compared to the MSARD group (19.35 (IQR 12.12) pg/ml, $p < 0.001$), and the NIND group (15.7 (IQR 8.60) pg/ml, $p < 0.001$). Similar to CSF CD25, median values of CSF IL-6 (**Figure 2C**) were higher in the OIND group (13.6 (IQR 48.90) pg/ml) compared to the MSARD group (2.99 (IQR 1.67) pg/ml, $p < 0.001$), and the NIND group (2.68 (IQR 2.07) pg/ml, $p < 0.001$). CSF IL-10 concentration was under the LDL in most of the MSARD patients (67%) and the NIND patients (91%). Median values of CSF IL-10 (**Figure 2D**) were higher in the OIND group (1.40 (IQR 3.99) pg/ml) compared to the MSARD group (0.58 (IQR 0.69) pg/ml, $p < 0.001$) and the NIND group (0.58 (IQR 0.1) pg/ml, $p = 0.002$).

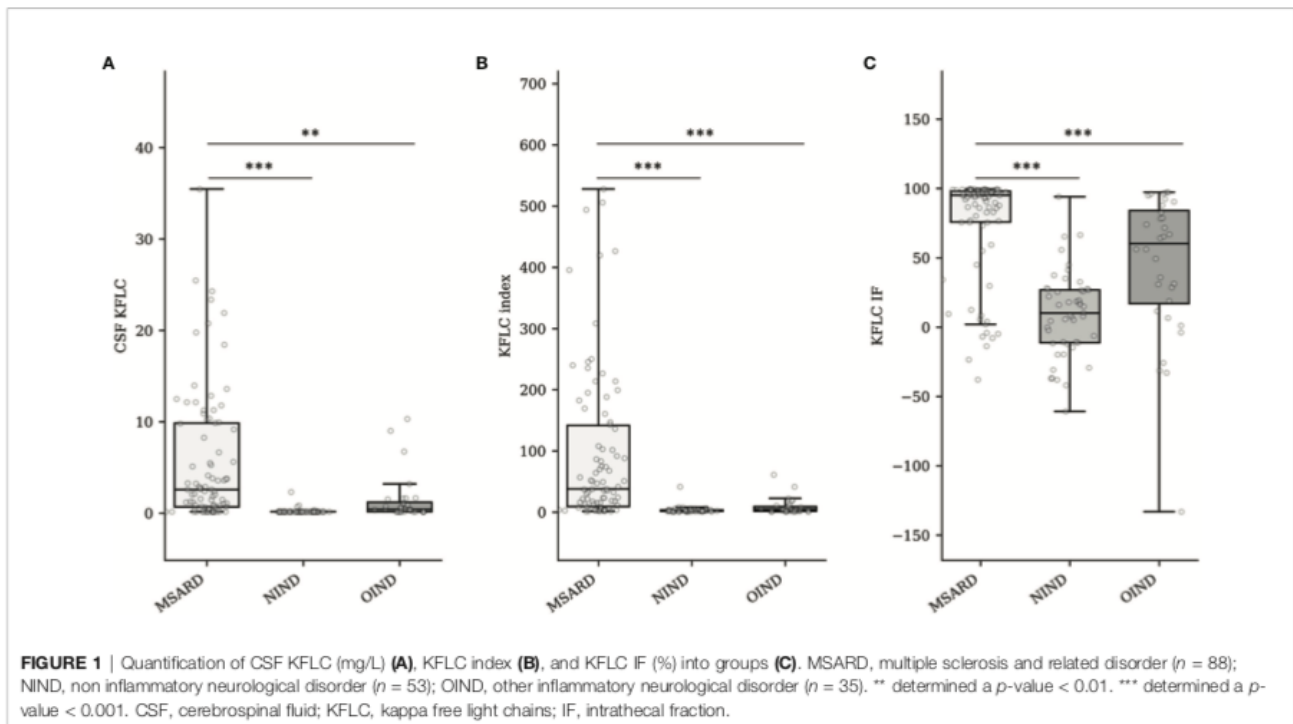
In the MSARD group, median values of CSF CD25 (**Figure S3A**) were higher in MS (20.5 (IQR 16.3) pg/ml) than in CIS patients (14.6 (IQR 11.4) pg/ml), $p = 0.023$. CSF CD25 median values were similar between MS and RIS patients (20.3 (IQR 7.9) pg/ml), $p = 0.836$. Median values of CSF IL-6 (**Figure S3B**) and IL-10 (**Figure S3C**) were similar between MS (3.1 (IQR 1.6) and 0.58 (IQR 0.8) pg/ml, respectively), RIS (2.5 (IQR 1.7) and 0.58 (IQR 0.2) pg/ml, respectively), and CIS patients (2.9 (IQR 2.1) and 0.58 (IQR 0.1) pg/ml, respectively), $p > 0.1$ for all comparisons.

TABLE 1 | Baseline demographic and clinical data.

	MSARD group $n = 88$	OIND group $n = 35$	p -Value MSARD vs. OIND	NIND group $n = 53$	p -Value MSARD vs. NIND
Median age, [IQR]	41.6 \pm 13.0	50.7 \pm 17.0	0.002	49.5 \pm 13.5	0.001
Female gender, n (%)	67 (76)	19 (54)	0.028	43 (81)	0.535
Type of disease, n (%)	MS, 58 (66) CIS, 22 (25) RIS, 8 (9)	NMOSD/MOGAD, 9 (26) CNS vasculitis, 9 (26) CNS lymphoma, 3 (9) Immune encephalitis, 2 (6) CNS infection, 2 (6) Neurosarcoidosis, 2 (6) Other, 8 (23)	–	Migraine, 13 (25) SCVD, 18 (34) Stroke, 3 (6) Ischemic ON, 1 (2) Myelopathy, 3 (6) Cerebellar atrophy, 2 (4) Mechanical, 6 (11) Other, 7 (13)	–
Clinical event, n (%)	80 (91)	22 (63)	<0.001	0* (0)	<0.001
Optic neuritis, n (%)	7 (8)	4 (11)	–	0 (0)	–
Myelitis, n (%)	41 (47)	8 (23)	–	0 (0)	–
Brainstem/cerebellar, n (%)	20 (23)	4 (11)	–	0 (0)	–
Other, n (%)	12 (13)	6 (16)	–	0 (0)	–
Autoimmune medical history, n (%)	14 (16)	6 (17)	1	16 (30)	0.056
Immune-modifying drug at sampling, n (%)	8 (9)	5 (15)	0.349	6 (11)	0.773
Gadolinium enhancement on baseline MRI, n (%)	28 (33)	21 (60)	0.008	2 (4)	<0.001
Median disease duration (months), [IQR]	5.3 [1.3; 35.5]	1.3 [0.3; 2.9]	<0.001	12.3 [3.8; 19.5]	0.108
Median CSF protein concentration (g/L), [IQR]	0.33 [0.27; 0.40]	0.45 [0.31; 0.94]	<0.001	0.33 [0.26; 0.48]	0.667
Median CSF WBC count (μ l), [IQR]	2 [0; 5]	2 [0; 25]	<0.001	0 [0; 1]	0.015
Median albumin quotient (%), [IQR]	0.44 [0.33; 0.58]	0.71 [0.51; 1.45]	<0.001	0.47 [0.36; 0.66]	0.308
Median IgG index, [IQR]	0.75 [0.61; 0.99]	0.60 [0.50; 0.71]	0.005	0.56 [0.50; 0.61]	<0.001
Median serum KFLC (mg/L), [IQR]	13.8 [11.7; 16.2]	15.0 [11.5; 19.6]	0.017	13.7 [11.2; 16.8]	0.258
Positive OCBs status, n (%)	52 (60)	4 (11)	<0.001	1 (2)	<0.001

CIS, clinically isolated syndrome; CNS, the central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; IQR, interquartile range; KFLC, kappa free light chains; MOGAD, myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease; MS, multiple sclerosis; MSARD, multiple sclerosis and related disorder; NIND, non-inflammatory neurological disorder; NMOSD, neuromyelitis optica spectrum disorder; OCBs, oligoclonal bands; OIND, other inflammatory neurological disorder; ON, optic neuritis; RIS, radiologically isolated syndrome; SCVD, small cerebral vessel disease; WBC, white blood cell.

*Clinical event non-convulsive of demyelinating events (optic neuritis presented as an acute and non-painful event, myelopathies presented as progressive motor weakness of lower limbs).



Biomarker Diagnostic Performances

We analyzed the ability of the KFLC index, KFLC IF, CSF CD25, CSF IL-6, and CSF IL-10 to diagnose MSARD i) against a non-inflammatory-mimicking disease by the comparison of the MSARD and NIND groups and ii) against another inflammatory-mimicking disease by the comparison of the MSARD and OIND groups. CSF IL-1 β was not analyzed because of its low CSF concentration in most patients.

Kappa Free Light Chains Biomarkers Performed Better Than Cerebrospinal Fluid CD25, IL-6, and IL-10 in Separating Multiple Sclerosis and Related Disorder From Non-Inflammatory Neurological Disorder

KFLC index and KFLC IF had similar, and good, overall performances (AUC, 0.900 [0.849; 0.952] and 0.887 [0.830; 0.943], respectively) to diagnose MSARD compared to NIND. However, CSF CD25, CSF IL-6, and CSF IL-10 had lower performances (AUC, 0.596 [0.501; 0.690], 0.569 [0.467; 0.671], and 0.627 [0.565; 0.688], respectively) than both KFLC biomarkers ($p < 0.001$ for all comparisons). The thresholds that best separated MSARD from NIND were 8.4 for KFLC index, 73.1% for KFLC IF, 21.5 pg/ml for CSF CD25, 2.0 pg/ml for CSF IL-6, and 1.2 pg/ml for CSF IL-10. All data are shown in **Table 2**, and the ROC curves are available in the **Supplementary Material (Figure S4A)**.

These cutoffs, KFLC index, KFLC IF, CSF CD25, IL-6, and IL-10 were changed into binary variables, and patients were categorized as positive or negative for each biomarker.

As shown in **Table 3**, both OCBs and the KFLC index had good overall performances for MSARD diagnosis as compared to NIND. OCBs were more specific than the KFLC index (0.98 vs. 0.91, respectively) but less sensitive (0.59 vs. 0.76, respectively). However, the KFLC index diagnostic accuracy seemed to be higher than OCBs' (0.82 vs. 0.74). Interestingly, the combination of an elevated KFLC index and CSF IL-6 had the same specificity for MSARD diagnosis than OCBs (specificity of 0.96 vs. 0.98, respectively) with a higher sensitivity (0.69 vs. 0.59, respectively) and higher diagnostic accuracy (0.79 vs. 0.74).

Cerebrospinal Fluid IL-6, CD25, and Kappa Free Light Chains Index Showed Good Performances in Diagnosing Multiple Sclerosis and Related Disorder Compared to Other Inflammatory Neurological Disorder

When comparing MSARD to OIND, KFLC index showed better diagnostic performances than KFLC IF (AUC, 0.823 [0.746; 0.900], and 0.745 [0.652; 0.838] respectively, $p = 0.008$). In contrast with the comparison with the NIND group, in this situation, CSF CD25 and CSF IL-6 showed good diagnostic performances (AUC, 0.770 [0.656; 0.885], and 0.874 [0.798; 0.950], respectively), statistically similar to the KFLC index ($p = 0.358$, and $p = 0.436$, respectively). However, diagnostic performances of CSF IL-10 (AUC, 0.680 [0.566; 0.794]) were lower than those of both KFLC index ($p = 0.02$) and IL-6 ($p < 0.001$). The thresholds that best separated MSARD from OIND were 13.1 for KFLC index, 82.8% for KFLC IF, 41.5 pg/ml for CSF CD25, 4.1 pg/ml for CSF IL-6, and 2.4 pg/ml for CSF IL-10.

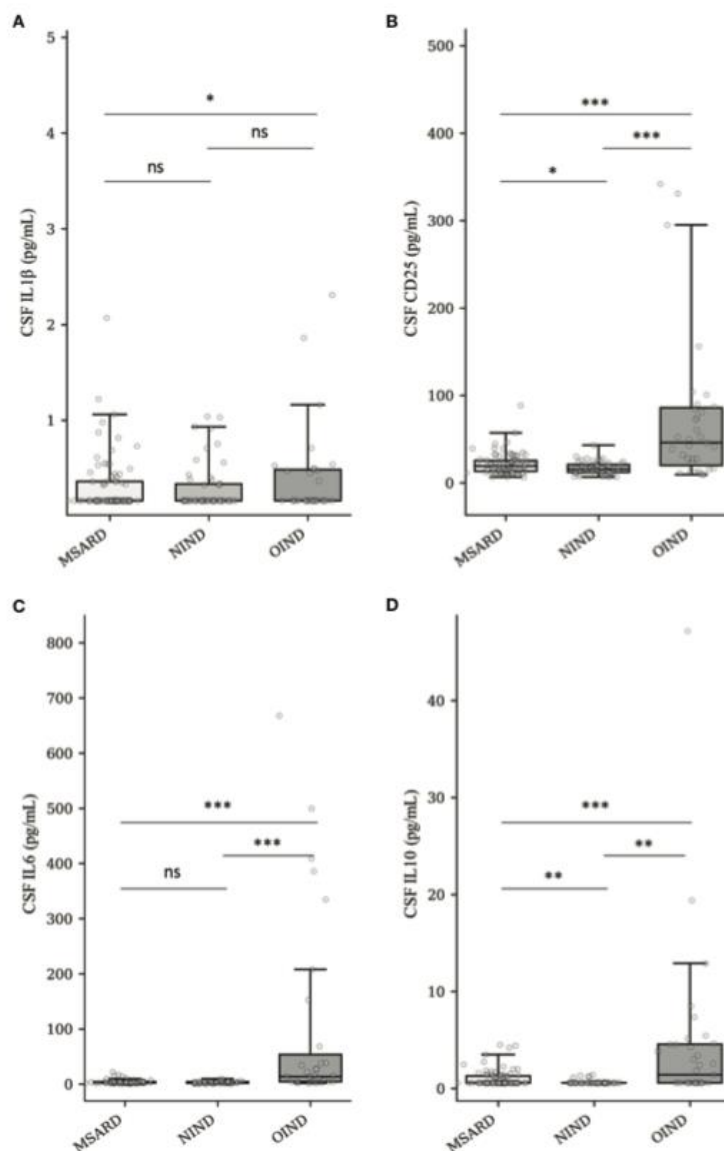


FIGURE 2 | Quantification of CSF IL-1 β (A), CD25 (sIL-2R) (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) into groups. MSARD, multiple sclerosis and related disorders ($n = 88$); NIND, non-inflammatory neurological disorders ($n = 53$); OIND, other inflammatory neurological disorders ($n = 35$); ns, non-significant ($p > 0.05$). * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. CSF, cerebrospinal fluid.

All data are shown in **Table 2**, and the ROC curves are available in the **Supplementary Material (Figure S4B)**.

As shown in **Table 4**, CSF IL-6 could separate both groups with better sensitivity and the same specificity than OCBs and a better specificity for the same sensitivity than the KFLC index (sensitivity of 0.74, 0.59, and 0.73 and specificity of 0.88, 0.88, and 0.76 for CSF IL-6, OCBs, and KFLC index, respectively). The better specific combination for MSARD diagnosis in such a situation was the association of low CSF IL-6 and CD25 (sensitivity 0.72, specificity 0.94).

Kappa Free Light Chains Index, Cerebrospinal Fluid CD25, and Cerebrospinal Fluid IL-6 Diagnostic Performances Needed to Be Studied in Homogenized Other Inflammatory Neurological Disorder Populations

As shown in **Figure 3A**, elevated KFLC index strongly suggests MS diagnosis independently of the compared OIND subgroups (median of 69.1, 5.49, 1.46, and 4.05 for MS, NMOSD/MOGAD, CNS vasculitis, and OIND diagnoses, respectively; $p < 0.001$ for all comparisons). The comparison between MS and CNS infection

TABLE 2 | Diagnostic performances of the different biomarkers for MSARD diagnosis compared to both control populations.

	MSARD vs. NIND <i>n</i> = 141			MSARD vs. OIND <i>n</i> = 123		
	AUC (%)	95% CI	Optimal threshold	AUC (%)	95% CI	Optimal threshold
KFLC index	90.0 ^a	[84.9; 95.2]	8.4	82.3	[74.6; 90.0]	13.1
KFLC IF	88.7 ^a	[83.0; 94.3]	73.1	74.5 ^c	[65.2; 83.8]	82.8
CSF CD25	59.6 ^b	[50.1; 69.0]	21.5	77.0 ^d	[65.6; 88.5]	41.5
CSF IL-6	56.9 ^b	[46.7; 67.1]	2.0	87.4 ^e	[79.8; 95.0]	4.1
CSF IL-10	62.7 ^b	[56.5; 68.8]	1.2	68.0	[56.6; 79.4]	2.4

CSF, cerebrospinal fluid; KFLC, kappa free light chains; MSARD, multiple sclerosis and related disorder; NIND, non-inflammatory neurological disorder; OIND, other inflammatory neurological disorder; AUC, area under the curve.

^aKFLC index and KFLC IF AUC are not statistically different ($p = 0.404$).

^bAUCs of CSF CD25, IL-6, and IL-10 were all lower than both KFLC biomarkers ($p < 0.001$ for all 6 comparisons). There was no AUC difference between CSF CD25 and CSF IL-6 ($p = 0.717$), CSF CD25 and CSF IL-10 ($p = 0.523$), and CSF IL-6 and CSF IL-10 ($p = 0.314$).

^cKFLC index and KFLC IF AUC are statistically different ($p = 0.008$).

^dCSF CD25 AUC is not statistically different than KFLC index AUC ($p = 0.358$), CSF IL-6 AUC ($p = 0.119$), or CSF IL-10 AUC ($p = 0.149$).

^eCSF IL-6 AUC is not statistically different than KFLC index AUC ($p = 0.436$) and CSF CD25 AUC ($p = 0.119$) and is higher than CSF IL-10 AUC ($p = 0.007$).

did not seem valid, while only two patients presented with a CNS infection in our cohort. The CSF CD25 concentration (**Figure 3B**) did not seem to be effective to separate MS from NMOSD/MOGAD (median CSF CD25 of 20.5 vs. 27.6 pg/ml for MS and NMOSD/MOGAD, respectively, $p = 0.755$). Nevertheless, CSF CD25 could separate MS from CNS vasculitis (median CSF CD25 of 81.0 pg/ml, $p < 0.001$) or other types of OIND (median CSF CD25 of 51.5 pg/ml, $p = 0.012$). Finally, CSF IL-6 (**Figure 3C**) seemed to be a good biomarker to distinguish MS from NMOSD/MOGAD (median CSF IL-6 of 3.1 vs. 27.0 pg/ml for MS and NMOSD/MOGAD, respectively, $p < 0.001$) and from CNS vasculitis (median CSF IL-6 for vasculitis of 27.7 pg/ml, $p < 0.001$). However, median CSF IL-6 concentrations were not different between MS and the other OIND ($p = 0.392$).

Cerebrospinal Fluid Kappa Free Light Chains, CD25, and IL-6 Concentrations Were Not Influenced by Age, Gender, Disease Duration, and Immune-Modifying Drug Use at Sampling

Based on the linear regression multivariate analysis model, CSF KFLC, CSF CD25, and CSF IL-6 concentrations were not influenced by age ($p = 0.423$, 0.508, and 0.891, respectively), gender ($p = 0.840$, 0.564, and 0.072, respectively), immune-modifying drug use at sampling ($p = 0.906$, 0.530, and 0.215, respectively), or disease duration ($p = 0.0931$, 0.163, and 0.126, respectively). The only factor associated with elevated CSF KFLC was MSARD diagnosis ($p < 0.001$ when compared to NIND group, and $p = 0.001$ when compared to the OIND group as reference), and the only one associated with elevated CSF CD25 and IL-6 was OIND diagnosis ($p = 0.018$ for CD25 when compared to MSARD as a reference, and $p = 0.003$ for IL-6 when compared to MSARD as reference). All data are shown in **Table 5**.

DISCUSSION

Our study evaluates prospectively multiple CSF biomarkers in patients presenting for a diagnostic workup of brain white matter

hyperintensities suggestive of MS. Our results suggest that activated B-cell biomarkers (OCBs or KFLC index/IF) may strongly recommend MSARD diagnosis regardless of the chosen control population. KFLC index has the advantage of being more sensitive than OCBs but suffered from less specificity. These results are consistent with previous retrospective (15, 16) and prospective (14, 22, 23) studies. We found that CIS patients may present with lower KFLC biomarkers values than MS and RIS patients. It may be explained that the 2017 McDonald criteria were applied for MS diagnosis. In doing so, all CIS patients presenting with radiological dissemination in space and positive OCBs were diagnosed as having MS. Therefore, in our cohort, most of the CIS patients presented with low intrathecal B-cell activity (negative OCBs).

We found that CSF CD25 and CSF IL-6 concentrations were lower in MSARD than in OIND. However, these biomarkers cannot rule in MSARD, while NIND patients also express low CSF CD25 and IL-6 concentrations. Nevertheless, high CSF CD25 and IL-6 could be helpful in rolling out MSARD diagnosis, while it would favor another MS-mimicking inflammatory CNS disease. Of note, elevated CSF CD25 presents the highest positive predictive value for OIND diagnosis, more than low KFLC index or negative OCBs. However, CSF CD25 lacks diagnostic performance in separating MSARD from NMOSD and MOGAD, whereas IL-6 seems to be an effective tool in such situations. This is why we think that CSF CD25 and CSF IL-6 should both be used in practice. Moreover, CSF KFLC, CD25, and IL6 concentrations were not influenced by age, gender, disease duration, or immune treatment used during sampling. This point is important, while diagnostic biomarkers need to be efficient at any time of the diagnostic workup.

Our results are consistent with previously published data, showing that a high KFLC index or KFLC IF is associated with MS diagnosis (14–16, 22, 24). KFLC has the advantage, compared to OCBs, in quantifying CSF B-cell activity. This is an important point to consider, while it has been shown, on pathological brain analysis, that MS patients present higher amounts of activated B cells than other inflammatory CNS disorders (25). However, many different KFLC index cutoff values were published to assess

TABLE 3 | Diagnostic performance of the different biomarkers comparing MSARD to NIND ($n = 141$).

	TP (n)	FP (n)	TN (n)	FN (n)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Accuracy (%)
Positive OCBs	52	1	52	36	59.1 [48.1; 69.5]	98.1 [89.9; 99.9]	98.1 [88.1; 99.7]	59.1 [52.8; 65.1]	73.8 [65.7; 80.8]
KFLCI > 8.4	67	5	48	21	76.1 [65.9; 84.6]	90.6 [79.3; 96.9]	93.1 [85.2; 96.9]	69.6 [60.9; 77.0]	81.6 [74.2; 87.6]
CD25 > 21.5	37	13	40	51	42.0 [31.6; 53.0]	75.5 [61.7; 86.2]	74.0 [62.6; 82.9]	44.0 [38.3; 49.8]	54.6 [46.0; 63.0]
IL-6 > 2.0	79	37	16	9	89.8 [81.5; 95.2]	30.2 [18.3; 44.3]	68.1 [63.8; 72.1]	64.0 [45.8; 78.9]	67.4 [59.0; 75.0]
CD25 > 21.5 and IL-6 > 2.0	31	8	45	57	35.2 [25.3; 46.1]	84.9 [72.4; 93.3]	79.5 [65.8; 88.6]	44.1 [39.5; 48.9]	53.9 [45.3; 62.3]
KFLCI > 8.4 and CD25 > 21.5	29	0	53	59	33.0 [23.3; 43.8]	100.0 [93.3; 100.0]	100.0 [-]	47.3 [43.7; 51.0]	58.2 [49.6; 66.4]
KFLCI > 8.4 and IL-6 > 2.0	60	2	51	28	68.2 [57.4; 77.7]	96.2 [87.0; 99.5]	96.8 [89.4; 99.2]	64.6 [57.2; 71.3]	78.7 [71.0; 85.2]
KFLCI > 8.4 and CD25 > 21.5 and IL-6 > 2.0	25	0	53	63	28.4 [19.3; 39.0]	100.0 [93.3; 100.0]	100.0 [-]	45.7 [42.4; 49.0]	55.3 [46.7; 63.7]

FN, false negative; FP, false positive; KFLCI, kappa free light chains index; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; TN, true negative; TP, true positive; MSARD, multiple sclerosis and related disorder; NIND, non-inflammatory neurological disorder.

TABLE 4 | Diagnostic performance of the different biomarkers comparing MSARD to OIND ($n = 123$).

	TP (n)	FP (n)	TN (n)	FN (n)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Accuracy (%)
Positive OCBs	52	4	29	36	59.1 [48.1; 69.5]	87.9 [71.8; 96.6]	92.9 [83.6; 97.1]	44.6 [37.8; 51.6]	66.9 [57.8; 75.2]
KFLCI > 13.1	64	8	25	24	72.7 [62.2; 81.7]	75.8 [57.7; 88.9]	88.9 [81.2; 93.7]	51.0 [41.3; 60.7]	73.6 [64.8; 81.2]
CD25 < 41.5	84	14	19	4	95.5 [88.8; 98.7]	57.6 [39.2; 74.5]	85.7 [80.1; 90.0]	82.6 [63.6; 92.8]	85.1 [77.5; 90.9]
IL-6 < 4.1	65	4	29	23	73.9 [63.4; 82.7]	87.9 [71.8; 96.6]	94.2 [86.5; 97.6]	55.8 [46.5; 64.7]	77.7 [69.2; 84.8]
CD25 < 41.5 and IL-6 < 4.1	63	2	31	25	71.6 [61.0; 80.7]	93.9 [79.8; 99.3]	96.9 [89.1; 99.2]	55.4 [46.8; 63.6]	77.7 [69.2; 84.8]
KFLCI > 13.1 and CD25 < 41.5	61	3	30	27	69.3 [58.6; 78.7]	90.9 [75.7; 98.1]	95.3 [87.3; 98.4]	52.6 [44.4; 60.8]	75.2 [66.5; 82.6]
KFLCI > 13.1 and IL-6 < 4.1	48	2	31	40	54.5 [43.6; 65.2]	93.9 [79.8; 99.3]	96.0 [86.1; 98.9]	43.7 [37.8; 49.7]	65.3 [56.1; 73.7]
KFLCI > 13.1 and CD25 < 41.5 and IL-6 < 4.1	46	0	33	42	52.3 [41.4; 63.0]	100.0 [89.4; 100.0]	100.0 [-]	44.0 [38.7; 49.4]	65.3 [56.1; 73.7]

FN, false negative; FP, false positive; KFLCI, kappa free light chains index; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; TN, true negative; TP, true positive; MSARD, multiple sclerosis and related disorder; OIND, other inflammatory neurological disorder.

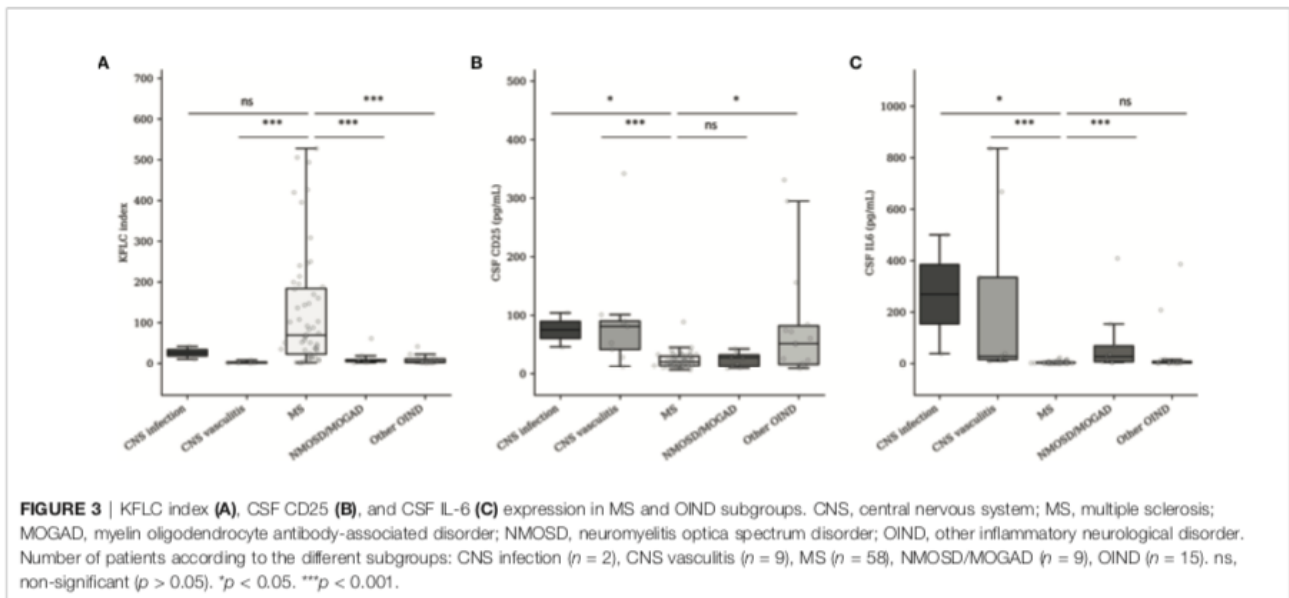


TABLE 5 | Identification of clinical and demographic data influencing CSF KFLC, CSF CD25, and CSF IL-6 concentrations by linear regression multivariate analysis.

	CSF KFLC $n = 174$		CSF CD25 $n = 174$		CSF IL-6 $n = 174$	
	β coefficient [IQR]	p -Value	β coefficient [IQR]	p -Value	β coefficient [IQR]	p -Value
Age	0.024	0.423	0.316	0.508	-0.071	0.891
Risk for each 1 year increase	[-0.035; 0.083]		[-0.625; 1.260]		[-1.100; 0.953]	
Gender	0.24	0.840	-7.76	0.564	40.53	0.072
Reference: women	[-2.07; 2.54]		[-34.23; 18.72]		[-3.61; 84.66]	
Disease duration	-0.04	0.093	-0.20	0.163	-0.42	0.126
Risk for each 1 month increase	[-0.08; 0.01]		[-0.48; 0.08]		[-0.97; 0.12]	
Immune drug ongoing at sampling	0.11	0.906	11.52	0.530	45.32	0.215
Reference: yes	[-1.71; 1.92]		[-24.59; 47.63]		[-26.6; 117.23]	
Diagnosis						
Reference: MSARD						
NIND group	-5.53	<0.001	-7.24	0.146	-0.823	0.896
	[-7.53; -3.54]		[-17.04; 2.55]		[-13.23; 11.59]	
OIND group	-4.82	0.001	60.55	0.018	93.56	0.003
	[-7.66; -1.98]		[10.58; 110.52]		[33.29; 153.83]	

CSF, cerebrospinal fluid; KFLC, kappa free light chains; MSARD, multiple sclerosis and related disorder; NIND, non-inflammatory neurological disorder; OIND, other inflammatory neurological disorder.

intrathecal immunoglobulin synthesis (i.e., KFLC index cutoff range from less than 3 to more than 10) (26, 27). This discrepancy could be explained by the heterogeneity of the different control populations, while many inflammatory CNS disorders may have an intrathecal B-cell activity. Therefore, as suggested by our study, cutoff values of KFLC biomarkers should be different depending on the suspected underlying MS-mimicking disorder, to avoid misdiagnosis.

Our findings agree with other retrospective studies that found an increased concentration of CSF IL-6 in NMOSD (17, 28, 29) and MOGAD (17, 30) compared to MS. Added to our results, these findings suggest that CSF IL-6 measurement may impact early diagnosis, while cytokine measurement is easy and fast to perform as compared to aquaporin-4 or MOG antibody, and may guide early therapeutic action, in suspected NMOSD/

MOGAD patients. Moreover, tocilizumab, an IL-6 receptor blockade therapy, has shown promising efficacy in NMOSD (31–33) and has been reported to be effective in relapsing steroid-dependent MOGAD (31, 34), reinforcing the impact of the IL-6 pathway in these diseases. In contrast, CSF CD25 could not separate MSARD from NMOSD and MOGAD, as it has already been suggested in two previously published retrospective studies (17, 35). However, because of its high positive predictive value for OIND diagnosis, elevated CSF CD25 should be used as a non-specific MSARD red flag. Even if CSF CD25 is not associated with a specific disease in our heterogeneous cohort, it could be an exciting tool in neurosarcoidosis (18), bacterial meningitis (18), or CNS lymphoma (18, 35, 36).

Nonetheless, in clinical practice, a spinal tap is not performed in all suspected MS patients, while MS diagnostic

criteria are based on the presence of a typical demyelinating event and MRI presentation (1). However, CSF analysis is often performed, while identifying OCBs is a key point to ensure MS diagnosis and avoid misdiagnosis. Moreover, our results show that extensive CSF analysis could help etiological diagnosis in many complicated cases. Importantly, none of the NIND patients in our cohort experienced a typical clinical demyelinating event, reinforcing the importance of clinical presentation in fulfilling MS criteria and identifying red flags for MS diagnosis. According to these findings and the current recommendations for MS diagnosis (1, 37, 38), we provide an MS practical diagnostic algorithm for patients presenting with brain white matter hyperintensities suggestive of MS (Figure 4).

Our study suffers from several limits. First, being a monocentric study, our results need to be confirmed by others, even if these results are consistent with multiple retrospective data. Second, our cohort's small size and heterogeneity, particularly in the OIND group, do not permit us to conclude

on the effectiveness of these biomarkers for the different MS-mimicking diseases. However, it allows figuring out which biomarker may help in rolling in or rolling out MSARD. Third, it would have been interesting to measure serum IL-1 β , CD25, IL-6, and IL-10 to calculate cytokine indexes, but our routine diagnostic workup of white matter hyperintensities does not include these analyses. Nevertheless, this study is pragmatic, evaluating these biomarkers prospectively in daily practice for the diagnostic workup of suspected MS. We think that these results will increase the etiological diagnostic accuracy of such patients.

CONCLUSION

In patients presenting for a diagnostic workup of MRI white matter hyperintensities, elevated CSF activated B-cell biomarkers such as KFLC index or KFLC IF strongly suggest MSARD. In contrast, elevated CSF IL-6 and CD25 suggest another

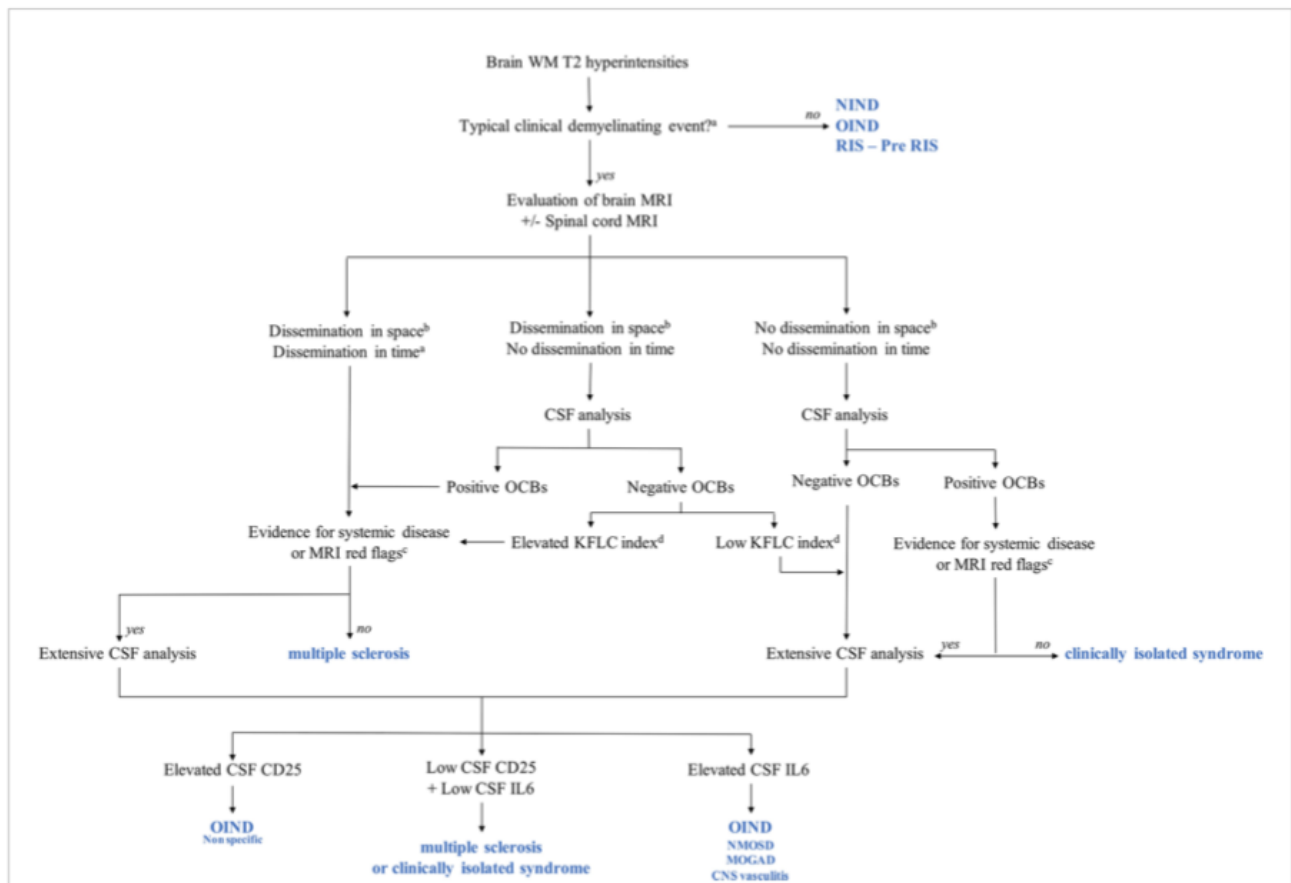


FIGURE 4 | Multiple sclerosis (MS) diagnostic algorithms including KFLC index, CSF CD25, and CSF IL-6. MOGAD, myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease; NIND, non-inflammatory neurological disorder; NMOSD, neuromyelitis optica spectrum disorder; OIND, other inflammatory neurological disorder; Pre-RIS, radiologically isolated syndrome with one or two specific dissemination in space criteria; RIS, radiologically isolated syndrome; WM: white matter. ^aAccording to reference (1). ^bAccording to reference (37). ^cAccording to reference (38). ^dIn our study, the KFLC index cutoff was 13.1. This cutoff is specific to our cohort and should not be used in daily practice, while each MS tertiary center should determine its threshold values. KFLC, kappa free light chains; CSF, cerebrospinal fluid.

inflammatory-mimicking disease. These findings need to be confirmed in other prospective cohort studies within larger samples.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval were not required for the study on human participants in accordance with the local legislation and institutional requirements. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ML and CL-F designed the study, collected the data, performed the data analysis, and drafted the manuscript. CL, LM, MC, and SB helped in designing the study, data collection, preparation of

the manuscript, and review for intellectual content. VB and BS-P performed the biomarker analysis and helped in reviewing the manuscript for intellectual content. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.864133/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Flow chart. CNS, central nervous system; MS, multiple sclerosis; MSARD, multiple sclerosis and related disorder; OIND, other inflammatory neurological disorder; WMH, white matter hyperintensities.

Supplementary Figure 2 | Distribution of KFLC biomarkers into RIS, CIS, and MS subgroups. CIS, clinically isolated syndrome ($n=22$); MS, multiple sclerosis ($n=58$); RIS, radiologically isolated syndrome ($n=8$); ns, non significant *** $p < 0.001$.

Supplementary Figure 3 | Distribution of CSF CD25, IL6, and IL10 into RIS, CIS, and MS subgroups. CIS, clinically isolated syndrome ($n=22$); MS, multiple sclerosis ($n=58$); RIS, radiologically isolated syndrome ($n=8$). ns, non significant * $p < 0.05$.

Supplementary Figure 4 | ROC curves of KFLC index, KFLC IF, CSF CD25, IL6, and IL10. [(A) ROC curve that separate MSARD from NIND ($n=141$)]. Panel (B) ROC curve that separate MSARD from OIND ($n=123$).

REFERENCES

- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of Multiple Sclerosis: 2017 Revisions of the McDonald Criteria. *Lancet Neurol* (2017) 17(2):162–73. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2
- Arrambide G, Tintore M, Espejo C, Auger C, Castillo M, Rio J, et al. The Value of Oligoclonal Bands in the Multiple Sclerosis Diagnostic Criteria. *Brain* (2018) 141(4):1075–84. doi: 10.1093/brain/awy006
- Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, Waubant E, Baranzini SE, Goodin DS, et al. Incidental MRI Anomalies Suggestive of Multiple Sclerosis: The Radiologically Isolated Syndrome. *Neurology* (2009) 72(9):800–5. doi: 10.1212/01.wnl.0000335764.14513.1a
- Lebrun-Frenay C, Kantarci O, Siva A, Sormani MP, Pelletier D, Okuda DT, et al. Radiologically Isolated Syndrome: 10-Year Risk Estimate of a Clinical Event. *Ann Neurol* (2020) 88(2):407–17. doi: 10.1002/ana.25799
- Solomon AJ, Naismith RT, Cross AH. Misdiagnosis of Multiple Sclerosis: Impact of the 2017 McDonald Criteria on Clinical Practice. *Neurology* (2019) 92(1):26–33. doi: 10.1212/WNL.0000000000006583
- Yamout BI, Khoury SJ, Ayyoubi N, Doumiati H, Fakhreddine M, Ahmed SF, et al. Alternative Diagnoses in Patients Referred to Specialized Centers for Suspected MS. *Mult Scler Relat Disord* (2017) 18:85–9. doi: 10.1016/j.msard.2017.09.016
- Wildner P, Stasiolek M, Matysiak M. Differential Diagnosis of Multiple Sclerosis and Other Inflammatory CNS Diseases. *Mult Scler Relat Disord* (2020) 37:101452. doi: 10.1016/j.msard.2019.101452
- Bar-Or A, Li R. Cellular Immunology of Relapsing Multiple Sclerosis: Interactions, Checks, and Balances. *Lancet Neurol* (2021) 20(6):470–83. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00063-6
- van Langelaar J, Rijvers L, Smolders J, van Luijn MM. B and T Cells Driving Multiple Sclerosis: Identity, Mechanisms and Potential Triggers. *Front Immunol* (2020) 11:760. doi: 10.3389/fimmu.2020.00760
- van Langelaar J, van der Vuurst de Vries RM, Janssen M, Wierenga-Wolf AF, Spilt IM, Siepmann TA, et al. T Helper 17.1 Cells Associate With Multiple Sclerosis Disease Activity: Perspectives for Early Intervention. *Brain* (2018) 141(5):1334–49. doi: 10.1093/brain/awy069
- Comi G, Bar-Or A, Lassmann H, Uccelli A, Hartung HP, Montalban X, et al. Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann Neurol* (2021) 89(1):13–23. doi: 10.1002/ana.25927
- Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Ocrelizumab Versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* (2017) 376(3):221–34. doi: 10.1056/NEJMoa1601277
- Hauser SL, Bar-Or A, Cohen JA, Comi G, Correale J, Coyle PK, et al. Ofatumumab Versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* (2020) 383(6):546–57. doi: 10.1056/NEJMoa1917246
- Saadeh RS, Bryant SC, McKeon A, Weinschenker B, Murray DL, Pittcock SJ, et al. CSF Kappa Free Light Chains: Cut-Off Validation for Diagnosing Multiple Sclerosis. *Mayo Clin Proc* (2021) S0025–6196(21)00710-2. doi: 10.1016/j.mayocp.2021.09.014
- Leurs CE, Twaalfhoven H, Lissenberg-Witte BI, van Pesch V, Dujmovic I, Drulovic J, et al. Kappa Free Light Chains Is a Valid Tool in the Diagnostics of MS: A Large Multicenter Study. *Mult Scler* (2020) 26(8):912–23. doi: 10.1177/1352458519845844
- Senel M, Mojib-Yezdani F, Braisch U, Bachhuber F, Lewenz J, Ludolph AC, et al. CSF Free Light Chains as a Marker of Intrathecal Immunoglobulin Synthesis in Multiple Sclerosis: A Blood-CSF Barrier Related Evaluation in a Large Cohort. *Front Immunol* (2019) 10:641. doi: 10.3389/fimmu.2019.00641
- Kaneko K, Sato DK, Nakashima I, Ogawa R, Akaishi T, Takai Y, et al. CSF Cytokine Profile in MOG-IgG+ Neurological Disease Is Similar to AQP4-IgG + NMOSD But Distinct From MS: A Cross-Sectional Study and Potential Therapeutic Implications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2018) 89(9):927–36. doi: 10.1136/jnnp-2018-317969
- Otto C, Wengert O, Unterwalder N, Meisel C, Ruprecht K. Analysis of Soluble Interleukin-2 Receptor as CSF Biomarker for Neurosarcoidosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* (2020) 7(4):e725. doi: 10.1212/NXI.0000000000000725
- Rubenstein JL, Wong VS, Kadoch C, Gao HX, Barajas R, Chen L, et al. CXCL13 Plus Interleukin 10 Is Highly Specific for the Diagnosis of CNS Lymphoma. *Blood* (2013) 121(23):4740–8. doi: 10.1182/blood-2013-01-476333
- Montalban X, Tintore M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, et al. MRI Criteria for MS in Patients With Clinically Isolated Syndromes. *Neurology* (2010) 74(5):427–34. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181cec45c

21. Reiber H, Zeman D, Kušnierová P, Mundwiler E, Bernasconi L. Diagnostic Relevance of Free Light Chains in Cerebrospinal Fluid – The Hyperbolic Reference Range for Reliable Data Interpretation in Quotient Diagrams. *Clin Chim Acta* (2019) 497:153–62. doi: 10.1016/j.cca.2019.07.027.21
22. Rosenstein I, Rasch S, Axelsson M, Novakova L, Blennow K, Zetterberg H, et al. Kappa Free Light Chain Index as a Diagnostic Biomarker in Multiple Sclerosis: A Real-World Investigation. *J Neurochem* (2021) 159(3):618–28. doi: 10.1111/jnc.15500
23. Duell F, Evertsson B, Al Nimer F, Sandin A, Olsson D, Olsson T, et al. Diagnostic Accuracy of Intrathecal Kappa Free Light Chains Compared With OCBs in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* (2020) 7(4):e775. doi: 10.1212/NXI.0000000000000775
24. Süße M, Feistner F, Grothe M, Nauck M, Dressel A, Hannich MJ. Free Light Chains Kappa Can Differentiate Between Myelitis and Non-Inflammatory Myelopathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* (2020) 7(6):e829. doi: 10.1212/NXI.0000000000000829
25. Machado-Santos J, Saji E, Tröscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, et al. The Compartmentalized Inflammatory Response in the Multiple Sclerosis Brain Is Composed of Tissue-Resident CD8 + T Lymphocytes and B Cells. *Brain* (2018) 141(7):2066–82. doi: 10.1093/brain/awy151
26. Sanz Diaz CT, de Las Heras Flórez S, Carretero Perez M, Hernández Pérez MÁ, Martín García V. Evaluation of Kappa Index as a Tool in the Diagnosis of Multiple Sclerosis: Implementation in Routine Screening Procedure. *Front Neurol* (2021) 12:676527. doi: 10.3389/fneur.2021.676527
27. Menéndez-Valladares P, García-Sánchez MI, Adorna Martínez M, García De Veas Silva JL, Bermudo Guitarte C, Izquierdo Ayuso G. Validation and Meta-Analysis of Kappa Index Biomarker in Multiple Sclerosis Diagnosis. *Autoimmun Rev* (2019) 18(1):43–9. doi: 10.1016/j.autrev.2018.07.010
28. Uzawa A, Mori M, Masuda H, Ohtani R, Uchida T, Sawai S, et al. Interleukin-6 Analysis of 572 Consecutive CSF Samples From Neurological Disorders: A Special Focus on Neuromyelitis Optica. *Clin Chim Acta* (2017) 469:144–9. doi: 10.1016/j.cca.2017.03.006
29. Hou MM, Li YF, He LL, Li XQ, Zhang Y, Zhang SX, et al. Proportions of Th17 Cells and Th17-Related Cytokines in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders Patients: A Meta-Analysis. *Int Immunopharmacol* (2019) 75:105793. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105793
30. Kothur K, Wienholt L, Tantsis EM, Earl J, Bandodkar S, Prelog K, et al. B Cell, Th17, and Neutrophil Related Cerebrospinal Fluid Cytokine/Chemokines Are Elevated in MOG Antibody Associated Demyelination. *PLoS One* (2016) 11(2):e0149411. doi: 10.1371/journal.pone.0149411
31. Ringelstein M, Ayzenberg I, Lindenblatt G, Fischer K, Gahlen A, Novi G, et al. Interleukin-6 Receptor Blockade in Treatment-Refractory MOG-IgG-Associated Disease and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* (2021) 9(1):e1100. doi: 10.1212/NXI.0000000000001100
32. Du C, Zeng P, Han JR, Zhang TX, Jia D, Shi FD, et al. Early Initiation of Tocilizumab Treatment Against Moderate-to-Severe Myelitis in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Front Immunol* (2021) 12:660230. doi: 10.3389/fimmu.2021.660230
33. Zhang C, Zhang M, Qiu W, Ma H, Zhang X, Zhu Z, et al. Safety and Efficacy of Tocilizumab Versus Azathioprine in Highly Relapsing Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder (TANGO): An Open-Label, Multicentre, Randomized, Phase 2 Trial. *Lancet Neurol* (2020) 19(5):391–401. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30070-3
34. Elsbernd PM, Hoffman WR, Carter JL, Wingerchuk DM. Interleukin-6 Inhibition With Tocilizumab for Relapsing MOG-IgG Associated Disorder (MOGAD): A Case Series and Review. *Mult Scler Relat Disord* (2021) 48:102696. doi: 10.1016/j.msard.2020.102696
35. Ikeguchi R, Shimizu Y, Shimizu S, Kitagawa K. CSF and Clinical Data are Useful in Differentiating CNS Inflammatory Demyelinating Disease From CNS Lymphoma. *Mult Scler* (2018) 24(9):1212–23. doi: 10.1177/1352458517717804
36. Maeyama M, Sasayama T, Tanaka K, Nakamizo S, Tanaka H, Nishihara M, et al. Multi-Marker Algorithms Based on CXCL13, IL-10, sIL-2 Receptor, and Beta2-Microglobulin in Cerebrospinal Fluid to Diagnose CNS Lymphoma. *Cancer Med* (2020) 9(12):4114–25. doi: 10.1002/cam4.3048
37. Galdes R, Ciccarelli O, Barkhof F, De Stefano N, Enzinger C, Filippi M, et al. The Current Role of MRI in Differentiating Multiple Sclerosis From its Imaging Mimics. *Nat Rev Neurol* (2018) 14(4):199–213. doi: 10.1038/nrneurol.2018.14
38. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, De Stefano N, Evangelou N, Kappos L, et al. MRI Criteria for the Diagnosis of Multiple Sclerosis: MAGNIMS Consensus Guidelines. *Lancet Neurol* (2016) 15(3):292–303. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00393-2

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Levrault, Landes, Mondot, Cohen, Bresch, Brglez, Seitz-Polski and Lebrun-Frenay. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 3

Article 2

Journal (rang)

Neurology Neuroimmunology Neuroinflammation (A)

Kappa Free Light Chain Biomarkers Are Efficient for the Diagnosis of Multiple Sclerosis

A Large Multicenter Cohort Study

Michael Levrault, MD, Sabine Laurent-Chabalier, PhD, Xavier Ayrygnac, MD, PhD, Kévin Bigaut, MD, Manon Rival, MD, Sanae Squalli, MD, Héliène Zéphir, MD, PhD, Tifanie Alberto, MD, Jean-David Pekar, MD, Jonathan Ciron, MD, Damien Biotti, MD, Bénédicte Puissant-Lubrano, PharmD, PhD, Jean-Philippe Camdessanché, MD, PhD, Yannick Tholance, PharmD, PhD, Olivier Casez, MD, Bertrand Toussaint, MD, PhD, Jeanne Marion, MD, Thibault Moreau, MD, PhD, Daniela Lakomy, MD, PhD, Audrey Thomasset, MD, Elisabeth Maillart, MD, Delphine Sterlin, PharmD, PhD, Aude Maurousset, MD, Auriane Rocher, MD, David Axel Laplaud, MD, PhD, Edith Bigot-Corbel, PharmD, PhD, Pierre-Olivier Bertho, MD, Jean Pelletier, MD, PhD, Joseph Boucraut, MD, PhD, Pierre Labauge, MD, PhD, Thierry Vincent, MD, PhD, Jérôme De Séze, MD, PhD, Isabelle Jahn, MD, Barbara Seitz-Polski, MD, PhD, Eric Thouvenot, MD, PhD, and Christine Lebrun-Frenay, MD, PhD, on behalf of Société Francophone de la Sclérose En Plaques (SFSEP)

Correspondence

Dr. Levrault
michael.levrault@gmail.com

Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2023;10:e200049. doi:10.1212/NXI.000000000200049

Abstract

Background and Objectives

Kappa free light chains (KFLC) seem to efficiently diagnose MS. However, extensive cohort studies are lacking to establish consensus cut-offs, notably to rule out non-MS autoimmune CNS disorders. Our objectives were to (1) determine diagnostic performances of CSF KFLC, KFLC index, and KFLC intrathecal fraction (IF) threshold values that allow us to separate MS from different CNS disorder control populations and compare them with oligoclonal bands' (OCB) performances and (2) to identify independent factors associated with KFLC quantification in MS.

Methods

We conducted a retrospective multicenter study involving 13 French MS centers. Patients were included if they had a noninfectious and nontumoral CNS disorder, eligible data concerning CSF and serum KFLC, albumin, and OCB. Patients were classified into 4 groups according to their diagnosis: MS, clinically isolated syndrome (CIS), other inflammatory CNS disorders (OIND), and noninflammatory CNS disorder controls (NINDC).

Results

One thousand six hundred twenty-one patients were analyzed (675 MS, 90 CIS, 297 OIND, and 559 NINDC). KFLC index and KFLC IF had similar performances in diagnosing MS from nonselected controls and OIND ($p = 0.123$ and $p = 0.991$ for area under the curve [AUC] comparisons) and performed better than CSF KFLC ($p < 0.001$ for all AUC comparisons). A KFLC index of 8.92 best

MORE ONLINE

Class of Evidence

Criteria for rating therapeutic and diagnostic studies

[NPub.org/coe](https://www.npub.org/coe)

From the Unité de Recherche Clinique Cote d'Azur-UR2CA URRIS (M.L., C.L.-F.), Centre Hospitalier Universitaire de Nice; Département de Biostatistiques (S.L.-C.), Epidémiologie clinique et Santé Publique, Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes; Département de Neurologie (X.A., P.L.), Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier; Département de Neurologie (K.B., J.D.S.), Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg; Service de Neurologie (M.R., E.T.), Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes; Laboratoire de Biochimie (S.S.), Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes; Département de Neurologie (H.Z., T.A.), Centre Hospitalier Universitaire de Lille; Centre Hospitalier Universitaire de Lille (J.-D.P.), Service de Biochimie Automatisée, Protéines (UF 8833), Lille; Département de Neurologie (J.C., D.B.), Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Hôpital Pierre-Paul Riquet, CRC-SEP, F-31059, Toulouse Cedex 9; Laboratoire d'Immunologie (B.P.-L.), Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse; Département de Neurologie (J.-P.C.), Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne; Laboratoire de Biochimie (Y.T.), Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne; Département de Neurologie (O.C.), Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble Alpes; Univ. Grenoble Alpes (B.T.), CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, CHU Grenoble Alpes, TIMC; Laboratoire de Biochimie (B.T., J.M.), Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble Alpes; Département de Neurologie (T.M.), Centre Hospitalier de Dijon; Laboratoire de Biochimie (D.L., A.T.), Centre Hospitalier Universitaire de Dijon; Département de Neurologie (E.M.), Assistance-Publique des Hôpitaux de Paris, Centre Hospitalier Universitaire de la Pitié-Salpêtrière; Laboratoire d'Immunologie (D.S.), Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Centre Hospitalier Universitaire de la Pitié-Salpêtrière, Paris; Département de Neurologie (A.M., A.R.), Centre Hospitalier Universitaire de Tours; Université de Nantes (D.A.L.), C2RTI Inserm UMR1064, service de Neurologie, CHU Nantes; Département de Biochimie (E.B.-C., P.-O.B.), Centre Hospitalier Universitaire de Nantes; Aix Marseille Univ (J.P.), APHM, Hôpital de la Timone, Pôle de Neurosciences Cliniques, Service de Neurologie; Laboratoire de Biochimie (J.B.), Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Centre Hospitalier Universitaire de La Conception; Laboratoire d'Immunologie (T.V.), Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier; Laboratoire d'Immunologie (I.J.), Centre Hospitalier Universitaire Strasbourg; Laboratoire d'Immunologie (B.S.-P.), Centre Hospitalier Universitaire de Nice; Institut de Génétique Fonctionnelle (E.T.), Université de Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier; and Département de Neurologie (C.L.-F.), Centre Hospitalier Universitaire de Nice, France.

Go to [Neurology.org/NN](https://www.neurology.org/NN) for full disclosures. Funding information is provided at the end of the article.

The Article Processing Charge was funded by the authors.

Société Francophone de la Sclérose En Plaques (SFSEP) coinvestigators are listed in the appendix at the end of the article.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND), which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Glossary

AUC = area under the curve; **CIS** = clinically isolated syndrome; **FLC** = free light chain; **IF** = intrathecal fraction; **KFLC** = Kappa free light chain; **LDL** = lower detectable limit; **LFLC** = lambda FLC; **NINDC** = noninflammatory CNS disorder control; **OCB** = oligoclonal band; **OIND** = other inflammatory CNS disorder; **SC** = symptomatic control.

separated MS/CIS from the entire nonselected control population, with better performances than OCB ($p < 0.001$ for AUC comparison). A KFLC index of 11.56 best separated MS from OIND, with similar performances than OCB ($p = 0.065$). In the multivariate analysis model, female gender ($p = 0.003$), young age ($p = 0.013$), and evidence of disease activity ($p < 0.001$) were independent factors associated with high KFLC index values in patients with MS, whereas MS phenotype, immune-modifying treatment use at sampling, and the FLC analyzer type did not influence KFLC index.

Discussion

KFLC biomarkers are efficient tools to separate patients with MS from controls, even when compared with other patients with CNS autoimmune disorder. Given these results, we suggest using KFLC index or KFLC IF as a criterion to diagnose MS.

Classification of Evidence

This study provides Class III evidence that KFLC index or IF can be used to differentiate patients with MS from nonselected controls and from patients with other autoimmune CNS disorders.

MS is the most common chronic inflammatory and demyelinating CNS disease worldwide. It mainly presents as relapsing subacute clinical demyelinating events that progressively lead to neurologic disabilities. For the past 2 decades, clinical research has focused on how to diagnose MS as early as possible and prevent relapse and handicap by initiating disease-modifying treatments as soon as possible.

In the last MS diagnostic criteria update,¹ biomarkers have an essential role in the diagnostic workup of patients presenting with a typical first demyelinating event. Clinical and MRI abnormalities can ensure MS diagnosis to fulfill dissemination in space and time criteria. CSF oligoclonal IgG bands (OCB) detection can avoid fulfilling the dissemination in time to treat patients with early MS. OCB detection reflects intrathecal B-cell activity, which are critical but nonspecific, effector cells in MS.^{2,3} Nevertheless, the level of intrathecal B-cell activity could be an exciting field of research to separate MS from other CNS inflammatory diseases⁴ and target treatment. As OCB are a qualitative biomarker, their detection does not permit quantification of the intrathecal B-cell activity.⁵ Moreover, isoelectric focusing is a time-consuming procedure that requires an experienced biologist to provide reliable results.⁶ Therefore, novel diagnostic biomarkers are being investigated, including blood and CSF free light chains (FLCs), small immunoglobulin compounds that may reflect and quantify B-cell activity. Kappa FLC (KFLC) has shown good overall performance in diagnosing MS, whereas lambda FLC (LFLC) performance seems to be lower than OCB.⁷⁻¹⁵ FLC measurement has the advantage of being an automatized, quantitative, easy to perform, and labor- and time-saving procedure.¹⁶

In practice, evaluation of the CSF and serum KFLC and albumin provides the level of intrathecal KFLC synthesis by calculating the KFLC index or KFLC intrathecal fraction (KFLC IF),

including blood-CSF barrier permeability data.^{7,17} Both biomarkers could help diagnose OCB negative,¹⁸ and IgA or IgM OCB positive patients with MS¹⁹ and identify intrathecal immunoglobulin synthesis in patients presenting with one isolated band on isoelectric focusing.²⁰ KFLC could also predict the risk of developing a second clinical attack in patients presenting with a first clinical demyelinating event.²¹⁻²⁵ However, the use of either the KFLC index, which refers to linear modeling of a locally synthesized fraction of KFLC, or the KFLC IF, which refers to hyperbolic modeling of KFLC intrathecal synthesis, is not clear.^{26,27} Even if the KFLC IF seems closer to the pathophysiology, some studies show that both biomarkers perform equally in diagnosing MS.²⁷⁻²⁹ There is no consensus concerning the KFLC index or KFLC IF cut-off to use in daily practice to confirm MS-related immunoglobulin intrathecal synthesis. Moreover, only a few studies have investigated the performance of KFLC in ruling out non-MS CNS inflammatory disorders.³⁰ Finally, studies comparing the performance of the KFLC index and KFLC IF in a large cohort of patients are lacking.

The primary research question of this study was: Does KFLC biomarkers (CSF KFLC, KFLC index, and KFLC IF) allow to separate patients with MS from different controls (a nonselected CNS disorder population, and a non-MS autoimmune CNS disorder population) accurately? And compare their performances to OCB.

Methods

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

According to French laws, the patients received transparent, fair, and appropriate research information, and no opposition

participation was available. The study received approval from the institutional review board of the University Hospital of Nice, and the protocol was registered on ClinicalTrials.gov (NCT05088473).

Patients and Controls

Thirteen French MS centers participated in this retrospective cohort study. Patients were eligible if they had (1) a diagnostic workup for a suspected CNS disorder and (2) eligible data for CSF and serum KFLC, albumin, and a known OCB status, up to March 31, 2021. Patients were excluded if the final diagnosis was (1) peripheral neurologic disorder, (2) infectious CNS disease, (3) CNS tumor, or if they had a monoclonal gammopathy or severe chronic kidney injury (glomerular filtration rate < 30 mL/min/1.73 m²) to avoid FLC misinterpretation.³¹

Peripheral neurologic diseases, CNS infections, and tumors were excluded so that the other inflammatory CNS disorder (OIND) group was as close as possible to clinical and/or radiologic MS mimickers. According to the final diagnoses, patients were separated into groups according to previously published classification criteria³²: MS, clinically isolated syndrome (CIS), other inflammatory neurologic disorder (OIND), noninflammatory neurologic disorder (NIND), and symptomatic control (SC) groups. Patients classified as SC and NIND were grouped into a noninflammatory neurologic disorder control (NINDC) group. All patients with MS fulfilled the 2017 McDonald criteria.

Collected Data

The following data were collected based on patients' medical records: age, sex, immune modifying drug ongoing at sampling, final diagnosis, CSF and serum albumin, white blood cells, IgG, OCB status, and KFLC. When available, LFLC data were collected. For patients with MS/CIS, the type of clinical demyelinating event and evidence of disease activity (combined variable of the presence of an ongoing clinical demyelinating symptom at CSF sampling and/or gadolinium-enhanced T1 lesions on a full 30-day time lag MRI) were collected.

Laboratory Features

FLC were measured in each center's laboratory using a turbidimetric or nephelometric analyzer; 9 centers used the turbidimeter Optilite (The Binding Site, Birmingham, UK), 2 used the turbidimeter SPAPLUS (The Binding Site, Birmingham, UK), one the nephelometer BN ProSpec (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH), and one the nephelometer BNII (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH) with the serum-free light chain immunoassay Freelite (The Binding Site, Birmingham, UK). FLC measurements were performed according to the manufacturer's instructions. Serum and CSF albumin levels were determined with the same turbidimetric or nephelometric analyzer. Four of the 13 centers used FLC as part of the diagnostic workup, and data were measured on fresh samples. For the other centers, paired CSF and serum were immediately centrifuged after sampling and stored in polypropylene tubes within 2 hours at -80°C until assay. eTable 1 (links.lww.com/NXI/A753)

summarizes the laboratory data according to each center. The assessment of OCB was performed by isoelectric focusing and subsequent immunoglobulin using IgG-specific antibody staining according to each center's laboratory routine care, fulfilling the recommended standards for CSF analysis.⁵ In each center, OCB patterns were evaluated by experienced biologists and classified as negative or positive. A cut-off ≥ 2 CSF-restricted bands were used to define OCB positivity.

Free Light Chain Biomarkers Determination

The FLC index and the FLC IF were determined for each patient.

- The FLC index was calculated with the formula: $FLC\ index = Q_{FLC} / Q_{alb}$ with $Q_{FLC} = CSF\ FLC / serum\ FLC$ and $Q_{alb} = CSF\ albumin / serum\ albumin$
- The FLC IF was calculated with the formulas^{17,27}: $FLC\ IF = (FLC_{loc} / CSF\ FLC) \times 100$ with $FLC_{loc} = (Q_{FLC} / Q_{FLC}(lim)) \times serum\ FLC$ and $Q_{KFLC}(lim) = 3.27 (Q_{alb} \times 2 + 33) \times 0.5 - 8.2 (\times 10^{-3})$ $Q_{LFLC}(lim) = 3.1276 \times Q_{alb} \times 0.8650$

For patients whose CSF FLC concentration was below the analyzer's lower detectable limit (LDL), we assigned an empirical value equal to the LDL divided by 2.¹⁷ The attributed CSF KFLC concentrations were 0.17 mg/L for the Optilite and the BNII, 0.19 mg/L for the SPAPLUS, and 0.03 mg/L for the BN ProSpec.

Statistical Analysis

Categorical variables were expressed as counts with percentages, and continuous variables as means and SD or medians and interquartile ranges because of their distribution. Normality and heteroskedasticity of the baseline demographic, clinical, and biology characteristics were assessed using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively.

Differences between groups were tested using a Wilcoxon-Mann-Whitney test to compare 2 groups of non-normally distributed data. The Kruskal-Wallis test with post hoc Conover was applied to reach more than 2 groups. For normally distributed continuous variables, a Student *t*-test was used. A Fischer exact test or a χ^2 test was performed for categorical variables. All analyses were 2-tailed.

To evaluate FLC biomarkers' diagnostic performance, we first pooled all patients presenting with a demyelinating disease (MS and CIS groups) and compared them with control groups (OIND and NINDC). Then, the MS group was compared with OIND. Logistic regressions were implemented for each population to obtain the ROC curves used to measure the diagnostic capacity (area under the curve [AUC], 95% CI) of the different FLC biomarkers. The DeLong method assessed the comparison of each FLC biomarker by comparing their areas under the ROC curves with their 95% CI. The Youden index allowed the definition of each biomarker's optimal threshold values.

The patients were classified as positive or negative for each FLC biomarker to define categorical variables from the obtained thresholds. The diagnostic capacity of each FLC biomarker of interest was compared with OCB via the categorical variables. Comparisons of sensitivities and specificities were made using the McNemar test, and comparisons of positive and negative predicted values were made using the Moskowitz and Pepe³³ method.

The identification of independent clinical factors associated with KFLC index values in patients with MS was first performed using a univariate linear regressions implementation for each element to be tested (age, sex, type of analyzer, type of sample, type of MS, disease activity, immune treatment ongoing at sampling, and type of clinical event). The clinical factors whose *p* value was less than 0.2 were retained for the multivariate analysis in the univariate analysis.

The selection of variables in the multiple linear regression was made step by step, removing the least nonsignificant variable (*p* value > 0.05). The model retained all the variables whose *p* value was below the significance level of 5%. For all comparisons, *p* values <0.05 were considered statistically significant. Comparisons of sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were made using the R statistical software version 3.2.1 mix tools package (sepmcnemar function and pvrpv function of the R DTComPair packages). All other analyses were made with SAS

version 9.4 (SAS Institute, Inc). Figures were done using the online application EasyMedStat (version 3.14, easymedstat.com).

Data Availability

Data not provided in the article because of space limitations may be shared (anonymized) at the request of the corresponding author to replicate procedures and results.

Results

Paired CSF and serum samples were available for 1,917 eligible patients, and 1,621 patients (MS group [n = 675], CIS group [n = 90], OIND group [n = 297] and NINDC group [n = 559]) were included in the analysis (eFigure 1, links.lww.com/NXI/A753). Serum and CSF LFLC were available for 825 patients.

Definite diagnoses are available in supplementary data (eTable 2, links.lww.com/NXI/A753). Both MS and CIS groups had comparable baseline characteristics except for the OCB status (84 vs 63% positivity, respectively, *p* < 0.001) and IgG index values (median of 0.82 vs 0.64, respectively, *p* = 0.001). Both control groups had different baseline characteristics compared with patients with MS. In particular, immune-modifying drugs at sampling were more frequent in the OIND group (17%) than in the MS group (9%), *p* = 0.003. All baseline characteristics are available in Table 1, and details concerning disease-modifying

Table 1 Demographic and Clinical Data of Patients at Serum/CSF Sampling

	MS (n = 675)	CIS (n = 90)	<i>p</i> Value MS vs CIS	OIND (n = 297)	<i>p</i> Value MS vs OIND	NINDC (n = 559)	<i>p</i> Value MS vs NINDC
Age (y), median [IQR]	37 [29; 48]	37 [28; 50]	0.873 ^a	46 [35; 60]	<0.001 ^a	54 [39; 69]	<0.001 ^a
Sex (women), n (%)	481 (71)	68 (76)	0.455 ^b	169 (56.9)	<0.001 ^b	349 (62)	0.001 ^b
Immune treatment at sampling, n (%)	57 (9.3)	4 (4.9)	0.217 ^b	45 (16.6)	0.003 ^b	23 (4.5)	0.002 ^b
CSF protein (g/L), median [IQR]	0.35 [0.28; 0.46]	0.36 [0.28; 0.41]	0.363 ^a	0.41 [0.29; 0.54]	<0.001 ^a	0.36 [0.28; 0.48]	0.012 ^a
CSF WBC (/mL), median [IQR]	2 [0; 6]	1 [0; 8]	0.667 ^a	3 [0; 8]	<0.001 ^a	0 [0; 1]	<0.001 ^a
Albumin quotient (%), median [IQR]	0.51 [0.37; 0.69]	0.51 [0.36; 0.62]	0.177 ^a	0.61 [0.44; 0.88]	<0.001 ^a	0.54 [0.39; 0.75]	0.001 ^a
IgG index, median [IQR]	0.82 [0.62; 1.25]	0.64 [0.60; 0.87]	0.001 ^a	0.56 [0.48; 0.66]	<0.001 ^a	0.52 [0.47; 0.58]	<0.001 ^a
Positive OCB, n (%)	570 (84.4)	57 (63.3)	<0.001 ^b	64 (21.6)	<0.001 ^b	19 (3.4)	<0.001 ^b
Serum KFLC (mg/L), median [IQR]	13.5 [10.8; 16.4]	12.6 [10.6; 15.4]	0.073 ^a	13.8 [10.9; 17.8]	<0.001 ^a	14.9 [11.9; 19.4]	<0.001 ^a
Serum LFLC (mg/L), median [IQR]	11.3 [9.1; 14.2]	11.1 [9.1; 13.1]	0.303 ^a	12.4 [9.9; 15.0]	0.013 ^a	12.5 [10.1; 15.7]	0.001 ^a

Bold text indicates *p* values that reach statistical significance (*p* < 0.05).

Abbreviations: CIS = clinically isolated syndrome; IQR = interquartile range; MS = multiple sclerosis; NINDC = noninflammatory neurologic disease control; OCB = oligoclonal band; OIND = other inflammatory neurologic disease; sKFLC = serum kappa free light chain; sLFLC = serum lambda free light chain; WBC = white blood cell.

^a Wilcoxon-Mann-Whitney test.

^b Fischer exact test.

treatment are available in supplementary data (eTable 3, links. lww.com/NXI/A753).

Patients With MS and CIS Presented Higher FLC Biomarkers Than Both Control Groups

The CSF KFLC (Figure 1A), KFLC index (Figure 1B), and KFLC IF (Figure 1C) values were higher in the MS group (median = 4.36 mg/L [1.75–9.96], 64.2 [24.4–147.5], and 94.6% [86.7–97.6], respectively) than in the CIS group (median = 2.04 mg/L [0.46–5.66], 29.0 [6.3–80.5], and 88.3% [55.8–96.2], respectively), the OIND group (median = 0.17 mg/L [0.17–0.93], 3.8 [2.2–9.5], and 3.2% [–48.9 to 64.5], respectively), and the NINDC group (median = 0.17 mg/L [0.17–0.17], 2.4 [1.6–3.5], and –47.2% [–98.3 to 8.8], respectively). *p* Value was <0.001 for all MS or CIS vs OIND and NINDC comparisons. Although focusing on MS phenotype, progressive patients with MS (*n* = 83) presented with similar median CSF KFLC concentration than

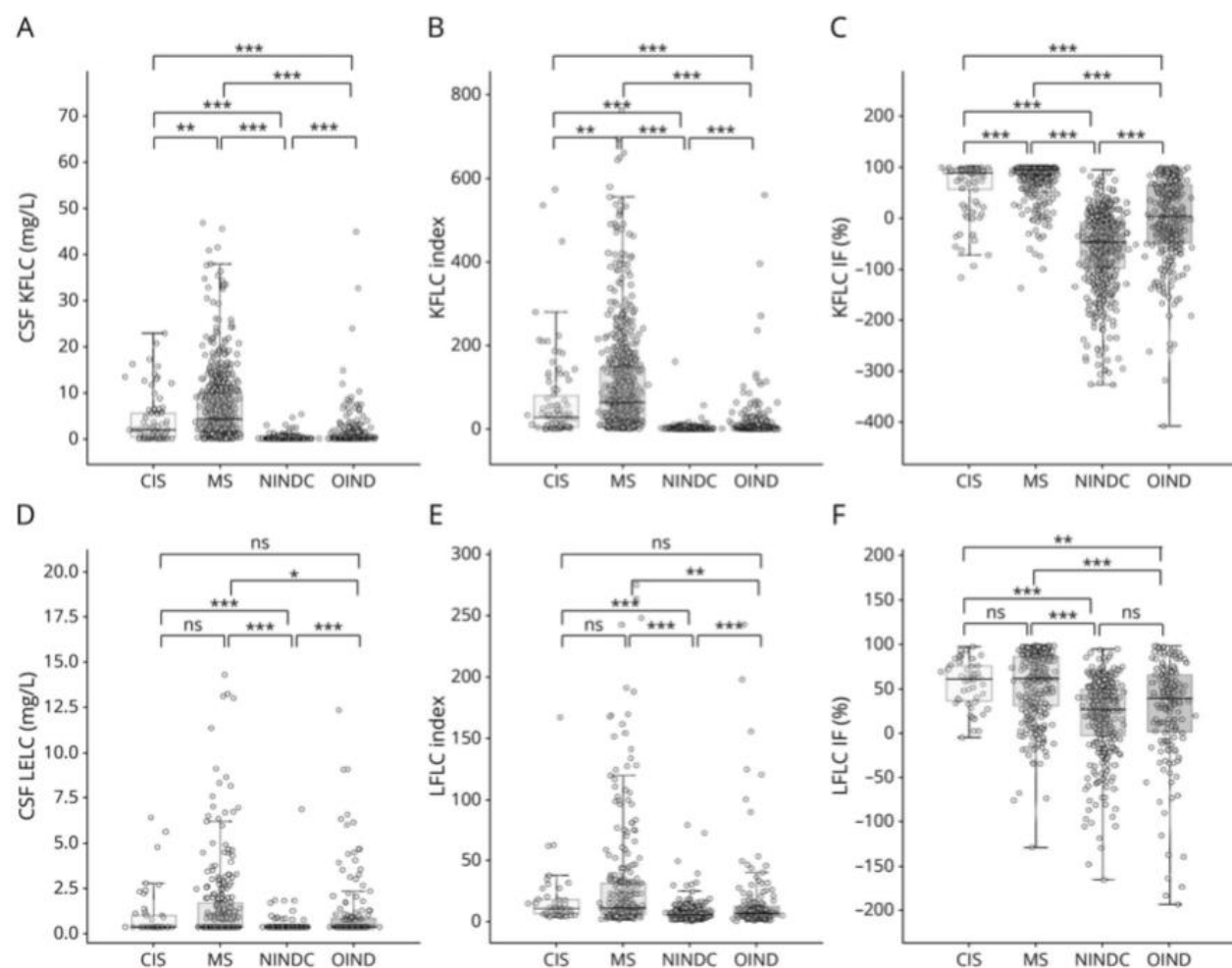
relapsing patients with MS (*n* = 592), *p* = 0.292, and lower KFLC index (*p* = 0.023) and KFLC IF (*p* = 0.043) values. All data are presented in eFigure 2 (links.lww.com/NXI/A753).

The CSF LFLC (Figure 1D), LFLC index (Figure 1E), and LFLC IF (Figure 1F) values were higher in the MS group than in the NINDC group, *p* Value <0.001 for all comparisons. Median values of all 3 LFLC biomarkers were similar between MS and CIS groups.

Both KFLC Index and KFLC IF Performed Better Than Other FLC Biomarkers in Diagnosing MS

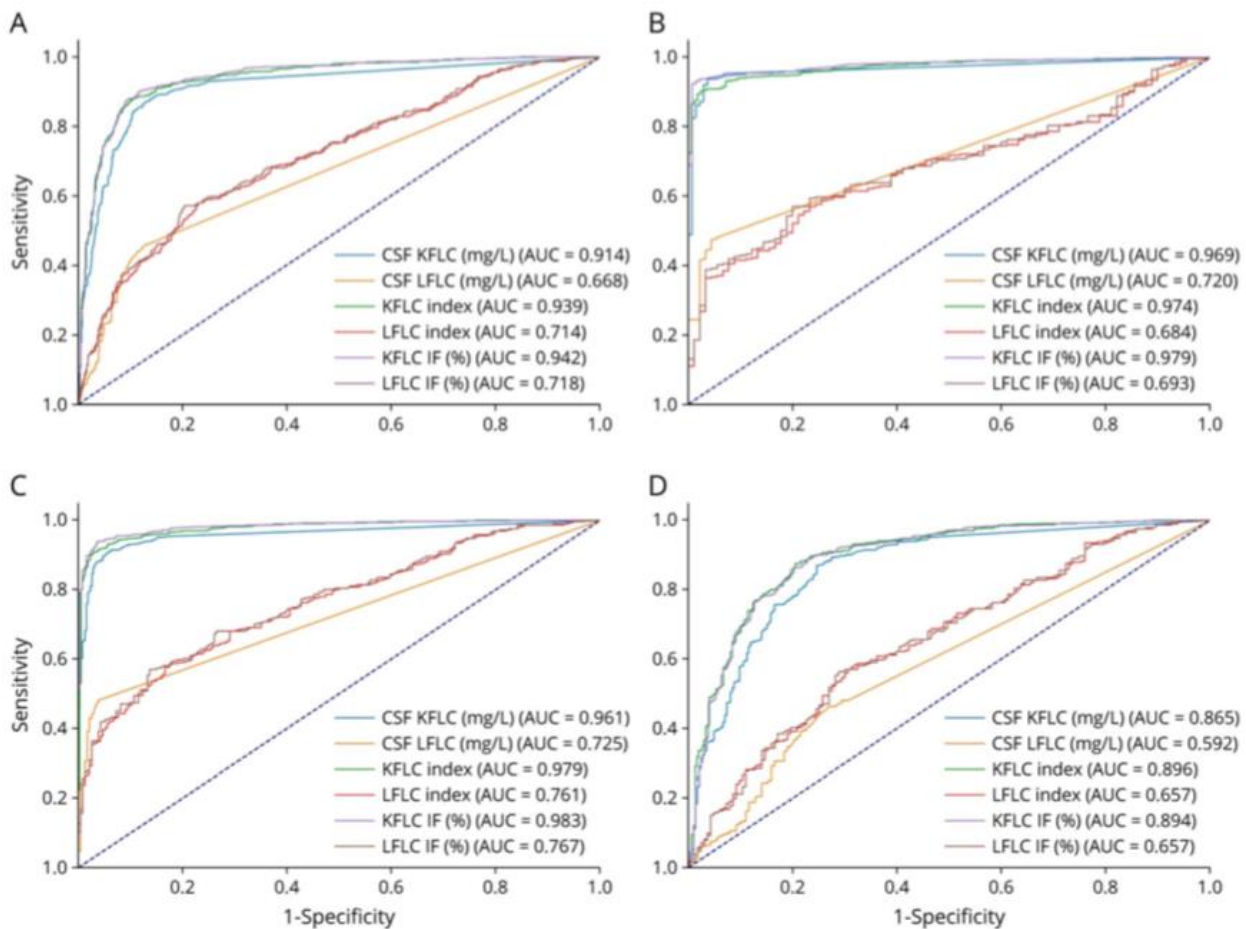
MS/CIS groups were compared with OIND/NINDC groups to evaluate the diagnostic performance of each biomarker in the entire cohort. KFLC index (AUC 0.939) and KFLC IF (AUC 0.942) had similar diagnostic performances, *p* = 0.123, and performed better than CSF KFLC (AUC 0.914, *p* < 0.001

Figure 1 Comparison of the Different FLC Biomarkers Values Between Groups



CIS = clinically isolated syndrome; CSF KFLC = CSF kappa free light chains; CSF LFLC = CSF lambda free light chains; IF = intrathecal fraction; KFLC IF = kappa free light chains IF; KFLC index = kappa free light chains index; LFLC IF = lambda free light chains intrathecal fraction; LFLC index = lambda free light chains index; MS = multiple sclerosis; NINDC = noninflammatory neurologic disorder controls; ns = nonsignificant; OIND = other inflammatory neurologic disorder. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

Figure 2 FLC Biomarkers ROC Curve Analysis and Ability to Separate MS (±CIS) From Other Control Populations



Panel A shows diagnostic performances to separate MS and CIS from patients with NINDC and OIND ($n = 1,621$ for KFLC biomarkers and $n = 811$ for LFLC biomarkers). Panel B shows diagnostic performances to separate MS from patients with SC ($n = 842$ patients for KFLC biomarkers and $n = 415$ for LFLC biomarkers). Panel C shows diagnostic performances to separate MS from patients with NIND ($n = 1,067$ for KFLC biomarkers and $n = 541$ for LFLC biomarkers). Panel D shows diagnostic performances to separate MS from patients with OIND ($n = 972$ patients for KFLC biomarkers and $n = 479$ for LFLC biomarkers). CIS = clinically isolated syndrome; FLC = free light chain; IF = intrathecal fraction; KFLC = Kappa free light chain; LFLC = lambda free light chain; NINDS = noninflammatory CNS disorder control; OIND = other inflammatory CNS disorder.

for both comparisons) in diagnosing MS/CIS (Figure 2A). Optimal cut-off values were 8.92 and 67.3% for KFLC index and KFLC IF, respectively (eTable 4, links.lww.com/NXI/A753).

Patients with MS were then compared with those with SC (Figure 2B). In this situation, KFLC IF performed better than the KFLC index ($p = 0.008$), and optimal cut-off values were 9.11 for KFLC index and 46.3% for KFLC IF (eTable 5, links.lww.com/NXI/A753). When patients with MS were compared with patients with NIND (Figure 2C), the KFLC IF performed better than the KFLC index ($p = 0.002$), and optimal cut-off values were 8.39 and 38.1% for KFLC index and KFLC IF, respectively (eTable 6, links.lww.com/NXI/A753).

Patients with MS were then compared with patients with OIND (Figure 2D). In this situation, the KFLC index (AUC 0.896) and KFLC IF (AUC 0.894) had similar diagnostic

performance ($p = 0.991$) and performed better than CSF KFLC (AUC 0.865, $p < 0.001$ for both comparisons). Optimal cut-off values were 11.56 and 67.9% for KFLC index and KFLC IF, respectively (eTable 7, links.lww.com/NXI/A753). In all situations, CSF LFLC, LFLC index, and LFLC IF had lower performances than KFLC biomarkers.

Because different threshold values were obtained depending on the chosen control population, we compared the performances of the different thresholds in other situations to ensure their relevance. When applying KFLC biomarker thresholds obtained in separating MS from NIND to separate MS from OIND, the AUC of all 3 biomarkers decreased ($p = 0.025$ for CSF KFLC, $p = 0.045$ for KFLC index, and $p < 0.001$ for KFLC IF comparisons). The same results were obtained when applying KFLC biomarker thresholds obtained in separating MS from SC to separate MS from OIND. All data are shown in Table 2.

Table 2 Comparison of the Different CSF KFLC, KFLC Index, and KFLC IF Obtained Thresholds Across Groups

MS vs OIND									
	CSF KFLC			KFLC index			KFLC IF		
Threshold	0.64	0.94	0.47	8.38	11.56	9.11	38.1	67.9	46.3
AUC	0.791 [0.761; 0.820]	0.8112 [0.784; 0.840]	0.767 [0.737; 0.797]	0.819 [0.791; 0.848]	0.836 [0.809; 0.863]	0.823 [0.795; 0.851]	0.777 [0.748; 0.807]	0.832 [0.805; 0.859]	0.791 [0.762; 0.821]
p Value	0.025^a			0.045^a			<0.001^a		
	<0.001^a			0.049^a			<0.001^a		
MS vs NIND									
	CSF KFLC			KFLC index			KFLC IF		
Threshold	0.94	0.64	0.47	11.56	8.38	9.11	67.9	38.1	46.3
AUC	0.918 [0.902; 0.934]	0.926 [0.909; 0.942]	0.908 [0.890; 0.927]	0.929 [0.915; 0.943]	0.939 [0.926; 0.953]	0.937 [0.923; 0.951]	0.939 [0.926; 0.952]	0.952 [0.939; 0.965]	0.949 [0.936; 0.962]
p Value	0.212 ^a			0.022^a			0.021^a		
	0.007^a			0.235 ^a			0.235 ^a		

Abbreviations: AUC = area under the curve; MS = multiple sclerosis; NIND = noninflammatory neurologic disorder; OIND = other neurologic disease. Bold text indicates p values that reach statistical significance (p <0.05).
^a AUC comparison by DeLong method.

KFLC Index and KFLC IF Performed Better Than OCB in Diagnosing MS/CIS From All Controls

For this analysis, we evaluated the performances of binary KFLC biomarkers (according to the obtained threshold values) in separating MS/CIS from OIND/NINDC and compared them to OCB. A KFLC index >8.92 (AUC 0.887) and a KFLC IF > 67.3% (AUC 0.892) performed better than OCB (AUC 0.861) in diagnosing MS/CIS (p < 0.001 for KFLC index vs OCB comparison, and for KFLC IF vs OCB comparison). These results are translated by a higher sensitivity and the same specificity, favoring KFLC biomarkers

instead of OCB for MS/CIS diagnosis. Data are shown in Table 3.

KFLC Index and KFLC IF Tend to Perform Better Than OCB in Separating MS From OIND

To evaluate the ability of KFLC biomarkers to separate MS from OIND, KFLC binary variables, according to obtained cut-off, were compared with OCB status. A KFLC index >11.56 (AUC 0.835) and KFLC IF > 67.9% (AUC 0.831) tend to perform better than OCB (AUC 0.814) in diagnosing MS (p = 0.065 for KFLC index vs OCB comparison, and p = 0.138

Table 3 CSF KFLC, KFLC Index, KFLC IF, and OCB Diagnostic Performances in Separating MS/CIS From Controls (n = 1,621)

Variable	OCB	CSF KFLC >0.74 mg/L	p Value OCB vs CSF KFLC	KFLC index >8.92	p Value OCB vs KFLC index	KFLC IF >67.3%	p Value OCB vs KFLC-IF
AUC	0.861 [0.844; 0.878]	0.870 [0.853; 0.887]	0.265 ^a	0.887 [0.872; 0.903]	<0.001^a	0.892 [0.876; 0.908]	<0.001^a
Sensitivity (%)	81.99 [79.21; 84.77]	87.72 [85.35; 90.1]	<0.001^b	88.24 [85.95; 90.52]	<0.001^b	87.59 [85.2; 89.97]	<0.001^b
Specificity (%)	90.16 [88.1; 92.22]	86.43 [84.06; 88.79]	<0.001^b	89.36 [87.29; 91.42]	0.339 ^b	90.91 [88.92; 92.9]	0.446 ^b
Positive predictive value (%)	88.38 [85.97; 90.79]	85.51 [82.99; 88.02]	0.008^c	88.12 [85.83; 90.41]	0.852 ^c	89.79 [87.57; 92.01]	0.169 ^c
Negative predictive value (%)	84.58 [82.16; 87.00]	88.52 [86.29; 90.75]	<0.001^c	89.46 [87.4; 91.52]	<0.001^c	88.92 [86.77; 91.06]	<0.001^c
Well classified patients (%)	86.4	87.0		88.8		89.3	

Abbreviations: AUC = area under the curve; IF = intrathecal fraction; K = kappa; KFLC = kappa free light chain; OCB = oligodonal band. Bold text indicates p values that reach statistical significance (p <0.05).

^a AUC comparison by DeLong method.

^b McNemar test.

^c Package DTComPair.

Table 4 CSF KFLC, KFLC Index, KFLC IF, and OCB Performances in Separating MS (*n* = 675) From Other Inflammatory CNS Disorders (*n* = 297)

Variable	OCB	CSF KFLC >0.94 mg/L	<i>p</i> Value OCB vs CSF KFLC	KFLC index >11.56	<i>p</i> Value OCB vs KFLC index	KFLC IF >67.9%	<i>p</i> Value OCB vs KFLC IF
AUC	0.814 [0.787; 0.841]	0.810 [0.782; 0.839]	0.999 ^a	0.835 [0.809; 0.861]	0.065 ^a	0.831 [0.803; 0.858]	0.138 ^a
Sensitivity (%)	84.26 [81.46; 87.06]	86.73 [84.12; 89.34]	0.095 ^b	87.56 [85.07; 90.05]	0.026^b	89.35 [86.98; 91.73]	<0.001^b
Specificity (%)	78.09 [73.27; 82.91]	75.62 [70.62; 80.62]	0.307 ^b	79.73 [75.15; 84.31]	0.527 ^b	77.03 [72.13; 81.93]	0.647 ^b
Positive predictive value (%)	89.80 [87.4; 92.21]	89.06 [86.63; 91.5]	0.462 ^c	90.78 [88.56; 93.01]	0.331 ^c	89.91 [87.58; 92.23]	0.913 ^c
Negative predictive value (%)	68.42 [63.35; 73.49]	71.33 [66.22; 76.45]	0.195 ^c	73.75 [68.93; 78.57]	0.021^c	75.96 [71.01; 80.9]	<0.001^c
Well classified patients (%)	82.6	83.3		85.1		85.5	

Abbreviations: AUC = area under the curve; IF = intrathecal fraction; K = kappa; KFLC = kappa free light chain; MS = multiple sclerosis; OCB = oligoclonal band; OIND = other inflammatory neurologic/neurological disorder.

Bold text indicates *p* values that reach statistical significance (*p* < 0.05).

^a AUC comparison by DeLong method.

^b McNemar test.

^c Package DTComPair.

for KFLC IF vs OCB comparison). Again, these results are translated by a higher sensitivity and the same specificity, favoring KFLC biomarkers instead of OCB for MS diagnosis. All data are shown in Table 4.

Adding OCB to KFLC Biomarkers as a Combine Variable Does Not Increase Diagnostic Performances but Increases Specificity for MS Diagnosis

Because KFLC biomarkers and OCB's diagnostic performances were similar in separating MS from OIND, we analyzed whether a combined variable adding OCB to KFLC biomarkers performed better than KFLC biomarkers alone. The combined KFLC index variable performed similarly to KFLC index alone (AUC = 0.835 vs 0.826, *p* = 0.231), as for the KFLC IF (AUC = 0.831 vs 0.828, *p* = 0.666). Nonetheless, the double positive OCB/KFLC combined variable had higher specificity (*p* < 0.001) and lower sensitivity (*p* < 0.001) for MS diagnosis. The results are shown in eTable 8 (links.lww.com/NXI/A753).

Young Age, Female Gender, and Evidence of Disease Activity Were Independent Factors Associated With a High KFLC Index in MS

We then evaluated whether some clinical factors of interest independently influenced KFLC index values in patients with MS. In a univariate analysis, age, female gender, evidence of disease activity, MS phenotype, and the type of analyzer influenced KFLC index values, whereas the type of clinical event and immune-modifying drug consumption at sampling did not. In the multivariate analysis model, only young age (*p* = 0.013), female gender (*p* = 0.003), and evidence of disease activity (*p* < 0.001)

were associated with high KFLC index values in patients with MS (Table 5).

To better appreciate if age and gender influenced our results, we compared the performances of the KFLC thresholds between men and women and between 3 ranges of age (<30, between 30 and 55, and >55 years old). We found that gender did not influence our threshold diagnostic performances, whereas the AUC of all KFLC biomarkers were not statistically different between men and women (eTable 9, links.lww.com/NXI/A753). Similar results were found when comparing KFLC biomarker performances according to age. As shown in eTable 10, the sensitivity of KFLC biomarkers decreased with advanced age, whereas specificity increased.

KFLC Biomarkers Seem to Be Reproducible Across Centers

To evaluate the reproducibility of KFLC biomarkers, we compared, in patients with MS, median CSF KFLC, KFLC index, and KFLC IF values between each center that included at least 40 patients. The other centers were pooled together as another center. There was no statistical difference in median KFLC biomarker values between Marseille, Montpellier, Nantes, Nice, and other centers (*p* = 0.067, *p* = 0.268, and *p* = 0.091, for CSF KFLC, KFLC index, and KFLC IF comparisons, respectively) (eTable 11, links.lww.com/NXI/A753).

Second, the KFLC index and KFLC IF threshold values were applied separately in each center that included at least 100 patients with available data for MS, NINDC, and OIND groups. All KFLC thresholds seemed to separate MS from the dedicated control populations similarly (eTable 12, links.lww.com/NXI/A753).

Table 5 Clinical Factors Influencing KFLC Index Values in MS

	Univariate analysis		Multivariate analysis			
	Spearman correlation coefficient		Removing variable order	β coefficient	IC95	<i>p</i> Value
Age (n = 675)	$\rho = -0.14$			-1.0154	-1.82; -0.21]	0.013
	Median [IQR]	<i>p</i> Value				
Sex		<0.001^a			-53.26; -10.73]	0.003
Women (n = 481),	73.7 [27.1; 163.8]			<i>Ref Women</i>		
Men (n = 194)	48.3 [18.2; 99.9]			-31.99		
Evidence of disease activity		<0.001^a			-62.25; -17.31]	<0.001
Yes (n = 425)	80.8 [33.1; 172.3]			<i>Ref Yes</i>		
No (n = 177)	45.7 [15.0; 115.6]			-39.78		
Type of analyzer		0.042^b	1		-26.31; 49.46]	0.549
Optilite (n = 581)	65.3 [25.5; 147.5]			<i>Ref Optilite</i>		
SPAPLUS (n = 43)	92.8 [24.2; 164.6]			11.57		
BN ProSpec/BNII (n = 51)	39.1 [11.5; 62.8]					
MS type		<0.001^b	2			
RR-MS (n = 591)	68.8 [27.7; 158.3]			<i>Ref RR-MS</i>		
SP-MS (n = 14)	76.1 [18.8; 127.9]			-23.39	-91.34; 44.56]	0.234
PP-MS (n = 69)	36.1 [12.1; 76.3]			-22.106	-58.56; 14.35]	0.499
Type of sample						
Fresh (n = 370)	68.0 [24.6; 153.8]	0.765 ^a		—	—	—
Thawed (n = 305)	62.7 [24.4; 143.8]					
Immune treatment ongoing at sampling		0.251 ^a		—	—	—
Yes (n = 57)	53.2 [16.0; 130.3]					
No (n = 556)	65.8 [25.4; 147.7]					
Type of clinical event		0.867 ^b	—	—	—	—
Myelitis (n = 273)	71.0 [30.4; 144.1]					
Optic neuritis (n = 128)	80.4 [27.5; 147.4]					
Infratentorial (n = 100)	66.3 [24.9; 185.1]					
Supratentorial (n = 69)	59.9 [17.7; 135.7]					
>1 location (n = 37)	67.5 [25.5; 158.0]					

Abbreviation: IQR = interquartile range.

Bold text indicates *p* values that reach statistical significance (*p* <0.05).^a Wilcoxon-Mann-Whitney test.^b Kruskal-Wallis test.

Primary Research Question

Does KFLC biomarkers correctly separate patients having MS from patients having other CNS disorders, particularly other autoimmune CNS disorders? This study provides Class III evidence that KFLC index or IF can be used to differentiate patients with MS from nonselected controls and from patients with other autoimmune CNS disorders.

Discussion

Our study shows that the KFLC index and KFLC IF are valuable tools to detect MS, even compared with other non-infectious and nontumoral inflammatory neurologic disorders. As reported previously, LFLC biomarkers could not separate MS from controls with a reasonable accuracy.^{7,13,15} KFLC index and KFLC IF performed better than CSF KFLC,

reinforcing the need to weight FLC values with a blood-brain barrier permeability factor such as albumin quotient to increase diagnostic performances.

In this cohort, a KFLC index >8.92 or a KFLC IF $> 67.3\%$ permit to separate MS from controls, with better sensitivity and the same specificity as OCB. However, these KFLC thresholds seemed similar to OCB in separating MS from OIND, with a trend that favors KFLC biomarkers when increasing threshold values. Moreover, predictive studies^{23,34} found that KFLC index predict second clinical attack or MRI dissemination in space and time, in patients with CIS, with a good accuracy, slightly better than OCB.^{23,34} Because KFLC measurement is an easier way to prove intrathecal B-cell activity, with at least as good diagnostic performances than OCB, KFLC index or KFLC IF could be used in clinical practice instead of OCB as first-line MS biomarker. Nonetheless, using a combination of KFLC and OCB significantly increases specificity for MS diagnosis. Therefore, adding OCB to KFLC biomarkers may be helpful in atypical cases. Based on our results, the results of other diagnostic studies,⁷⁻¹⁴ the ones of predictive studies,^{21,23,34} and the knowledge into MS red flags,^{1,35,36} we propose an algorithm that integrate KFLC biomarkers to diagnose MS (eFigure 3, links.lww.com/NXI/A753).

Even if our threshold values seem close to each other, we found that using lower KFLC thresholds to separate MS from OIND statistically decreases diagnostic performance. As already reported, it highlights that some controls may present pathologic intrathecal B-cell activity.^{28,30,37,38} There is growing evidence that CNS B-cell activity is higher in MS than in other autoimmune disorders, as pointed out by pathologic analyses, showing a substantial perivascular B-cell infiltrate in MS compared with other inflammatory diseases.⁴ Süße et al.³⁰ reported similar results using KFLC IF, showing that using a 78.6% KFLC IF cut-off could separate MS-related myelitis ($n = 26$) from NMOSD-related myelitis ($n = 9$) with a good accuracy. These constants reinforce the interest in using quantitative biomarkers to measure CSF B-cell activity in suspected patients with MS. Of note, threshold values will always depend on the chosen control population. Therefore, the preciseness of our results should be used with caution in clinical practice, and the use of a 11.6 or 12 KFLC index threshold could be valuable to separate MS from OIND.

Our KFLC index thresholds seem consistent with currently published ones ranging from 3.045 to 10.62.⁷⁻¹³ The different chosen control populations can explain such discrepancy. For example, Leurs et al.⁷ identified a 6.6 KFLC index threshold to separate MS/CIS from controls. Only 30% of their 219 control patients had an inflammatory neurologic disorder explaining the lower cut-off obtained in this study. Another explanation could be the poor performance of the analyzers in detecting a low amount of FLC. For example, Sanz Diaz et al.¹² attributed a practical value of 0.0001 mg/L to all patients with undetectable CSF KFLC concentrations (157/197 controls), leading to the report of a low KFLC index cut-off of 3.045. In our cohort, for undetectable CSF KFLC data, we assessed an empirical value based on the LDL of the analyzer divided by 2. In doing so, we may not have

underestimated threshold values. Recently, Saadeh et al.¹⁴ reported, on a series of 1,359 patients (1,204 patients without MS), a median CSF KFLC value of 0.16 mg/L for controls, which seems similar to our empirical attributed value (0.17 mg/L).

Only a few studies focused on establishing a KFLC IF cut-off value to separate MS from controls.^{30,37} Most of the studies focused on the "presence or absence" of intrathecal KFLC synthesis based on a $QKFLC > QKFLC(\text{lim})$, leading to a KFLC IF $> 0\%$ as a binary result. However, many patients without MS may present with low intrathecal B-cell activity resulting in a lack of specificity in such an approach. Our results support that using a KFLC IF $> 67.9\%$ to assess an MS-specific intrathecal B-cell activity separates patients more accurately.

The use of either the KFLC index or KFLC IF to prove intrathecal immunoglobulin synthesis is debated. Nonetheless, both biomarkers use CSF and serum KFLC concentration and include the albumin quotient as the blood-brain barrier permeability correction variable. In our study, both performed equally to separate MS from controls and OIND. These results are in line with others.²⁷ Based on these results, both the KFLC index or KFLC IF can be used in daily practice.

In MS, OCB positivity is slightly modified over disease duration or disease-modifying treatment use.^{39,40} This is a crucial point to consider while a diagnostic biomarker needs to be efficient at the diagnostic workup. In our study, nearly 10% of the patients took an immune-modifying treatment at sampling, which did not influence KFLC index values. Moreover, we found that the KFLC index was not modified by the type of clinical demyelinating event nor by the MS phenotype (progressive vs relapsing), which allows its use in any clinical situation raising suspicion of MS. However, patients with evidence of MS activity at sampling presented with higher KFLC index values. This result is in line with predictive studies that showed that KFLC could predict MS disability²⁰ and second clinical attack in patients with CIS.^{24,34,41,42}

Of note, added to evidence of disease activity, we found that age and gender were independent KFLC index influencing factors in MS. KFLC sensitivity for MS diagnosis decreased in men, older patients, and inactive disease at sampling. Therefore, clinicians should be careful when interpreting a KFLC biomarker in an older man with suspected inactive MS, as a result, it could be negative. These findings may explain the observed difference in KFLC values between progressive and relapsing MS in the univariate analysis (and not in the multivariate analysis), whereas patients with progressive MS were older and more often men. Finally, we pointed out that median KFLC biomarkers values in patients with MS were similar between centers. The obtained KFLC thresholds permitted to correctly separate patients in each available center. These findings reinforce the reproducibility of such a biologic tool and its use in MS diagnostic workup. Nonetheless, dedicated prospective studies must confirm these results.

Our study is one of the first that evaluate the diagnostic performance of FLC biomarkers in a large multicenter cohort of MS and non-MS inflammatory patients. However, it has a few drawbacks. First, MS diagnosis was made according to the 2017 criteria, and dissemination in time data was not collected. Therefore, some patients with CIS could have been diagnosed with MS because of an OCB positive status, leading to a possible bias in comparing OCB and KFLC biomarker performance. However, this limitation tended to overestimate the OCB positivity in the MS group, which could not lead to an overestimation of KFLC biomarkers' diagnostic performance. We pooled patients with MS and CIS in the first analysis to avoid this limitation. Second, KFLC was measured using different analyzers and samples, in different laboratories.

We included the analyzer and sample types in the multivariate analysis model to evaluate their impact on our results to avoid this limitation. We found that both did not influence KFLC index values. However, the distribution of samples between the different analyzers was heterogeneous. Therefore, dedicated analyzers' comparative studies must be performed in MS to evaluate the consistency of FLC measurement, as it has been shown, in other disorders, that there were differences between the FLC measurement platforms.⁴³⁻⁴⁵ Third, we assigned an empirical FLC value equal to the LDL of the analyzer divided by 2 in patients with nondetectable FLC concentrations. We may not have overestimated KFLC biomarkers performances, whereas most patients with undetectable KFLC were not in the MS group. Finally, we excluded patients with CNS infections and/or tumors. Some of these patients may present elevated CSF B-cell activity, and their exclusion may have influenced KFLC biomarkers thresholds in this cohort. However, infections and tumors are not typical MS-mimicking diseases, and many other examinations allow to distinguish MS from such disorders.

In conclusion, KFLC is an automated and reliable variable that permits quantifying the CSF B-cell activity by calculating the KFLC index or KFLC IF. As supported by our results and the findings of other studies, the higher the KFLC biomarker value is, the higher the specificity for MS diagnosis will be. Based on these findings, we propose to use either a KFLC index >11.56 or a KFLC IF > 67.9% in patients presenting with atypical clinical demyelinating event suggestive of an inflammatory CNS disorder to favor MS from OIND. Otherwise, a KFLC index >8.92 or a KFLC IF > 67.3% can be used to favor MS diagnosis.

Study Funding

The authors report no targeted funding.

Disclosure

M. Levrault and S. Laurent-Chabalier report no disclosure related to this study. X. Ayrygnac has received consulting and lecturing fees, travel grants, and research support from Alexion Pharmaceuticals, Biogen Idec, Genzyme, Gilead, Novartis, Merck Serono, Roche, Sanofi Aventis, and Teva Pharma, none related to this study. K. Bigaut reports fees as consultant or for presentations in partnership with Biogen, Roche, Novartis, and

BMS/Celgene, none related to this study. M. Rival and S. Squalli report no disclosure related to this study. H. Zéphir, T. Alberto, and J.D. Pekar received free kappa free light chain reagents from Binding Site. J. Ciron has received personal compensation for consulting, serving on a scientific advisory board, speaking, or other activities with Biogen, Novartis, Merck, Sanofi-Genzyme, Roche, Celgene-BMS, and Alexion Pharmaceuticals, none related to this study. D. Biotti, B. Puissant-Lubrano, J.P. Camdessanché, Y. Tholance, O. Casez, B. Toussaint, and J. Marion report no disclosure related to this study. T. Moreau, D. Lakomy, and A. Thomasset report financial support from Binding Site for one kappa free light chain reagent. E. Maillart, D. Sterlin, A. Maurousset, A. Rocher, D. Laplaud, E. Bigot-Corbel, P.O. Bertho, J. Pelletier, J. Boucraut, P. Labauge, T. Vincent, J. De Sèze, I. Jahn, B. Seitz-Polski, E. Thouvenot, and C. Lebrun-Frény report no disclosure related to this study. Go to Neurology.org/NN for full disclosures.

Publication History

Received by *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation* April 7, 2022. Accepted in final form September 7, 2022. Submitted and externally peer reviewed. The handling editor was Friedemann Paul, MD.

Appendix 1 Authors

Name	Location	Contribution
Michael Levrault, MD	Unité de Recherche Clinique Cote d'Azur-UR2CA URRIS, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data; Study concept or design; Analysis or interpretation of data
Sabine Laurent-Chabalier, PhD	Département de Biostatistiques, Épidémiologie clinique et Santé Publique, Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes, Nîmes, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Analysis or interpretation of data
Xavier Ayrygnac, MD, PhD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Kévin Bigaut, MD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg, Strasbourg, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Manon Rival, MD	Service de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes, Nîmes, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Sanae Squalli, MD	Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes, Nîmes, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data

Continued

Appendix 1 (continued)

Name	Location	Contribution
Hélène Zéphir, MD, PhD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Lille, Lille, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Tifanie Alberto, MD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Lille, Lille, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Jean-David Pekar, MD	Centre Hospitalier Universitaire de Lille, Service de Biochimie Automatisée, Protéines (UF 8833), Lille, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Jonathan Ciron, MD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Hôpital Pierre-Paul Riquet, CRC-SEP, Toulouse Cedex 9, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Damien Biotti, MD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Hôpital Pierre-Paul Riquet, CRC-SEP, Toulouse Cedex 9, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Bénédicte Puissant-Lubrano, PharmD, PhD	Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Jean-Philippe Camdessanché, MD, PhD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Yannick Tholance, PharmD, PhD	Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Olivier Casez, MD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble Alpes, Grenoble, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Bertrand Toussaint, MD, PhD	Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, CHU Grenoble Alpes, TIMC, Grenoble, France; Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble Alpes, Grenoble, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Jeanne Marion, MD	Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble Alpes, Grenoble, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data

Appendix 1 (continued)

Name	Location	Contribution
Thibault Moreau, MD, PhD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier de Dijon, Dijon, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Daniela Lakomy, MD, PhD	Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, Dijon, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Audrey Thomasset, MD	Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, Dijon, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Elisabeth Maillart, MD	Département de Neurologie, Assistance-Publique des Hôpitaux de Paris, Centre Hospitalier Universitaire de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Delphine Sterlin, PharmD, PhD	Laboratoire d'Immunologie, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Centre Hospitalier Universitaire de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Aude Maurouset, MD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, Tours, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Auriane Rocher, MD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, Tours, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
David Axel Laplaud, MD, PhD	Université de Nantes, C2RTI Inserm UMR1064, service de Neurologie, CHU Nantes, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Edith Bigot-Corbel, PharmD, PhD	Département de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Pierre-Olivier Bertho, MD	Département de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Jean Pelletier, MD, PhD	Aix Marseille Univ, APHM, Hôpital de la Timone, Pôle de Neurosciences Cliniques, Service de Neurologie, Marseille, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Joseph Boucraut, MD, PhD	Laboratoire de Biochimie, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Centre Hospitalier Universitaire de La Conception, Marseille, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data

Appendix 1 (continued)

Name	Location	Contribution
Pierre Labauge, MD, PhD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Thierry Vincent, MD, PhD	Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Jérôme De Seze, MD, PhD	Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg, Strasbourg, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Isabelle Jahn, MD	Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire Strasbourg, Strasbourg, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data
Barbara Seitz-Polski, MD, PhD	Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data; Study concept or design
Eric Thouvenot, PhD	Service de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes, Nîmes, France; Institut de Génomique Fonctionnelle, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data; Study concept or design; Analysis or interpretation of data
Christine Lebrun-Frenay, MD, PhD	Unité de Recherche Clinique Cote d'Azur-UR2CA URRIS, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France; Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; Major role in the acquisition of data; Study concept or design; Analysis or interpretation of data

Appendix 2 Coinvestigators

Name	Location	Role	Contribution
Audoine Bertrand, MD, PhD	Marseille, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Bodisteanu Ruxanda, PhD	Nice, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Bost Chloé, PhD	Toulouse, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Boutière Clémence, MD	Marseille, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Bresch Saskia, MD	Nice, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Carra Dallièrre Clarisse, MD	Montpellier, France	SFSEP investigator	Acquisition of data

Appendix 2 (continued)

Name	Location	Role	Contribution
Charif Mahmoud, MD	Montpellier, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Cognot Chantal, PhD	Montpellier, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Cohen Mikael, MD	Nice, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Delalande Loreen, MD	Nantes, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Delourme Adrien, MD	Toulouse, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Dos Santos Amélie, MD	Nantes, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Dufat Laurant, PharmD	Paris, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Ghillani-Dalbin Pascale, PharmD, PhD	Paris, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Jentzer Alexandre, MD, PhD	Montpellier, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
LeGouellec Audrey, MD	Grenoble, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Louapre Céline, MD, PhD	Paris, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Maarouf Adil, MD, PhD	Marseille, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Onraed Brigitte, PhD	Lille, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Papeix Caroline, MD	Paris, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Pinna Frédéric, M.	Montpellier, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Pontal Daniel, M.	Montpellier, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Rico Audrey, MD, PhD	Marseille, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Russello Mélanie, Ms.	Montpellier, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Thisis Cédric, M.	Montpellier, France	SFSEP investigator	Acquisition of data
Wiertelwski Sandrine, MD	Nantes, France	SFSEP investigator	Acquisition of data

References

1. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-173.
2. Comi G, Bar-Or A, Lassmann H, et al. Role of B cells in multiple sclerosis and related disorders. *Ann Neurol*. 2021;89(1):13-23.
3. Li R, Patterson KR, Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 2018;19(7):696-707.
4. Machado-Santos J, Saji E, Tröschner AR, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain*. 2018;141(7):2066-2082.
5. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol*. 2005;62(6):865-870.
6. Franciotta D, Lolli F. Interlaboratory reproducibility of isoelectric focusing in oligodendrocyte band detection. *Clin Chem*. 2007;53(8):1557-1558.

7. Leurs CE, Twaalfhoven H, Lissenberg-Witte BJ, et al. Kappa free light chains is a valid tool in the diagnostics of MS: a large multicenter study. *Mult Scler*. 2020;26(8):912-923.
8. Ferraro D, Bedin R, Natali P, et al. Kappa index versus CSF oligoclonal bands in predicting multiple sclerosis and infectious/inflammatory CNS disorders. *Diagnostica (Basel)*. 2020;10(10):856.
9. Menéndez-Valladares P, García-Sánchez MI, Adom A, Martínez M, García De Veas Silva JL, Bermudo Guitarte C, Izquierdo Ayuso G. Validation and meta-analysis of kappa in dex biomarker in multiple sclerosis diagnosis. *Autoimmun Rev*. 2019;18(1):43-49.
10. Senel M, Tumani H, Lauda F, et al. Cerebrospinal fluid immunoglobulin kappa light chain in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *PLoS One*. 2014;9(4):e88680.
11. Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W, et al. Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: a multicenter study. *Mult Scler*. 2016;22(4):502-510.
12. Sanz Diaz CT, de Las Heras Flórez S, Carretero Perez M, Hernández Pérez MA, Martín García V. Evaluation of kappa index as a tool in the diagnosis of multiple sclerosis: implementation in routine screening procedure. *Front Neurol*. 2021;12:676527.
13. Senel M, Mojib-Yezdani F, Braisch U, et al. CSF free light chains as a marker of intrathecal immunoglobulin synthesis in multiple sclerosis: a blood-CSF barrier related evaluation in a large cohort. *Front Immunol*. 2019;10:641.
14. Saadeh RS, Bryant SC, McKeon A, et al. CSF kappa free light chains: cut-off validation for diagnosing multiple sclerosis. *Mayo Clinic Proc*. 2022;97(4):738-751.
15. Levraut M, Landes C, Mondot L, et al. Kappa free light chains, soluble interleukin-2 receptor, and interleukin-6 help explore patients presenting with brain white matter hyperintensities. *Front Immunol*. 2022;13:864133.
16. Duranti F, Pieri M, Centonze D, Buttari F, Bernardini S, Dessi M. Determination of kFLC and k index in cerebrospinal fluid: a valid alternative to assess intrathecal immunoglobulin synthesis. *J Neuroimmunology*. 2013;263(1-2):116-120.
17. Reiber H, Zeman D, Kušnierová P, Mundwiler E, Bernasconi L. Diagnostic relevance of free light chains in cerebrospinal fluid – the hyperbolic reference range for reliable data interpretation in quotient diagrams. *Clinica Chim Acta*. 2019;497:153-162.
18. Ferraro D, Trovati A, Bedin R, et al. Cerebrospinal fluid kappa and lambda free light chains in oligoclonal band-negative patients with suspected multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2020;27(3):461-467.
19. Hannich MJ, Dressel A, Budde K, Petersmann A, Nauck M, Süße M. Kappa free light chains in the context of blood contamination, and other IgA- and IgM-related cerebrospinal fluid disease pattern. *Cells*. 2021;10(3):616.
20. Süße M, Feistner F, Holbe C, et al. Diagnostic value of kappa free light chains in patients with one isolated band in isoelectric focusing. *Clinica Chim Acta*. 2020;507:205-209.
21. Rathbone E, Durant L, Kinsella J, et al. Cerebrospinal fluid immunoglobulin light chain ratios predict disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(10):1044-1049.
22. Menéndez-Valladares P, García-Sánchez MI, Cuadri Benítez P, et al. Free kappa light chains in cerebrospinal fluid as a biomarker to assess risk conversion to multiple sclerosis. *Mult Scler J - Exp Translational Clin*. 2015;1:205521731562093.
23. Berek K, Bsteh G, Auer M, et al. Kappa-free light chains in CSF predict early multiple sclerosis disease activity. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021;8(4):e1005.
24. Gaetani L, Di Carlo M, Brachekente G, et al. Cerebrospinal fluid free light chains compared to oligoclonal bands as biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroimmunology*. 2020;339:577108.
25. Schwenkenbecher P, Koenen FF, Wurster U, et al. The persisting significance of oligoclonal bands in the dawning era of kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):3796.
26. Süße M, Reiber H, Grothe M, et al. Free light chain kappa and the polyspecific immune response in MS and CIS – application of the hyperbolic reference range for most reliable data interpretation. *J Neuroimmunology*. 2020;346:577287.
27. Hegen H, Walde J, Milosavljevic D, et al. Free light chains in the cerebrospinal fluid. Comparison of different methods to determine intrathecal synthesis. *Clin Chem Lab Med (Cclm)*. 2019;57(10):1574-1586.
28. Emersic A, Anadolli V, Krsnik M, Rot U. Intrathecal immunoglobulin synthesis: the potential value of an adjunct test. *Clinica Chim Acta*. 2019;489:109-116.
29. Rosenstein I, Rasch S, Axelsson M, et al. Kappa free light chain index as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis: a real-world investigation. *J Neurochem*. 2021;159(3):618-628.
30. Süße M, Feistner F, Grothe M, Nauck M, Dressel A, Hannich MJ. Free light chains kappa can differentiate between myelitis and non-inflammatory myelopathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7(6):e892.
31. Koenen FF, Schwenkenbecher P, Wurster U, et al. The influence of renal function impairment on kappa free light chains in cerebrospinal fluid. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2021;13:117957352110421.
32. Teunissen C, Menge T, Altintas A, et al. Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013;19(13):1802-1809.
33. Moskowitz CS, Pepe MS. Comparing the predictive values of diagnostic tests: sample size and analysis for paired study designs. *Clin Trials*. 2006;3(3):272-279.
34. Arrambide G, Espejo C, Carbonell-Mirabent P, et al. The kappa free light chain index and oligoclonal bands have a similar role in the McDonald criteria. *Brain*. 2022:awac220.
35. Filippi M, Preziosa P, Banwell BL, et al. Assessment of lesions on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: practical guidelines. *Brain*. 2019;142(7):1858-1875.
36. Solomon AJ, Naismith RT, Cross AH. Misdiagnosis of multiple sclerosis: impact of the 2017 McDonald criteria on clinical practice. *Neurology*. 2019;92(1):26-33.
37. Hegen H, Milosavljevic D, Schnabl C, et al. Cerebrospinal fluid free light chains as diagnostic biomarker in neuroborreliosis. *Clin Chem Lab Med (Cclm)*. 2018;56(8):1383-1391.
38. Cavalla P, Caropreso P, Limoncelli S, et al. Kappa free light chains index in the differential diagnosis of multiple sclerosis from Neuromyelitis optica spectrum disorders and other immune-mediated central nervous system disorders. *J Neuroimmunology*. 2020;339:577122.
39. Greenfield AL, Dandekar R, Ramesh A, et al. Longitudinally persistent cerebrospinal fluid B cells can resist treatment in multiple sclerosis. *JCI Insight*. 2019;4(6):e126599.
40. Kowarik MC, Astling D, Lepennetier G, et al. Differential effects of fingolimod and natalizumab on B cell repertoires in multiple sclerosis patients. *Neurotherapeutics*. 2021;18(1):364-377.
41. Makshakov G, Nazarov V, Kochetova O, Surkova E, Lapin S, Evdoshenko E. Diagnostic and prognostic value of the cerebrospinal fluid concentration of immunoglobulin free light chains in clinically isolated syndrome with conversion to multiple sclerosis. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143375.
42. Salavisa M, Paixão P, Ladeira AF, et al. Prognostic value of kappa free light chains determination in first-ever multiple sclerosis relapse. *J Neuroimmunology*. 2020;347:577355.
43. Hoedemakers RMJ, Pruijt JFM, Hol S, et al. Clinical comparison of new monoclonal antibody-based nephelometric assays for free light chain kappa and lambda to polyclonal antibody-based assays and immunofixation electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*. 2011;50(3):489-495.
44. Messiaen AS, De Sloovere MMW, Claus PE, et al. Performance evaluation of serum free light chain analysis: nephelometry vs turbidimetry, monoclonal vs polyclonal reagents. *Am J Clin Pathol*. 2017;147(6):611-622.
45. Sasson SC, McGill K, Wienholt L, et al. Comparison of the FreeLite serum free light chain (SFLC) assay with serum and urine electrophoresis/immunofixation and the N Latex FLC assay. *Pathology*. 2015;47(6):564-569.

Annexe 4

Article 3

Journal (rang)

Neurology Neuroimmunology Neuroinflammation (A)

Kappa Free Light Chain Index Predicts Disease Course in Clinically and Radiologically Isolated Syndromes

Michael Levrault, MD, Antoine Gavoille, MD, Cassandre Landes-Chateau, PhD, Mikael Cohen, MD, PhD, Saskia Bresch, MD, Barbara Seitz-Polski, MD, PhD, Lydiane Mondot, MD, and Christine Lebrun-Frenay, MD, PhD

Correspondence
Dr. Levrault
michael.levrault@gmail.com

Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2023;10:e200156. doi:10.1212/NXI.000000000200156

Abstract

Background and Objectives

To evaluate whether the kappa free light chain index (K-index) can predict the occurrence of new T2-weighted MRI lesions (T2L) and clinical events in clinically isolated syndrome (CIS) and radiologically isolated syndrome (RIS).

Methods

All consecutive patients presenting for the diagnostic workup, including CSF analysis, of clinical and/or MRI suspicion of multiple sclerosis (MS) since May 1, 2018, were evaluated. All patients diagnosed with CIS and RIS with at least 1-year follow-up were included. Clinical events and new T2L were collected during follow-up. The K-index performances in predicting new T2L and a clinical event were evaluated using time-dependent ROC analyses. The time to clinical event or new T2L was estimated using survival analysis according to the binarized K-index using an independent cutoff of 8.9, and the ability of each variable to predict outcomes was compared using the Harrell c-index.

Results

One hundred and eighty two patients (146 CIS and 36 RIS, median age 39 [30; 48] y-o, 70% females) were included with a median follow-up of 21 [13, 33] months. One hundred five (58%) patients (85 CIS and 20 RIS) experienced new T2L, and 28 (15%; 21 CIS and 7 RIS) experienced a clinical event. The K-index could predict new T2L over time in CIS (area under the curve [AUC] ranging from 0.86 to 0.96) and in RIS (AUC ranging from 0.84 to 0.54) but also a clinical event in CIS (AUC ranging from 0.75 to 0.87). Compared with oligoclonal bands (OCBs), the K-index had a better sensitivity and a slight lower specificity in predicting new T2L and clinical events in both populations. In the predictive model, the K-index was the variable that best predict new T2L in both CIS and RIS but also clinical events in CIS (c-index ranging from 0.70 to 0.77), better than the other variables, including OCB.

Discussion

This study provides evidence that the K-index predicts new T2L in CIS and RIS but also clinical attack in patients with CIS. We suggest adding the K-index in the further MS diagnosis criteria revisions as a dissemination-in-time biomarker.

From the URRIS (M.L., C.L.-C., M.C., L.M., C.L.-F.), Unité Mixte de Recherche Clinique Côte d'Azur (UMR2CA); Service de Médecine Interne (M.L.), Hôpital l'Archet 1, Centre Hospitalier Universitaire de Nice; Service de Biostatistique-Bioinformatique (A.G.), Hospices Civils de Lyon; Service de Neurologie (A.G.), Sclérose en Plaques, Pathologies de La Myéline et Neuro-inflammation, Hôpital Neurologique Pierre-Wertheimer, Hospices Civils de Lyon, Bron; Service de Neurologie (M.C., S.B., C.L.-F.), Centre de Ressource et Compétence - Sclérose En Plaques, Hôpital Pasteur 2; ImmunoPredict (B.S.-P.), Unité Mixte de Recherche Clinique Côte d'Azur (UMR2CA); Laboratoire d'Immunologie (B.S.-P.), Hôpital l'Archet 1; and Service de Radiologie (L.M.), Hôpital Pasteur 2, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, France.

Go to [Neurology.org/NN](https://www.neurology.org/NN) for full disclosures. Funding information is provided at the end of the article.

The Article Processing Charge was funded by the authors.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND), which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Glossary

AUC = area under the curve; **CIS** = clinically isolated syndrome; **DIS** = dissemination in space; **DIT** = dissemination in time; **DMT** = disease-modifying treatment; **HR** = hazard ratio; **IgG** = immunoglobulin G; **KFLC** = kappa free light chain; **K-IF** = KFLC intrathecal fraction; **K-index** = KFLC index; **OCB** = oligoclonal band; **RIS** = radiologically isolated syndrome; **T2L** = T2-weighted lesions.

Introduction

Immune-mediated and demyelinating CNS disorders represent an extensive range of diseases, some presenting with a first and unique flare-up and others with relapsing or progressive worsening courses. Multiple sclerosis (MS) is the most common chronic inflammatory and demyelinating disorder affecting young adults, with a female predominance.¹ Several diagnosis criteria have been proposed and revised in the past 40 years, leading to a consensus on satisfying dissemination in space (DIS) and time (DIT) criteria to diagnose MS in patients presenting with a typical clinical demyelinating event.²⁻⁶

In clinical practice, some patients may present with a first clinical demyelinating event or with typical, asymptomatic, and fortuitously discovered MS-suggestive T2-weighted lesions (T2L) on the brain and spinal cord MRI. Both patients may be classified as having clinically isolated syndrome (CIS) and radiologically isolated syndrome (RIS), respectively,^{7,8} and are known to be at risk of developing MS.⁹⁻¹¹ Therefore, some biomarkers have been studied to predict the risk of developing clinically definite MS in such patients¹²⁻¹⁴ to limit wait-and-see attitudes risking increasing the potential patient's disability. The identification of CSF-restricted oligoclonal immunoglobulin-G (IgG) bands (OCB) is found in up to 85%–90%, 65%–70%, and 60%–65% of the patients diagnosed with MS, CIS, and RIS, respectively.^{11,15} Oligoclonal band positive status shows good performances in predicting clinical demyelinating event occurrence during follow-up in patients presenting with CIS and RIS.^{11,12,14} Because of these findings, OCB has been integrated into the last MS diagnosis criteria update as a DIT-replacing biomarker in patients presenting with a typical clinical event suggestive of MS and in the revised RIS criteria.^{6,16}

Nonetheless, because of financial and methodologic limitations due to the nonfully automatized and nonquantitative isoelectric focusing method, other CSF biomarkers are being investigated to join or replace OCB determination in MS spectrum disorders. The CSF kappa free light chain (KFLC) detection is an emerging MS biomarker reflecting intrathecal B-cell activity and having the interest of being quantitative and fully automatized. Many multicenter cohort studies found that KFLC shows good accuracy in detecting MS compared with control populations,¹⁷⁻²⁰ even when MS is compared with other immune-mediated CNS disorders.^{17,21} Many KFLC biomarkers have been studied, and there is growing evidence that

the KFLC index (K-index) or KFLC intrathecal fraction (K-IF), both using an albumin quotient as a blood-brain barrier permeability data correction variable, seems to have better performances in estimating KFLC intrathecal synthesis and diagnose MS, both with equal performances.^{17,22} However, we lack data on the prognostic role of the K-index in patients presenting with CIS,^{23,24} and there are no data in RIS.

This study investigated whether the K-index could predict new clinical events and new T2L on follow-up MRI scans in patients presenting with CIS and RIS.

Methods

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

According to French laws, the patients received transparent, fair, and appropriate research information, and written informed consent was obtained. The study was conducted following the Declaration of Helsinki and received approval from the institutional review board of the University Hospital of Nice (IRB number 2022 – EI-026).

Study Design

Based on prospectively acquired data, this retrospective study was conducted on patients referred to the MS tertiary center of Nice University Hospital, France. From May 1, 2018, to July 1, 2021, all consecutive patients older than 18 years presenting to our institution for a suspected MS diagnostic workup with at least 1-year follow-up and a CSF study were eligible. The patients were excluded from the analysis if they underwent lumbar puncture more than 6 months after the clinical event, if a disease-modifying treatment (DMT) was initiated before sampling (excepted for steroids), or if another diagnosis than CIS or RIS was made, including clinically definite MS. According to our institutional routine diagnostic workup, all patients underwent a brain and spinal cord 3T MRI, blood, and CSF analysis, including OCB determination and KFLC quantification. According to the standard of care, all patients had at least 1 clinical visit and 1 follow-up MRI per year. Medical electronic files of all eligible patients were recorded to collect demographic, clinical, biological, and MRI-needed data. Patients were then separated into groups according to their diagnosis: The CIS group comprised patients presenting with a first clinical demyelinating event, whatever their MRI and biological characteristics, and the RIS group formed patients presenting with typical MS-suggestive MRI T2L without a medical history of clinical events

Table 1 Description of the Population According to Both CIS and RIS Groups

	CIS, n = 146	RIS, n = 36
Age (y), median [Q1; Q3]	38 [29; 46]	46 (33; 56)
Sex (female), n (%)	96 (66)	31 (86)
No. of patients fulfilling the 2017 McDonald criteria, n (%)	78 (53)	—
Type of the clinical event at sampling		
Optic neuritis, n (%)	40 (28)	—
Myelitis, n (%)	64 (44)	—
Infratentorial attack, n (%)	37 (25)	—
Steroid use before sampling, n (%)	12 (8)	0 (0)
Time of disease duration at sampling (d), median [Q1; Q3]	22 [7; 62]	—
No. of patients with T2L in the location		
Periventricular, n (%)	94 (64)	36 (100)
Juxta/cortical, n (%)	83 (57)	31 (86)
Infratentorial, n (%)	76 (52)	13 (36)
Spinal cord, n (%)	97 (66)	9 (25)
No. of patients with isolated symptomatic T2L, n (%)	55 (38)	—
No. of patients with gadolinium-enhancing lesion, n (%)	62/130 (48)	2/31 (6)
No. of MRI/year/patient, median [Q1; Q3]	1.5 [1.1; 1.9]	1.1 (0.8; 1.5)
CSF protein count (g/L), median [Q1; Q3]	0.34 [0.27; 0.46]	0.32 (0.26; 0.43)
CSF WBC count (/mm ³), median [Q1; Q3]	2 [0; 5]	1 (0; 3)
IgG index, median [Q1; Q3]	0.68 [0.58; 1.00]	0.61 (0.54; 0.98)
Positive OCB status, n (%)	79 (54)	16 (44)
K-index, median [Q1; Q3]	37 [4; 106]	19 (3; 112)
Follow-up duration (mo), median [Q1; Q3]	20 [13; 33]	25 (16; 35)
No. of patients with clinical attack during follow-up, n (%)	21 (14)	7 (19)
Time to clinical attack (mo), median [Q1; Q3]	10 [6; 13]	19 (11; 38)
No. of patients with DMT start before clinical attack, n (%)	69 (47)	0 (0)
No. of patients with new T2L during follow-up, n (%)	85 (58)	20 (56)
Time to new T2L (mo), median [Q1; Q3]	6 [3; 11]	16 (9; 24)
No. of patients with DMT start before new T2L, n (%)	20 (14)	0 (0)

Abbreviations: CIS = clinically isolated syndrome; DMT = disease-modifying treatment; IgG = immunoglobulin G; KFLC = kappa free light chain; RIS = radiologically isolated syndrome; WBC = white blood cell.

suggestive of demyelinating CNS disorder according to RIS diagnosis criteria.⁸

Collected Data

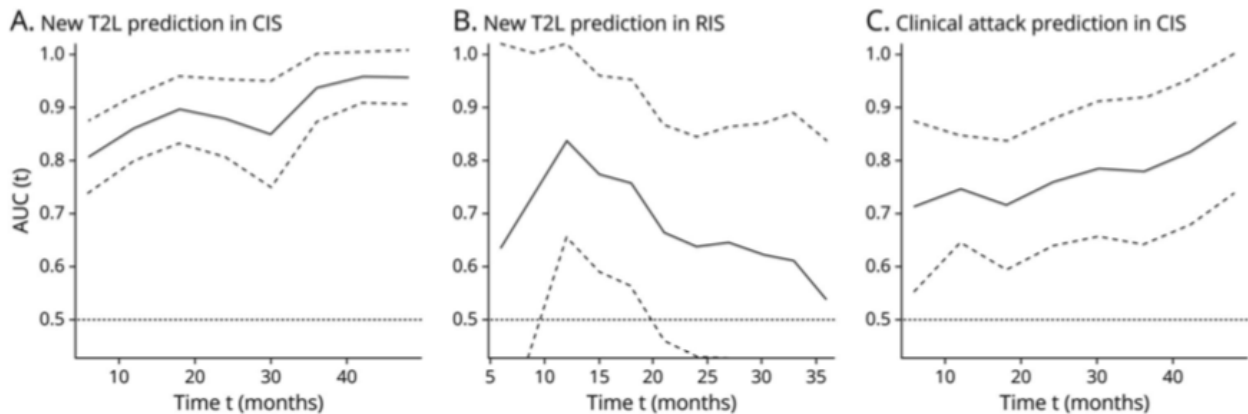
For all included patients, the following data were recorded at baseline: age, sex, time from the clinical event to blood and CSF sampling, type of clinical demyelinating symptom, steroid use before the workup, DIS location of T2L on the index brain and spinal cord MRI, presence of gadolinium-enhancing T1-weighted

lesion on index MRI, CSF protein, and white blood cell counts. CSF and serum albumin, IgG, OCB, and KFLC were recorded. At every follow-up visit, the following data were recorded: clinical attack occurrence suggestive of MS, presence of new T2L on MRI scan, and the initiation of disease-modifying treatment.

MRI Analysis

All patients underwent brain and spinal cord MRI according to routine care at baseline, with standardized MRI protocols²⁵

Figure 1 Time-Dependent ROC Analyses



The figure shows the ability of the K-index to predict over time (time-dependent AUC) new T2L occurrence in patients with CIS (panel A), new T2L occurrence in people with RIS (panel B), and clinical event occurrence in patients with CIS (panel C). Overall, the ability of the K-index to predict outcomes increases over time for CIS but decreases for RIS. The dashed lines show time-dependent CIs. AUC = area under the curve; CIS = clinically isolated syndrome; RIS = radiologically isolated syndrome; T2L = T2-weighted MRI lesions.

including 3D fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR), T2-weighted, and T1-weighted images. Gadolinium-enhanced T1-weighted images were recorded for most participants ($n = 161$ (88%)). All images were obtained on a 3T field strength MRI with axial and sagittal 1-mm-thick slice. MRI reading and analysis were performed by 2 experienced neurologists-radiologists (L.M. and C.L.F.). All patients underwent at least a yearly brain MRI evaluation. According to clinical practice, some participants were evaluated more frequently depending on neurologists' clinical assessment.

Blood and CSF Analysis

Blood and CSF were collected for all patients and analyzed in the Nice University Hospital immunology laboratory. Blood and CSF IgG, albumin, and KFLC were measured by turbidimetry with the analyzer Optilite (The Binding Site, Birmingham, UK) using the serum-free light chain immunoassay Freelite (The Binding Site, Birmingham, UK), according to the manufacturer's instructions. Oligoclonal bands were determined by isoelectric focusing on agarose gel using subsequent immunoblotting using IgG-specific antibody staining (Hydrasys platform; Sebia, Lisses, France). Oligoclonal band patterns were evaluated by an experienced biologist and classified as positive (patterns II and III) or negative (other patterns). A cutoff of ≥ 2 CSF-restricted bands was used to define OCB positivity. The determination of intrathecal synthesis of KFLC was evaluated by the calculation of the K-index using the formula:

$$\text{K-index} = (\text{CSF KFLC}/\text{serum KFLC})/(\text{CSF albumin}/\text{serum albumin}).$$
 According to previously published data, a K-index of ≥ 8.9 was considered as positive.¹⁷

Statistical Analysis

Continuous variables were described by median and interquartile range (first and third quartiles) and categorical

variables by count and percentage. The association of baseline covariates with the K-index was analyzed nonparametrically using the Wilcoxon rank-sum test for binary variables or the Kruskal-Wallis test for categorical variables with more than 2 levels.

The predictive performance of the quantitative K-index was analyzed using time-dependent ROCs to account for censored data: area under the curve (AUC) was calculated at different time points after diagnosis with a weighting by the inverse probability of the censoring approach. Optimal cutoffs at 12, 24, and 36 months were determined by maximizing the Youden index with a bootstrap method for the 95% CI. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were assessed at 12, 24, and 36 months using an independent K-index cutoff of 8.9¹⁷ and for OCB. Diagnostic performances of our calculated K-index thresholds were not used for statistical analyses because of high heterogeneity (different cutoffs at each time point and large 95% CIs).

The time to first new T2L and clinical relapse were analyzed with survival curves estimated using the Kaplan-Meier method for the binarized K-index using the 8.9 cutoff¹⁷ and for OCB, with statistical significance assessed using the log-rank test. Univariate Cox regressions were constructed for each baseline covariate to determine the hazard ratio (HR) of the time to first new T2L and clinical relapse. The proportional hazard assumption was visually assessed using Schoenfeld residuals. The Harrell c-index was calculated to compare each variable based on the goodness of fit of the univariate model, ranging from 0.5 (not better than random) to 1 (perfect concordance). p Values less than 0.05 were considered statistically significant. Analyses were performed using R software, version 4.0.3,²⁶ with the *timeROC* package for time-dependent ROC analysis.²⁷

Table 2 Hazard Ratio of Key Variables and Their Concordance Index in Estimating the Risk of New T2L Occurrence in Patients With CIS

	No	Value	Hazard ratio	95% CI	p Value	c-Index
None	—	—	—	—	—	0.50
Sex (male)	146	—	0.76	0.47–1.21	0.244	0.51
Age	146	Per 10 y increase	0.60	0.48–0.73	<0.001	0.67
Clinical event	146	Optic neuritis	0.56	0.32–1.01	0.051	0.59
	146	Myelitis	0.52	0.31–0.86	0.012	0.59
No. of affected MS locations by T2L on baseline MRI scan	146	1	1.23	0.26–5.82	0.790	0.72
	146	2	6.69	1.46–30.55	0.014	0.72
	146	3 or 4	10.59	2.59–43.36	0.001	0.72
Gadolinium-enhanced T1 lesion on baseline MRI scan	130	Yes	1.40	0.89–2.19	0.144	0.55
K-index	146	Per 10 increase	1.06	1.04–1.07	<0.001	0.77
Binarized K-index (>8.9)	146	Positive	17.17	7.41–39.79	<0.001	0.73
OCB	146	Positive	4.59	2.80–7.53	<0.001	0.69

Abbreviations: CIS = clinically isolated syndrome; K-index = kappa free light chain index; OCB = oligoclonal band; T2L = T2-weighted lesion.

Data Availability

Data not provided in the article because of space limitations may be shared (anonymized) at the corresponding author's request for replicating procedures and results.

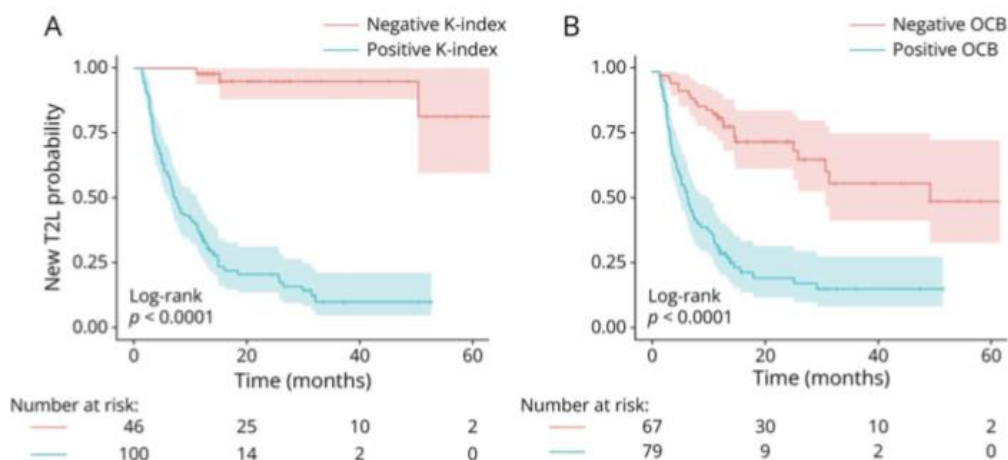
Results

Three hundred forty-four consecutive patients presented to our department during the study period for the diagnostic workup of a

suspected MS, and 182 patients (146 CIS and 36 RIS) were included (eFigure 1, links.lww.com/NXI/A896 in supplementary material). One hundred and twenty-seven (70%) patients were women; the median age was 39 years (30; 48). Participants with CIS and RIS were comparable according to their CSF analysis and follow-up duration. People with RIS were older and more frequently women than patients with CIS in this cohort (Table 1).

Both participants with CIS and RIS had similar K-index values (median of 36.9 [4.1; 105.8] for CIS and 18.9 [3.1; 111.9] for RIS,

Figure 2 Survival Analysis Evaluating New T2L Occurrence in Patients With CIS According to Their Binary K-Index and OCB Status



The figure shows the time to new T2L in patients with CIS according to their positive (blue line) or negative (red line) K-index status (panel A) and their positive (blue line) or negative (red line) OCB status (panel B). OCB = oligoclonal band; T2L = T2-weighted MRI lesions.

Table 3 Hazard Ratios of Key Variables and Their Concordance Index in Estimating the Risk of New T2L Occurrence in People With RIS

	No	Value	Hazard ratio	95% CI	p Value	c-index
None	—	—	—	—	—	0.50
Sex (male)	36	—	0.43	0.10–1.87	0.260	0.55
Age	36	Per 10 y increase	0.85	0.60–1.21	0.370	0.58
No. of affected MS locations by T2L on baseline MRI scan	36	2	1.84	0.16–20.62	0.620	0.54
	36	3 or 4	2.65	0.35–20.03	0.344	
Gadolinium-enhanced T1 lesion on baseline MRI scan	31	Yes	10.55	1.90–58.60	0.007	0.58
K-index	36	Per 10 increase	1.08	1.03–1.13	0.002	0.70
Binarized K-index (>8.9)	36	Positive	3.61	1.46–8.90	0.005	0.70
OCB	36	Positive	2.10	0.85–5.19	0.107	0.62

Abbreviations: K-index = kappa free light chain index; OCB = oligoclonal band; RIS = radiologically isolated syndrome; T2L = T2-weighted lesion.

$p = 0.440$) and positive OCB status (54% for CIS and 44% for RIS, $p = 0.393$). Positive OCB and K-index (binarized according to the 8.9 cutoff) were concordant in 149 (82%) patients. From the 33 (18%) remaining patients, most of them ($n = 30$) had a positive K-index with negative OCB. Detailed demographic, clinical, biological, and MRI data are provided in Table 1.

Of the 146 patients with CIS, 62 (48%) had at least 1 gadolinium-enhanced lesion on the baseline MRI scan, and 78 (53%) could be diagnosed with MS according to the 2017

McDonald criteria. From the 29 patients with CIS fulfilling the 2017 McDonald criteria because of OCB positivity (no or not reported T1 gadolinium-enhancing lesion), the median K-index value was 103.0 [53.6; 231.2], with a minimum value of 35.3.

At baseline, the K-index values significantly increased with the presence of a T1-weighted gadolinium-enhancing lesion ($p = 0.049$), the number of MS DIS locations on MRI ($p < 0.001$), and a positive OCB status ($p < 0.001$) and decreased

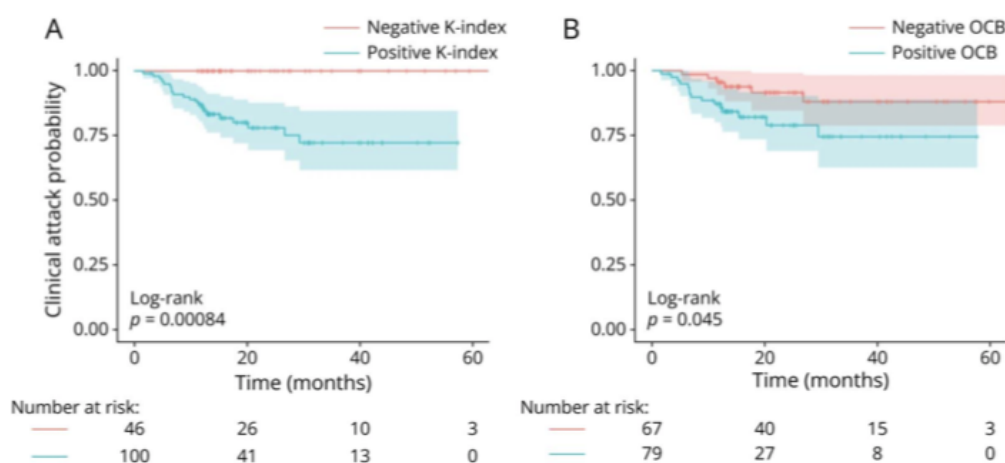
Table 4 Hazard Ratios of Key Variables and Their Concordance Index in Estimating the Risk of Clinical Attack Occurrence in Patients With CIS

	No	Value	Hazard ratio	95% CI	p Value	c-index
None	—	—	—	—	—	0.50
Sex (male)	146	—	0.44	0.15–1.31	0.142	0.56
Age	146	Per 10 y increase	0.69	0.46–1.03	0.071	0.64
Clinical event	146	Optic neuritis	0.59	0.17–2.09	0.412	0.57
	146	Myelitis	0.80	0.29–2.26	0.667	
No. of affected MS locations by T2L on baseline MRI scan	146	1	—	—	—	0.65
	146	2	—	—	—	
	146	3 or 4	—	—	—	
Gadolinium-enhanced T1 lesion on baseline MRI scan	130	Yes	0.88	0.36–2.12	0.772	0.50
K-index	146	Per 10 increase	1.04	1.01–1.07	0.007	0.71
Binarized K-index (>8.9)	146	Positive	—	—	—	0.68
OCB	146	Positive	2.56	0.99–6.60	0.053	0.62

Abbreviations: K-index = kappa free light chain index; OCB = oligoclonal band; T2L = T2-weighted lesion.

No HR could be estimated in clinical attack prediction for the variables “No. of affected MS locations by T2L on baseline MRI scan” and the “Binarized K-index” because no events occurred in one of the subgroups.

Figure 3 Survival Analysis Evaluating Clinical Attack Occurrence in Patients With CIS According to Their Binary K-Index and OCB Status



The figure shows the time to clinical attack occurrence in patients with CIS according to their positive (blue line) or negative (red line) K-index status (panel A) and their positive (blue line) or negative (red line) OCB status (panel B). CIS = clinically isolated syndrome; OCB = oligoclonal band.

with age ($p = 0.001$). The gender ($p = 0.074$) and the type of the clinical event ($p = 0.171$) did not statistically influence K-index values (eFigure 2, links.lww.com/NXI/A896 in supplementary material).

During the follow-up period (median of 21 months [13; 33]), 28 patients (15%) experienced a clinical event (21 CIS and 7 RIS), and 105 (58%) experienced at least 1 new T2L on follow-up MRI scans (85 CIS and 20 RIS). From the 69 patients with CIS for whom a DMT was started early after lumbar puncture, and before new clinical event occurrence, the median K-index was 72.5 [39.5; 214.6].

K-Index Value Predicted New T2L in Patients With CIS

According to time-dependent ROC analysis, the K-index had good prognostic performances to predict new T2L in CIS during follow-up, with AUC ranging from 0.86 [0.80; 0.92] at 12 months to 0.96 [0.91; 1.00] at 48 months (Figure 1A). As shown in Figure 1A, the AUC was stable over time. The supplementary data show individual ROC at different time points (eFigure 3, links.lww.com/NXI/A896). The obtained optimal cutoffs were 30.5 [11.6; 36.7] at 12 months, 14.9 [9.6; 40.9] at 24 months, and 13.6 [5.9; 46.6] at 36 months. According to Cox regression analysis, the hazard of new T2L in patients with CIS increased by 6% every time the K-index increased by 10 points (Table 2). Moreover, the K-index was the variable with the highest predictive performance (c-index of 0.77), compared with the number of DIS locations on T2-weighted images on baseline MRI scan (c-index of 0.72), the presence of T1 gadolinium-enhancing lesion (c-index of 0.55), and the OCB status (c-index of 0.69) (Table 2).

When using the K-index as a binary variable (positive or negative according to the 8.9 cutoff value), the K-index had a

better sensitivity (0.97–0.98 vs 0.70–0.82) and a slight lower specificity (0.55–0.79 vs 0.67–0.79) than OCB to predict new T2L over time in CIS (eTable 1, links.lww.com/NXI/A896 in supplementary material). Kaplan-Meier analyses showed that both OCB and the binarized K-index could predict the time to new T2L in patients with CIS ($p < 0.0001$, Figure 2).

K-Index Value Predicted New T2L in People With RIS

According to time-dependent ROC analysis, the K-index was able to predict new T2L in RIS, with AUC ranging from 0.84 [0.66; 1.00] at 12 months to 0.64 [0.43; 0.85] at 24 months (Figure 1B). The supplementary data show individual ROC at different time points (eFigure 4, links.lww.com/NXI/A896). The obtained optimal cutoffs were 30.2 [21.2; 227.2] at 12 months and 17.7 [2.1; 227.2] at 24 months. According to Cox regression analysis, the hazard of new T2L in patients with RIS increased by 8% every time the K-index increased by 10 points (Table 3). Again, the K-index was the variable with the highest predictive performance (c-index of 0.70), compared with the number of DIS locations on T2-weighted images on baseline MRI scan (c-index of 0.54), the presence of T1 gadolinium-enhanced lesion (c-index of 0.58), and the OCB status (c-index of 0.62) (Table 3).

When using the K-index as a binary variable (positive or negative according to the 8.9 cutoff value), the K-index had a better sensitivity (0.80–0.88 vs 0.58–0.75) and a lower specificity (0.38–0.48 vs 0.62–0.67) than OCB to predict new T2L over time in RIS (eTable 2, links.lww.com/NXI/A896 in supplementary material). Kaplan-Meier analyses showed that the binarized K-index could predict the time to new T2L in RIS ($p = 0.025$). Oligoclonal bands did not reach statistical significance for predicting new T2L in RIS ($p = 0.100$). Survival analyses are shown in supplementary material (eFigure 5).

K-Index Predicted Clinical Attack During Follow-up in Patients With CIS

According to time-dependent ROC analysis, the K-index had good prognostic performance to predict clinical attack in CIS, with AUC ranging from 0.75 [0.65; 0.85] at 12 months to 0.87 [0.74; 1.00] at 48 months (Figure 1C). As shown in Figure 1C, the AUC was stable over time. The supplementary data show individual ROC at different time points (eFigure 6, links.lww.com/NXI/A896). The obtained optimal cutoffs were 23.6 [20.0; 98.4] at 12 months and 9.6 [6.9; 80.5] at 24 months. According to Cox regression analysis, the hazard of clinical relapse in patients with CIS increased by 4% every time the K-index increased by 10 points (Table 4). The K-index was the variable with the highest predictive performance (c-index of 0.71), compared with the number of DIS locations on T2-weighted images on baseline MRI scan (c-index of 0.65), the presence of T1 gadolinium-enhanced lesion (c-index of 0.50), and the OCB status (c-index of 0.62) (Table 4).

When using the K-index as a binary variable (positive or negative according to the 8.9 cutoff value), the K-index had a better sensitivity (1.00 vs 0.68–0.77) and a lower specificity (0.35–0.42 vs 0.49–0.65) than OCB to predict new clinical events over time in CIS (eTable 3, links.lww.com/NXI/A896 in supplementary material). Kaplan-Meier analyses showed that the binarized K-index ($p = 0.008$) and OCB ($p = 0.045$) could predict the time to new clinical events in patients with CIS. Survival analyses are shown in Figure 3.

Discussion

In this prospective cohort of 146 patients with CIS and 36 patients with RIS, we show that the K-index measurement in the CSF is an exciting tool to predict the occurrence of new T2L at the early stages of MS spectrum disorders. The prediction extends to the clinical attack occurrence in patients with CIS. Of importance, we found that using the K-index as a continuous variable allows estimating the risk to fit the outcome (new T2L or clinical event) with a better concordance than a binarized K-index, reinforcing the use of a quantitative biomarker in such an approach.

Dedicated longitudinal studies focusing on the diagnostic performance of KFLC measurement to predict MS in patients presenting with early suggesting features (i.e., CIS and RIS) are still being determined.^{23,24,28-30} Most of these studies focused on the ability of the K-index to predict the occurrence of a second clinical event, but none specifically looked at whether the K-index could predict asymptomatic disease activity with the occurrence of new T2L. The 2017 McDonald criteria, used in clinical practice, specify that radiologic DIS and DIT, according to T2 or T1 gadolinium-weighted sequences, are enough to establish MS diagnosis and initiate specific DMT.⁶ Therefore, clinical relapse as the primary outcome of MS conversion does not reflect usual practice and

could underestimate the K-index predictive value. However, given the low number of clinical attacks in our RIS group, we could not show whether the K-index could predict clinical attack in this population and extend to the 2017 McDonald criteria fulfillment.

To our knowledge, there is only one study that evaluates the diagnostic performance of the K-index in predicting MS according to either new T2L or clinical relapse.²³ Based on the evaluation of 214 CIS patients, the authors found that using a positive K-index, based on a 5.9 or 6.6 cutoff values,^{18,31} had similar performances to OCB in predicting 2017 McDonald criteria fulfillment, with a slight increase in accuracy favoring the use of the K-index.²³ We found similar results, although, in our prospective cohort, the K-index could predict new T2L and clinical relapse in patients with CIS with a better concordance than OCB. Compared with the previous study,²³ we included all patients raising a suspicion of MS consecutively with a prospective evaluation of CSF parameters. Our follow-up duration is shorter (i.e., 2 years) but is counterbalanced by each patient's yearly clinical and MRI assessment.

Our findings, associated with others^{23,24} together suggest that the K-index should be evaluated in clinical practice as a DIT-replacing biomarker. The unresolved question is how to use it in clinical practice. There is currently no consensus on the cutoff value to use to separate patients as having intrathecal KFLC synthesis or not having it.^{32,33} Our results show that optimal K-index cutoffs that best separate patients vary over time. Moreover, the CIs associated with our K-index cutoffs are wide. For these reasons, we chose to not analyze the diagnostic performances of our obtained cutoffs, focusing on an independent one established on a large cohort of patients.¹⁷ A main finding is that we show that by using an 8.9 K-index cutoff, none of the negative K-index CIS patients experienced a clinical event during follow-up, highlighting the good sensitivity of such a biomarker. Therefore, using a low K-index cutoff, it is 5.9, 6.6, or 8.9, was sufficient to discriminate patients at low risk of new T2L or clinical events in this cohort. In positive K-index patients, the risk could be graduated using the continuous K-index to increase specificity for MS diagnosis.

Our knowledge about KFLC measurement in RIS is poor. Two previous KFLC studies included people with RIS as MS or control populations, but did not analyze them separately.^{34,35} Even if our sample of RIS is small, we could find that the K-index could predict new T2L over time. Of interest, as for patients with CIS, higher K-index values were associated with a shorter time to new T2L. Unfortunately, we could not find an association between the K-index and the risk of clinical attack in RIS because of the low number of included patients. Therefore, RIS-dedicated studies should be performed, including more patients, to evaluate the clinical predictive role of the K-index. However, this result is of interest; at the same time, the RIS criteria have been revised,¹⁶ and asymptomatic radiologic activity (i.e., new T2L and/or new

T1 gadolinium-enhancing lesion) and the presence of OCB appear as a critical feature in diagnosing people with RIS.

This study has some strengths but also many limitations. Being a monocentric analysis, the K-index performances may be overestimated, and multicentric prospective studies must confirm these results. Nonetheless, our results are concordant with others, reinforcing their interest.

The median follow-up of our cohort was short. It may lead to underestimating the K-index predictive performance. At the same time, some patients, classified as “not fulfilling the outcome,” may present with new T2L or clinical attacks in the further years of follow-up. Even if the timeline is short, our results remained statistically significant with stable AUC over time, particularly for patients with CIS.

In our cohort, we reported that half of our patients had positive OCB (54% of CIS and 44% of RIS), which is lower than that usually reported.^{11,15} It might be explained by the interrater reliability of the isoelectric focusing method,³⁶ reinforcing the need to use a fully automatized tool to measure intrathecal B-cell activity. Another explanation could be the prospective recruitment of this cohort. Some of our patients with CIS might be diagnosed retrospectively as having a monophasic idiopathic inflammatory demyelinating disease (i.e., idiopathic optic neuritis or myelitis),⁷ whereas 38% of our CIS cohort had a solitary symptomatic T2-weighted MRI lesion. We know that a small proportion of these patients may develop clinically definite MS.^{37,38} Still, they constitute the challenging part of patients for whom a prognostic biomarker is needed. Of importance, all patients with CIS with solitary T2-weighted images who experienced new T2L or clinical relapse had an elevated K-index.

Finally, DMT start was not taken into account as a confounding predictive factor. It has been performed deliberately for many reasons. First, DMT was started before new T2L occurrence in a small number of patients (n = 20). From these patients, the K-index value was elevated (median of 94.6). Therefore, some K-index-positive patients may be wrongly considered as not fulfilling the outcome, leading to an underestimation of the predictive value of the K-index. Second, in clinical practice, DMT start is made according to other known predictive factors such as the presence of T1 gadolinium-enhancing lesions or a high number of T2L. We show, in this study, that the K-index positively correlated with such MRI predictive biomarkers but also that it could predict the outcome with a better concordance. Third, all patients for whom a DMT was started in this study fulfilled the 2017 McDonald criteria. In clinical practice, the interest of using a biomarker to predict new T2L or clinical relapse is not needed in patients for whom a DMT can be started independently of such biomarker. Finally, it is difficult to assess the impact of DMT on the prognostic role of the K-index statistically, while it will require a very large cohort of patients, with some of them having a DMT and a negative K-index. Our cohort was too small to evaluate it.

Our study also has strengths. It has the advantage of being one of the first to evaluate the K-index as a predictive biomarker of asymptomatic new T2L. This outcome is relevant for clinical practice, although neurologists usually do not wait for another clinical event to identify DIT and treat patients as having MS. Moreover, our results align with others, identifying that the K-index is a highly sensitive biomarker to predict outcomes in CIS with very good performances and the first one using time-dependent ROC analyses to assess it. It reinforces the need for CSF analysis in diagnosing patients raising a suspicion of MS.

In conclusion, our study shows that the K-index reflects early disease course in MS spectrum disorders because it predicts new T2L in patients with RIS and MS (new T2L or clinical event) in patients with CIS. According to these findings and others, adding the K-index in the further revisions of MS diagnosis criteria should be discussed.

Study Funding

The authors report no targeted funding.

Disclosure

The authors report no relevant disclosures. Go to [Neurology.org/NN](https://www.neurology.org/NN) for full disclosures.

Publication History

Received by *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation* October 31, 2022. Accepted in final form July 19, 2023. Submitted and externally peer reviewed. The handling editor was Editor Josep O. Dalmau, MD, PhD, FAAN.

Appendix Authors

Name	Location	Contribution
Michael Levraut, MD	URRIS, Unité Mixte de Recherche Clinique Côte d'Azur (UMR2CA); Service de Médecine Interne, Hôpital l'Archet 1, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; and analysis or interpretation of data
Antoine Gavoille, MD	Service de Biostatistique-Bioinformatique, Hospices Civils de Lyon; Service de Neurologie, Sclérose en Plaques, Pathologies de La Myéline et Neuro-inflammation, Hôpital Neurologique Pierre-Wertheimer, Hospices Civils de Lyon, Bron, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and analysis or interpretation of data
Cassandra Landes-Chateau, PhD	URRIS, Unité Mixte de Recherche Clinique Côte d'Azur (UMR2CA), Centre Hospitalier Universitaire de Nice, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data

Continued

Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
Mikael Cohen, MD, PhD	URRIS, Unité Mixte de Recherche Clinique Côte d'Azur (UMR2CA); Service de Neurologie, Centre de Ressource et Compétence - Sclérose En Plaques, Hôpital Pasteur 2, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
Saskia Bresch, MD	Service de Neurologie, Centre de Ressource et Compétence - Sclérose En Plaques, Hôpital Pasteur 2, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, France	Major role in the acquisition of data
Barbara Seitz-Polski, MD, PhD	ImmunoPredict, Unité Mixte de Recherche Clinique Côte d'Azur (UMR2CA); Laboratoire d'Immunologie, Hôpital l'Archet 1, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content, and major role in the acquisition of data
Lydiane Mondot, MD	URRIS, Unité Mixte de Recherche Clinique Côte d'Azur (UMR2CA); Service de Radiologie, Hôpital Pasteur 2, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; and analysis or interpretation of data
Christine Lebrun-Frenay, MD, PhD	URRIS, Unité Mixte de Recherche Clinique Côte d'Azur (UMR2CA); Service de Neurologie, Centre de Ressource et Compétence - Sclérose En Plaques, Hôpital Pasteur 2, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; and analysis or interpretation of data

References

- Walton C, King R, Rechtman L, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*. 2020;26(14):1816-1821. doi:10.1177/1352458520970841
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227-231. doi:10.1002/ana.410130302
- McDonald WI, Compston DA, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50:121-127. doi:10.1002/ana.1032
- Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*. 2005;58:840-846. doi:10.1002/ana.20703
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald Criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292-302. doi:10.1002/ana.22366
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
- Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler*. 2008;14(9):1157-1174. doi:10.1177/1352458508096878
- Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2009;72(9):800-805. doi:10.1212/01.wnl.0000335764.14513.1a
- Filippi M, Preziosa P, Meani A, et al. Prediction of a multiple sclerosis diagnosis in patients with clinically isolated syndrome using the 2016 MAGNIMS and 2010 McDonald criteria: a retrospective study. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):133-142. doi:10.1016/S1474-4422(17)30469-6
- Okuda DT, Siva A, Kantarci O, et al. Radiologically isolated syndrome: 5-year risk for an initial clinical event. *PLoS One*. 2014;9(3):e90509. doi:10.1371/journal.pone.0090509
- Lebrun-Frenay C, Kantarci O, Siva A, et al. Radiologically isolated syndrome: 10-year risk estimate of a clinical event. *Ann Neurol*. 2020;88(2):407-417. doi:10.1002/ana.25799
- Arrambide G, Tintore M, Espejo C, et al. The value of oligoclonal bands in the multiple sclerosis diagnostic criteria. *Brain*. 2018;141(4):1075-1084. doi:10.1093/brain/aww006

- Thouvenot E, Hingsinger G, Demattei C, et al. Cerebrospinal fluid chitinase-3-like protein 1 level is not an independent predictive factor for the risk of clinical conversion in radiologically isolated syndrome. *Mult Scler*. 2019;25(5):669-677. doi:10.1177/1352458518767043
- Matute-Blanch C, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC, et al. Neurofilament light chain and oligoclonal bands are prognostic biomarkers in radiologically isolated syndrome. *Brain*. 2018;141(4):1085-1093. doi:10.1093/brain/awy021
- Dobson R, Romagosa S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis, and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(8):909-914. doi:10.1136/jnnp-2012-304695
- Lebrun-Frenay C, Okuda DT, Siva A, et al. The radiologically isolated syndrome: revised diagnostic criteria. *Brain*. 2023;146(8):3431-3443. doi:10.1093/brain/awad073
- Levrant M, Laurent-Chabalier S, Aygnac X, et al. Kappa free light chains biomarkers are efficient for the diagnosis of multiple sclerosis: a large multicenter cohort study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022;10(1):e200049. doi:10.1212/NXI.000000000200049
- Leurs CE, Twaalfhoven H, Lissenberg-Witte BI, et al. Kappa free light chains is a valid tool in the diagnostics of MS: a large multicenter study. *Mult Scler*. 2020;26(8):912-923. doi:10.1177/1352458519845844
- Saadeh RS, Bryant SC, McKeon A, et al. CSF kappa free light chains: cut-off validation for diagnosing multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc*. 2021;97(4):738-751. doi:10.1016/j.mayocp.2021.09.014
- Levrant M, Landes C, Mondot L, et al. Kappa free light chains, soluble interleukin-2 receptor, and interleukin-6 help explore patients presenting with brain white matter hyperintensities. *Front Immunol*. 2022;13:864133. doi:10.3389/fimmu.2022.864133
- Gaetani L, Di Carlo M, Brachelente G, et al. Cerebrospinal fluid free light chains compared to oligoclonal bands as biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2020;339:577108. doi:10.1016/j.jneuroim.2019.577108
- Hegen H, Walde J, Milosavljevic D, et al. Free light chains in the cerebrospinal fluid. Comparison of different methods to determine intrathecal synthesis. *Clin Chem Lab Med* 2019;57(10):1574-1586. doi:10.1515/cclm-2018-1300
- Arrambide G, Espejo C, Carbonell-Mirabent P, et al. The kappa free light chain index and oligoclonal bands have a similar role in the McDonald criteria. *Brain*. 2022;145(11):3931-3942. doi:10.1093/brain/awac220
- Berek K, Beteš G, Auer M, et al. Kappa-free light chains in CSF predict early multiple sclerosis disease activity. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021;8(4):e1005. doi:10.1212/NXI.0000000000001005
- Cotton F, Kremer S, Hannoun S, Vukusic S, Douset V, Imaging Working Group of the Observatoire Français de la Sclérose en Plaques. OFSEP, a nationwide cohort of people with multiple sclerosis: consensus minimal MRI protocol. *J Neurol*. 2015;262(3):333-340. doi:10.1016/j.neurad.2014.12.001
- R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing; 2020. R-project.org/
- Blanche P, Dartigues JF, Jacqmin-Gadda H. Estimating and comparing time-dependent areas under receiver operating characteristic curves for censored event times with competing risks. *Stat Med*. 2013;32(30):5381-5397. doi:10.1002/sim.5958/full
- Castillo-Villalba J, Gil-Perotin S, Gasque-Rubio R, et al. High level of cerebrospinal fluid kappa free light chains related to IgM intrathecal synthesis and might have prognostic implications in relapsing multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2022;13:827738. doi:10.3389/fimmu.2022.827738
- Malshakov G, Nazarov V, Kochetova O, et al. Diagnostic and prognostic value of the cerebrospinal fluid concentration of immunoglobulin free light chains in clinically isolated syndrome with conversion to multiple sclerosis. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143375. doi:10.1371/journal.pone.0143375
- Vecchio D, Bellomo G, Serino R, et al. Intrathecal kappa free light chains as markers for multiple sclerosis. *Sci Rep*. 2020;10(1):20329. doi:10.1038/s41598-020-77029-7
- Ferraro D, Bedin R, Natali P, et al. Kappa index versus CSF oligoclonal bands in predicting multiple sclerosis and infectious/inflammatory CNS disorders. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(10):856. doi:10.3390/diagnostics10100856
- Hegen H, Walde J, Berek K, et al. Cerebrospinal fluid kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Mult Scler*. 2023;29(2):169-181. doi:10.1177/13524585221134213
- Hegen H, Arrambide G, Gnanapavan S, et al. Cerebrospinal fluid kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis. A consensus statement. *Mult Scler*. 2023;29(2):182-195. doi:10.1177/13524585221134217
- Rosenstein I, Rasch S, Axelsson M, et al. Kappa free light chain index as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis: a real-world investigation. *J Neurochem*. 2021;159(3):618-628. doi:10.1111/jnc.15500
- Alves Martins D, Lopes J, Martins da Silva A, et al. Kappa free light chains: diagnostic performance in multiple sclerosis and utility in a clinical laboratory. *Clin Chim Acta*. 2022;528:56-64. doi:10.1016/j.cca.2022.01.017
- Franciotta D, Lolli F. Interlaboratory reproducibility of isoelectric focusing in oligoclonal band detection. *Clin Chem*. 2007;53(8):1557-1558. doi:10.1373/clinchem.2007.089052
- Tintore M, Rovira A, Río J, et al. Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2006;67(6):968-972. doi:10.1212/01.wnl.0000237354.10144.ec
- Tintore M, Rovira A, Río J, et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain*. 2015;138(Pt 7):1863-1874. doi:10.1093/brain/aww105