

7^e Colloque • GEAI 2012

jeudi 7 et vendredi 8 juin 2012



Actualités
Autoanticorps

SUPPLÉMENT

Elsevier Masson SAS
SAS au capital de 675 376 €
RCS Nanterre B 542 037 031
62, rue Camille-Desmoulins
92442 Issy-les-Moulineaux cedex



Tél./Fax: 01 71 16 ... + les 4 chiffres
de votre correspondant
<http://www.elsevier-masson.fr>

PRÉSIDENT ET DIRECTEUR DE LA PUBLICATION :

Stéphanie van Duin

RÉDACTRICE EN CHEF :

Martine Tirouche (54 63)
m.tirouche@elsevier.com

FAX-RÉDACTION : 01 71 16 51 59

MARKETING – RESPONSABLE DE MARCHÉ :

Séverine Lancia (50 60)
s.lancia@elsevier.com

PUBLICITÉ – DIRECTEUR DES VENTES :

Jean-Marie Pinson (53 10)
Mobile : 06 15 72 16 73
j.pinson@elsevier.com

SERVICE ABONNEMENTS :

Tél. : 01 71 16 55 99 – Fax : 01 71 16 55 77
infos@elsevier-masson.fr

PAO : 36nco, BOULOGNE-BILLANCOURT.

IMPRESSION :

LESCURE THÉOL, 27 DOUAINS.

Copyright © 2012 - Elsevier Masson SAS - Tous droits réservés. Cette publication et son contenu sont protégés par le copyright de Elsevier Masson SAS, et les dispositions suivantes s'appliquent à son utilisation: Les simples photocopies d'articles isolés sont autorisées pour un usage privé, dans la mesure où les lois nationales relatives au copyright le permettent. L'autorisation de l'éditeur et le paiement de redevances est obligatoire pour toutes les autres photocopies, y compris les copies multiples ou systématiques, les copies effectuées à des fins promotionnelles ou de publicité, la vente et toute autre forme de distribution de documents. Des tarifs spéciaux sont disponibles pour les institutions d'enseignement qui souhaitent faire des photocopies à des fins non commerciales d'enseignement. Les personnes peuvent obtenir les autorisations nécessaires et payer les redevances correspondantes auprès du Centre Français d'Exploitation du Droit de la Copie (20, rue des Grands-Augustins, F - 75006 Paris). Les abonnés sont autorisés à effectuer des copies des tables des matières, ou établir des listes d'articles comprenant des extraits pour un usage interne à l'intérieur de leurs institutions. L'autorisation de l'éditeur est requise pour toute vente ou divulgation en dehors de l'institution. L'autorisation de l'éditeur est requise pour tous autres travaux dérivés, y compris les compilations et les traductions. L'autorisation de l'éditeur est requise pour saisir de façon électronique tout élément contenu dans la présente publication, y compris tout ou partie d'un article. Prière de prendre contact avec l'éditeur à son adresse indiquée ci-dessus. À l'exception de ce qui est indiqué ci-dessus, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite, saisie dans un système de sauvegarde, ou transmise sous quelque forme que ce soit, électronique, mécanique, par photocopie, enregistrement ou autre, sans l'autorisation préalable et écrite de l'éditeur. La responsabilité de l'éditeur ne saurait en aucune façon être engagée pour tout préjudice et/ou dommage aux personnes et aux biens, que cela résulte de la responsabilité du fait des produits, d'une négligence ou autre, ou de l'utilisation de tous produits, méthodes, instructions ou idées contenus dans la présente publication. En raison de l'évolution rapide des sciences médicales, l'éditeur recommande qu'une vérification extérieure intervienne pour les diagnostics et la posologie.

CPPAP 0112 T 81120 – ISSN 1773-035x

Dépôt légal : à parution

Couverture :

© DR

Index des annonceurs :

A. Menarini Diagnostics	4
Bio Advance	34
Bio-Rad	4 ^e de couv.
Elsevier Masson	12
Eurobio	3 ^e de couv.
InGen	2 ^e de couv. – 24
Thermo Fisher Scientific	6

édito

7^e Colloque du GEAI

Les dernières décennies ont été marquées par des spectaculaires découvertes scientifiques qui ont accéléré de façon remarquable l'évolution de l'auto-immunologie. Aujourd'hui, nous savons qu'il existe une cinquantaine de maladies dans lesquelles l'auto-immunité est démontrée par la présence d'autoanticorps. Chaque année des maladies bien connues, souvent depuis de nombreuses années, s'avèrent être de nature auto-immune. Environ 80 autoanticorps différents peuvent actuellement être recherchés et peuvent servir de biomarqueurs de ces maladies. Les progrès gigantesques effectués en immunologie n'ont pu se réaliser que grâce à l'optimisation de nouvelles technologies. Issues de la recherche, de nouvelles approches et de nouvelles technologies sont en train de révolutionner les méthodes de recherche et d'identification des autoanticorps. L'auto-immunologie a été transférée des laboratoires spécialisés dans les laboratoires de routine.

Le diagnostic clinique des maladies auto-immunes est difficile. C'est pourquoi l'identification des autoanticorps doit être précise. Celle-ci dépend de la qualité des réactifs employés et de la connaissance du biologiste dans l'interprétation des tests. L'immunofluorescence demeure la méthode la plus utilisée pour la recherche des autoanticorps. Les tentatives de remplacement de l'immunofluorescence sur cellules HEP-2 par des méthodes immunoenzymatiques ont entraîné un tollé de protestations de la part des rhumatologues américains, obligeant les immunologistes à son maintien. Notre groupe a toujours défendu cette démarche. Un des arguments avancés par les laboratoires américains était la difficulté de la lecture microscopique. Celle-ci a entraîné le développement et la fabrication de systèmes de lecture automatique permettant de séparer les aspects positifs des négatifs. Quant à l'interprétation des images, celle-ci reste le privilège de l'œil humain. Pour cela il faut des expérimentateurs instruits pour cette tâche. «La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés» (Louis Pasteur).

Des coupes de tissus sont disponibles pour la recherche des anticorps spécifiques d'organes. Des sérums de contrôle positifs sont indispensables pour vérifier leurs performances. Pour certains autoanticorps très particuliers nous disposons maintenant de cultures de cellules transfectées. Leur utilisation n'est pas toujours aussi facile que nous l'annoncent les fabricants et l'interprétation est souvent délicate. En somme, l'auto-immunologie est une spécialité à part de la biologie médicale!

C'est dans cet esprit que fonctionne le GEAI, créé il y a 14 ans! Nous échangeons plusieurs fois par an nos impressions, nos expériences sur les différents domaines du diagnostic auto-immun. C'est dans ce même esprit que nous avons organisé notre 7^e Colloque, moment de discussion et de réflexion partagées avec toutes celles et tous ceux qui, comme nous, sont passionnés par les autoanticorps.

À tous je souhaite de passer deux journées utiles et agréables.

Professeur René-Louis Humbel
Président du GEAI

Remerciements

Le Pr René-Louis Humbel, président du GEAI, ainsi que tous les membres du GEAI, adressent leurs remerciements à l'association Biologie Prospective et aux sociétés suivantes dont le soutien financier a permis l'organisation de ce 7^e Colloque :

A. Menarini Diagnostics – Bio Advance – Bio-Rad – Bühlmann France – D-tek – Eurobio – InGen – Instrumentation Laboratory – Labodia France – Orgentec – Theradiag – Thermo Fisher Scientific.

Groupe d'étude de l'auto-immunité (GEAI)

Président : René-Louis Humbel, Laboratoire luxembourgeois d'immunopathologie (LLIP), Luxembourg.

Vice-présidente : Chantal André, CHU Henri-Mondor, Créteil.

Trésorier : Alain Chevailler, CHU, Angers.

Secrétaire : Laurent Teste, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette.

Membres : Isabel Abreu, Faculté de médecine, Lisbonne – Xavier Bossuyt, Hôpitaux Universitaires, Leuven – Pascale Chrétien, CHI, Créteil – Sophie Desplat-Jégo, Hôpital de la Conception, Marseille – Sylvain Dubucquoi, CHRU, Lille – Nicole Fabien, CH Lyon-Sud, Pierre-Bénite – Françoise Fortenfant, CHU Ranguel, Toulouse – Joëlle Goetz, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg – Catherine Johanet, CHU Saint-Antoine, Paris – Jean-Claude Monier, Caluire – Nils-Olivier Olsson, CHU, Dijon – Jean Sibilis, CHU Haute-pierre, Strasbourg – Thierry Vincent, CHU Saint-Eloi, Montpellier

JEUDI 7 ET VENDREDI 8 JUIN 2012 - INSTITUT PASTEUR

Actualités sur les autoanticorps

Éditorial René-Louis Humbel.....	3
Conduite à tenir devant la mise en évidence d'anticorps antinucléaires sur HEp-2 Joëlle Goetz.....	7
Systèmes automatisés de lecture des images de fluorescence Chantal André, Xavier Bossuyt.....	13
Les anticorps anti-ADN Pascale Chrétien.....	16
Anticorps dans les myopathies auto-immunes Nicole Fabien.....	18
Anticorps anti-récepteur à la phospholipase A2: marqueur sérologique de la glomérulonéphrite extra-membraneuse Étude d'une cohorte de 233 patients Gabrielle Denizaut, Faiza Mougari, Éric Anton, Stéphanie Ripert-Bernusset, Éric Ballot, Catherine Johanel.....	25
Elisa vs RIA Françoise Fortenfant.....	
Les synaptopathies auto-immunes René-Louis Humbel.....	29
Intérêt des anticorps anti-aquaporine-4 dans le diagnostic et le suivi de la neuromyéélite optique Thierry Vincent.....	32
Point de vue du clinicien Jean Sibillia.....	

Conduite à tenir devant la mise en évidence d'anticorps antinucléaires sur HEp-2

Joëlle Goetz^{a,b,*}

1. Introduction

Autoanticorps les plus prescrits en pratique médicale, les anticorps antinucléaires (ANA) sont dépistés par immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2. Lorsque le résultat du dépistage est positif, les ANA sont titrés, identifiés et les résultats obtenus interprétés en fonction du contexte clinique ayant motivé leur recherche. Ce n'est, en effet, que de la confrontation clinicobiologique que naît un diagnostic de connectivite ou d'hépatopathie auto-immune, principales indications de la recherche des ANA.

2. Le titrage des ANA

2.1. Dépistage des ANA: rappels

Détectant la plupart des ANA, l'immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules HEp-2 reste le « gold standard » pour le dépistage des ANA [1, 2, 3]. Il n'y a cependant pas de consensus concernant les facteurs pouvant influencer les résultats de l'IFI (conditions de culture et fixation des cellules HEp-2, dilution de dépistage, spécificité du conjugué...), ce qui constitue un véritable handicap aux tentatives de standardisation de la méthode [2].

En pratique, la plupart des laboratoires effectuent le dépistage des ANA à une dilution du sérum au 1/80^e ou au 1/160^e. Toutes techniques confondues, 10 à 15 % des sujets adultes apparemment sains ont des ANA à la dilution au 1/80^e et 5 % au 1/160^e, et cette fréquence augmente avec l'âge, principalement chez les femmes après 60 ans [1, 4]. De tels titres sont à l'évidence sans valeur diagnostique.

2.2. Titrage des ANA

Lorsque le dépistage est positif, des dilutions de raison 2 du sérum permettent de préciser le titre des ANA c'est-à-dire l'inverse de la dernière dilution donnant encore une

fluorescence. Chaque laboratoire doit définir son seuil de positivité et préciser sur la feuille de résultat si le titre observé est significatif (pathologique) ou non.

Lorsque le titre est élevé, le résultat est souvent rendu supérieur à une dilution limite (généralement 1/1 280). Les titres élevés sont principalement observés dans les maladies auto-immunes mais ils peuvent être retrouvés dans d'autres circonstances. Il semble aussi que certains sujets apparemment sains développent des ANA à titre élevé avec un aspect de fluorescence particulier appelé « *dense fine speckled* » (Ac anti-DSF-70, l'antigène cible ayant un poids moléculaire de 70 kDa) [3, 5, 6]. Les situations au cours desquelles peuvent être observés des ANA figurent dans le **tableau I** [7, 8].

Tableau I – Situations au cours desquelles peuvent être observés des ANA [d'après 7, 8].

Données cliniques	% sujets ayant des ANA
Maladies auto-immunes	
Lupus érythémateux systémique	> 95
Sclérodémie systémique	60 - 90
Syndrome de Gougerot-Sjögren	40 - 70
Dermatomyosite, polymyosite	40 - 70
Connectivite mixte	100
Polyarthrite rhumatoïde	15 - 50
Hépatopathies auto-immunes	Variable
Purpura thrombopénique idiopathique	10 - 30
Thyroidite auto-immune	30 - 50
Sclérose en plaques	25
Autres circonstances	
Fibrose pulmonaire idiopathique	55
Infections	Variable; si chronique: 10 - 50
Cancers	Variable
Fibromyalgie	15 - 25
ANA ou lupus induits par des médicaments	50 - 100
Implants mammaires en silicone	15 - 25
Sujets apparemment sains	
Population normale (titre 1/160)	5 augmente avec âge; femmes > hommes
Apparentés de sujets avec connectivite	5 - 25
Grossesse	5 - 10

a Laboratoire central d'immunologie

b Centre national de référence des maladies systémiques et auto-immunes rares

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
1, place de l'Hôpital
67091 Strasbourg Cedex

* Correspondance

joelle.goetz@chru-strasbourg.fr

3. L'identification des ANA

En pratique clinique, l'intérêt des ANA tient à la valeur diagnostique et pronostique de certains d'entre eux qui sont de véritables marqueurs des connectivites.

L'identification de ces marqueurs est effectuée :

- sur prescription médicale ciblée par des cliniciens qui ont l'expérience de ces pathologies ;
- à l'initiative du biologiste guidé par le titre des ANA et/ou l'aspect de la fluorescence.

3.1. Les aspects de fluorescence

L'IFI détecte à de rares exceptions près (certains Ac anti-Ro/SS-A et anti-Jo-1) la quasi-totalité des ANA ayant un intérêt en pathologie humaine (*tableau II*). La nature et la localisation de la fluorescence définissent l'aspect de la fluorescence ou le *pattern*. La dénomination des images n'est pas consensuelle, une nomenclature des aspects de fluorescence révisée en 2010 devrait apporter une homogénéité dans la définition des aspects de fluorescence rendus par les laboratoires [3].

Nous nous limiterons aux seuls aspects de fluorescence nucléaire, la conduite à tenir en cas de fluorescence cytoplasmique a déjà été traitée au cours d'un précédent colloque [9].

Dans certains cas, l'aspect de la fluorescence nucléaire est suffisamment évocateur pour que l'on puisse en déduire la structure nucléaire reconnue par l'Ac : Ac anti-centromères, Ac anti-membrane nucléaire, Ac anti-nucléoles, Ac anti-corps nucléaires de type *nuclear dots*.

Dans d'autres cas, l'aspect de la fluorescence nécessite une identification des ANA dépistés [3, 10, 11].

Les aspects mouchetés de la fluorescence doivent être complétés par une recherche d'Ac anti-ENA (*extractable nuclear antigen*) dirigés contre les antigènes nucléaires solubles quand il s'agit d'images de type :

- « *coarse granular* » (moucheté gros grains) évocatrices de la présence d'Ac anti-*spliceosomes* ou complexes d'épissage tels que les Ac anti-Sm et anti-U1 RNP ;
- « *fine speckled* » (moucheté fin) évocatrices de la présence d'Ac anti-Ro/SS-A avec ou sans Ac anti-La/SS-B ;
- moucheté pléiomorphe évocatrices de la présence d'Ac anti-PCNA, aspect nettement différent de ceux liés à la présence d'Ac de type pseudo-PCNA.

L'aspect homogène défini par une fluorescence uniforme diffuse du nucléoplasme et un marquage homogène de la chromatine (région chromosomique) des cellules HEp-2 en mitose correspond à la présence d'Ac anti-chromatine. Les Ac dirigés contre la chromatine peuvent être des Ac anti-ADN double brin/natif (anti-ADNdb), des Ac anti-nucléosomes, des Ac anti-histones ou d'autres Ac dirigés contre un constituant de la chromatine. Seuls les Ac anti-chromatine de spécificité anti-ADNdb et anti-nucléosomes ont un intérêt en pathologie humaine [11, 12].

3.2. La recherche des marqueurs

L'absence de standardisation de l'IFI sur cellules HEp-2 est un véritable handicap à l'établissement d'une stratégie ou d'un arbre décisionnel consensuel pour la recherche de ces marqueurs. Si la recherche systématique d'Ac anti-ADNdb

en cas de fluorescence de type anti-chromatine (homogène) fait l'unanimité, la stratégie de recherche des Ac anti-ENA n'est pas univoque. Les pratiques sont multiples et dépendent non seulement du titre des ANA, de l'aspect et la localisation de la fluorescence du noyau mais aussi de la prescription initiale (ciblée ou non), du prescripteur (accords avec les cliniciens), de l'expérience du biologiste (reconnaissance des spécificités rares, sensibilité et spécificité des réactifs utilisés).

La valeur diagnostique de ces marqueurs est définie par la sensibilité et la spécificité des tests utilisés, paramètres largement tributaires :

- des techniques utilisées pour leur identification (immunoprécipitation, immunofluorescence, ELISA, immunodot, fluorimétrie) ;
- de la nature des antigènes utilisés (antigènes natifs purifiés, antigènes recombinants, peptides de synthèse). Les antigènes extraits de tissus humains et purifiés représentent théoriquement les antigènes natifs, mais ceux-ci peuvent être dénaturés par des agents chimiques ou physiques, modifiant ainsi leur réactivité immunologique. Des antigènes recombinants peuvent être utilisés. Il faut privilégier ceux obtenus à partir de cellules eucaryotes par rapport à ceux obtenus chez les bactéries car ils sont très proches des antigènes natifs. L'utilisation de peptides de synthèse est à éviter, car beaucoup d'Ac sont dirigés contre des déterminants conformationnels exprimés uniquement sur la molécule native.

Les résultats sont aussi dépendants de la qualité de l'antigène fixé (pureté, configuration moléculaire, structure, stabilité) et de l'adsorption sur le support [10, 12, 13].

Aussi la recherche de ces marqueurs doit-elle être confiée à un laboratoire capable non seulement de mettre en œuvre l'ensemble des techniques nécessaires à leur détection et leur identification mais aussi d'interpréter leurs résultats.

4. L'interprétation d'un résultat positif d'ANA

Tout résultat positif d'ANA sur cellules HEp-2 doit être interprété non seulement en fonction du titre des ANA, de la présence ou non de marqueurs (Ac anti-ENA, Ac anti-ADNdb) mais aussi, et surtout, en fonction des données cliniques. Aucun diagnostic ne peut être établi sans confrontation des données cliniques et biologiques.

4.1. Les indications d'une recherche d'ANA

La recherche d'ANA est indiquée dès qu'il y a une suspicion de connectivite (syndrome de Gougerot-Sjögren, lupus érythémateux systémique, sclérodermie systémique, atteinte musculaire inflammatoire). L'expression clinique de ces maladies est polymorphe. Il peut s'agir de manifestations articulaires (arthralgies, [poly]arthrite), cutanées (phénomène de Raynaud, acrocyanose, nécroses superficielles, sclérose, télangiectasies, purpura, photosensibilité, doigts boudinés, érythème), musculaires (douleurs, faiblesse), thrombotiques, rénales (protéinurie, hématurie, cylindrurie, insuffisance rénale), hématologiques (cytopénie), neurologiques (psychose, mouvements anormaux...),

pulmonaires (pleurésie, HTAP, syndrome interstitiel...), digestives, ou d'un syndrome sec, de sérites. L'indication s'étend aux signes généraux (fièvre, altération de l'état général, asthénie inexpliquée, syndrome inflammatoire biologique inexpliqué) qui peuvent y être inauguraux. La recherche d'ANA est également indiquée dans les hépatopathies chroniques non virales et non médicamenteuses, dans ce contexte la présence d'ANA oriente vers une étiologie auto-immune de l'affection [14].

4.2. Le tableau clinique est évocateur de connectivité

Lorsque les manifestations cliniques évoquent une connectivité, la recherche des Ac anti-ENA et/ou anti-ADNdb constitue une aide au diagnostic, au pronostic ou au suivi de ces maladies (*tableau II*). La présence d'ANA à titre élevé avec des Ac anti-ENA et/ou anti-ADNdb va soit corroborer le diagnostic lorsque le tableau clinique est

typique, soit orienter ou faciliter le diagnostic lorsque le tableau clinique est incomplet.

Les Ac anti-Sm constituent un des critères biologiques de classification ou de diagnostic du LES, et les Ac anti-Scl-70 sont spécifiques de la sclérodermie systémique diffuse. Ces derniers ont aussi un intérêt pronostique puisqu'ils s'observent généralement dans les sclérodermies compliquées de fibrose pulmonaire.

Rappelons que les Ac anti-ARN-t synthétases (anti-Jo-1, anti-PL-7, anti-PL-12...) qui donnent une fluorescence cytoplasmique sont caractéristiques des polymyosites, et que ces patients ont souvent une atteinte pulmonaire interstitielle.

D'autres Ac sont retrouvés dans différentes affections et orientent le diagnostic avec un peu moins de spécificité, tels les Ac anti-U1-RNP dans la connectivité mixte et le LES, les Ac anti-Ro/SS-A natif ou anti-Ro/SS-A60 dans le syndrome de Gougerot-Sjögren, le LES, le lupus cutané

Tableau II – Anticorps antinucléaires dépistés en immunofluorescence : cibles et intérêts en pratique médicale [8, 25].

A. IF	Ac anti -	Maladie(s) associée(s) et prévalence	Signification clinique
Homogène du noyau	ADNdb	LES: 25-60 % (IFI sur <i>Crithidia luciliae</i>) 50-65 % (test de Farr) 75-85 % (ELISA)	Valeur diagnostique +++ pour le LES Observés dans les hépatites auto-immunes, le SGS ou induits par médicaments Titre souvent corrélé à l'activité du LES
	Histones	Pathologies diverses, auto-immunes ou non	Ac non spécifiques du lupus induit et sans intérêt en pathologie
	Nucléosome	LES: 67-85 % ; LES sans Ac anti-ADNdb: 60 %	Utiles pour le diagnostic de LES si suspicion +++ et Ac anti-ADNdb négatifs
Moucheté du noyau	Ro/SS-A (60)	SGS: 30-70 % ; LES: 20-30 % Affections autres: lupus cutané subaigu: 70 %	Critère diagnostique du SGS primaire Facteur de risque de lupus néonatal (bloc auriculo-ventriculaire congénital) Ac «anti-Ro/SS-A 52» (= anti-TRIM 21) sans intérêt en pratique
	La/SS-B	SGS: 30-40 % ; LES: 10-20 %	Toujours associés aux anti-Ro/SS-A. Facteur de risque de lupus néonatal
	U1-RNP	LES: 30 % ; connectivité mixte: 100 % Sclérodermie systémique: limitée: 3 % ; diffuse: 14 %.	Nécessaires au diagnostic de la connectivité mixte
	Sm(D)	LES: 2-10 % chez les caucasoïdes	Ac spécifiques du LES
	PCNA	LES: 2-5 %	Ac rarement observés en dehors du LES
	Mi-2	Dermatomyosites: 10-20 % ; polymyosites: < 5 %	Ac spécifiques de la DM auto-immune
Nucléolaire	PM-Scl	Syndrome de chevauchement myosite-sclérodermie: 25 % PM: 5 % ; sclérodermie systémique: 3 %	Marqueur diagnostique et pronostique avec incidence élevée de pneumopathie interstitielle et phénomène de Raynaud
	Scl-70	Sclérodermie systémique diffuse: 20-75 %	Valeur diagnostique +++ pour la SS diffuse Risque accru de fibrose pulmonaire et de cancer
Cytoplasmique	ARNt synthétases (Jo-1, PL-7, PL-12...)	Polymyosites: anti-Jo-1: 25 % ; autres: < 5 %. Syndrome des anti-ARNt synthétases (myosite, arthrite, Raynaud, fibrose pulmonaire, atteinte cutanée)	Marqueurs diagnostiques des PM/DM, du syndrome des anti-ARNt synthétases Valeur pronostique: fréquence accrue de fibrose pulmonaire
	Centromère	SS cutanée limitée (CREST syndrome): 40-90 % ; SS diffuse: 8 %. Parfois observés au cours du LES, SGS	Marqueur de bon pronostic de la sclérodermie systémique Valeur prédictive ++
Nucléoles	Sclérodermie systémique diffuse: 15-40 % Parfois présents dans le SGS, le LES	Marqueur de mauvais pronostic: atteinte cardiaque, rénale, pulmonaire Observés lors d'infections, de cancers ou induits par des médicaments	
Membrane nucléaire	CBP: si Ac anti-M2+ : 6-14 % , si Ac M2- : 31-50 %	Valeur diagnostique ++ des Ac anti-pores nucléaires (anti-gp210)	
(Multiple) nuclear dots	CBP: Si Ac anti-M2+ : 12-24% , si Ac anti-M2- : 40 %	Assez spécifiques de la CBP (Ac anti-Sp100)	
H ou M	Spécificité inconnue	Hépatites auto-immunes: 40-70 %.	Critère diagnostique des hépatites auto-immunes

Légende: A. IF = aspect de fluorescence; AC anti-M2 = AC anti-mitochondries de type 2; CBP = cirrhose biliaire primitive; H = homogène; HAI = hépatopathies auto-immunes; M = moucheté; PM/DM = polymyosite/dermatomyosite; SGS = syndrome de Gougerot-Sjögren; SS = sclérodermie systémique.

subaigu et le lupus néonatal dont la complication la plus grave est le bloc auriculo-ventriculaire congénital.

La présence en IFI d'Ac anti-centromère orientera vers une sclérodermie systémique, il en est de même pour les Ac anti-nucléoles à titre élevé lorsque les manifestations cliniques évoquent ce diagnostic.

4.3. Il n'y a pas de signes cliniques spécifiques ou très évocateurs de connectivite

La présence d'ANA sans Ac anti-ENA ou anti-ADNdb, quel que soit le titre, peut être observée lors :

- d'autres affections auto-immunes : la présence d'ANA au cours de la polyarthrite rhumatoïde et des thyroïdites auto-immunes n'a pas de valeur diagnostique mais elle constitue un critère diagnostique des hépatites auto-immunes [1, 7]. Chez les enfants atteints de polyarthrite juvénile, la présence d'ANA caractérise un sous-groupe de patients à risque élevé de survenue d'iridocyclites et/ou d'arthrites asymétriques [15];
- de certaines prises médicamenteuses : β -bloquants, interféron α , isoniazide, minocycline, anti-TNF α ... Les ANA sont le plus souvent présents isolément (le lupus induit est rare) et disparaissent après l'arrêt du traitement dans des délais variables, parfois supérieurs à un an [7, 16];
- de cancers : dans les tumeurs solides et les hémopathies malignes il existe une augmentation de la prévalence des ANA dont la signification n'est pas clairement établie (épiphénomène ? Réponse à des antigènes nucléaires modifiés lors de la transformation cellulaire ?). Le plus souvent les titres sont faibles mais des titres élevés peuvent être observés. Les manifestations cliniques paranéoplasiques semblent plus fréquentes lorsqu'il existe des ANA mais elles ne sont ni spécifiques ni liées au titre des ANA. Des ANA donnant des aspects de fluorescence particuliers peuvent être observés au cours de cancers. Ces ANA, rares, sont essentiellement dirigés contre des composants cellulaires intervenant dans la croissance et la prolifération cellulaire : Ac anti-protéine centromérique F (CENP-F), ANA de type pseudo-PCNA ou autres Ac de type anti-« *chromosomal passenger proteins* » [17-20]. Si les Ac anti-CENP-F ne sont pas fréquents au cours des cancers (< 10 %), près de 50 à 70 % des patients ayant des Ac anti-CENP-F ont un cancer [20];
- d'infections aiguës ou chroniques : infections virales (virus d'Epstein-Barr, VIH, VHC, parvovirus B19, virus coxsackie...), infections bactériennes (borréliose, tuberculose, endocardites lentes...) infections parasitaires (leishmaniose) [21, 22].

4.4. Le tableau clinique est évocateur d'une affection auto-immune du foie

La présence d'ANA à des titres modérés ou élevés et/ou d'Ac anti-muscles lisses de type anti-actine figure parmi les critères diagnostiques de l'hépatite auto-immune de type 1 dans les deux scores (score international révisé en 1999 ou score simplifié) des hépatites auto-immunes. Les ANA présents dans ces cas sont souvent dirigés contre un constituant de la chromatine [23-25].

Le diagnostic de cirrhose biliaire primitive (CBP) est facilité par la présence d'ANA très spécifiques de la maladie :

- les Ac anti-membrane nucléaire dirigés contre des protéines des pores, en particulier les Ac anti-gp210 présents chez 10 à 50 % des patients atteints de CBP, et les Ac anti-nucléopore Nup62, les deux spécificités étant de mauvais pronostic avec une évolution plus rapide de la CBP vers l'insuffisance hépatique;
- les Ac anti-Sp100 observés dans près de 25 % des CBP et dirigés contre les corps nucléaires, responsables de l'aspect de fluorescence de type *multiple nuclear dot*. Cet aspect de fluorescence n'est cependant ni spécifique des Ac anti-Sp100 (les Ac anti-PML, anti-NDP 52, anti-Sp140 donnent le même aspect de fluorescence) ni spécifique de la CBP (cet aspect peut être observé dans d'autres affections en particulier dans le LES) [25-28]. Au cours de la CBP, il est possible d'observer d'autres ANA ayant une valeur pronostique. La présence d'Ac anti-centromère constitue un facteur de risque d'évolution défavorable de la CBP (hypertension portale). Par ailleurs, les patients ayant une CBP et des Ac anti-centromère ont plus souvent un syndrome de Gougerot-Sjögren associé à la CBP comparés à ceux qui ont une CBP sans Ac anti-centromère [26, 28].

4.5. ANA et sujets apparemment sains

Des ANA à titre faible (< 320) sans Ac anti-ENA ni anti-ADNdb peuvent s'observer chez des sujets sains, la prévalence des ANA augmente avec l'âge (20 à 25 % des sujets de plus de 60 ans ont des ANA) dans les deux sexes. Après 80 ans, la prévalence des ANA chez les hommes semble rejoindre celle observée chez les femmes [29].

Des ANA peuvent précéder l'apparition des signes cliniques de connectivite à un stade où la symptomatologie est pauvre et non spécifique [30, 31].

La signification des Ac anti-DFS70 reste à préciser.

5. Conclusion

En pratique, la présence d'ANA s'observe essentiellement dans quatre situations :

- au cours de maladies auto-immunes, en particulier au cours des connectivites où certaines spécificités constituent de véritables marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques;
 - au cours des hépatopathies auto-immunes mais aussi au cours de la polyarthrite rhumatoïde, des thyroïdites auto-immunes;
 - au cours de maladies infectieuses, de façon transitoire, avec des titres plus ou moins variables;
 - au cours de cancers avec des aspects de fluorescence variables, certains de ces Ac pouvant être présents avant le diagnostic du cancer;
 - lors de la prise de certains médicaments inducteurs.
- Néanmoins il faut se rappeler que des sujets sains peuvent avoir des ANA (les titres sont généralement faibles sauf pour les Ac anti-DFS70) et que la présence d'ANA avec marqueurs peut être un des premiers signes de la survenue ultérieure d'une connectivite.

Déclaration d'intérêts : l'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article

Références

- [1] Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH, et al. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum* 2002;47(4):434-44.
- [2] Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010;69(8):1420-2.
- [3] Wiik AS, Hoier-Madsen M, Forslid J, et al. Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun* 2010;35(3):276-90.
- [4] Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1601-11.
- [5] Humbel RL. Anticorps anti-DFS70/LEDGF/P75. *GEAI l'info* 2005, <http://www.geai-lesautoanticorps.fr>
- [6] Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, et al. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011;63(1):191-200.
- [7] Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(1):71-81.
- [8] Bradwell AR, Hughes RG, Karim AR. Immunofluorescent antinuclear antibody tests. In: Detrick B, Hamilton RG, Folds JD editors. *Manual of molecular and clinical laboratory immunology*. 7th edition. Washington:ASM Press;2006.p 995-1006.
- [9] Goetz J. Conduite à tenir devant une fluorescence cytoplasmique sur cellules HEp-2. *Rev Fr Lab* 2006;384bis:5-10.
- [10] Damoiseaux JGMC, Cohen Tervaert JW. From ANA to ENA: How to proceed? *Autoimmun Rev* 2006;5(1):10-7.
- [11] Goetz J. Marqueurs biologiques anciens et modernes du lupus érythémateux systémique. *Rev Rhum Ed Fr* 2005;72:134-41.
- [12] Kavanaugh AF, Solomon DH and the American College of Rheumatology ad hoc committee on immunologic testing guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum* 2002;47(5):546-55.
- [13] Humbel RL. Importance des antigènes dans les méthodes de recherche des autoanticorps. *Rev Fr Lab* 2008;404bis:7-10.
- [14] Goetz J, Jahn I, Bahram S. Recherche d'anticorps antinucléaires. *Alsamed* 2008;58:36-7.
- [15] Breda L, Nozzi M, De Sanctis S, et al. Laboratory tests in the diagnosis and follow-up of pediatric rheumatic diseases: an update. *Semin Arthritis Rheum* 2010;40(1):53-72.
- [16] Szyper-Kravitz M, Shoenfeld Y. Drug-induced autoimmunity. In: Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin ME, editors. *Diagnostic criteria in autoimmune diseases*. Totowa:Humana Press;2008.p 59-63.
- [17] Solans-Laqué R, Pérez-Bocanegra C, Salud-Salvia A, et al. Clinical significance of antinuclear antibodies in malignant diseases: association with rheumatic and connective tissue paraneoplastic syndromes. *Lupus* 2004;13(3):159-64.
- [18] Abu-Shakra M, Buskila D, Ehrenfeld M, et al. Cancer and autoimmunity: autoimmune and rheumatic features in patients with malignancies. *Ann Rheum Dis* 2001;60(5):433-40.
- [19] Humbel RL. Anticorps antinucléaires et cancers. *Rev Fr Lab* 2010;424bis:27-31.
- [20] Fritzier MJ, Rattner JB, Luft LM, et al. Historical perspectives on the discovery and elucidation of autoantibodies to centromere proteins (CENP) and the emerging importance of antibodies to CENP-F. *Autoimmun Rev* 2011;10(4):194-200.
- [21] Meyer O. Autoanticorps en médecine. Quand les demander? Interprétation critique d'un résultat. In: Meyer O, Rouquette AM, Youinou P, editors. *Autoanticorps marqueurs des maladies auto-immunes*. Paris:BMD Editions;1999.p 45-67.
- [22] Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Infections and SLE. *Autoimmunity* 2005;38(7):473-85.
- [23] Makol A, Watt KD, Chowdhary VR. Autoimmune hepatitis: a review or current diagnosis and treatment. *Hepat Res Treat* 2011:390916.
- [24] Lohse AW, Wiegand C. Diagnostic criteria of autoimmune hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25(6):665-71.
- [25] Zeman MV, Hirschfield GM. Autoantibodies and liver diseases: uses and abuses. *Can J Gastroenterol*. 2010;24(4):225-31.
- [26] Gao L, Tian X, Liu B, et al. The value of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Med* 2008;8(1):9-15.
- [27] Hirschfield GM. Diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25(6):701-12.
- [28] Hu CJ, Zhang FC, Li YZ, et al. Primary biliary cirrhosis: what do autoantibodies tell us? *World J Gastroenterol* 2010;16(29):3616-29.
- [29] Nilsson BO, Skogh T, Ernerudh J, et al. Antinuclear antibodies in the oldest-old women and men. *J Autoimmun* 2006;27(4):281-8.
- [30] Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349(16):1526-33.
- [31] Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, et al. Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. *Arthritis Res Ther* 2011;13(1):R30.

Systèmes automatisés de lecture des images de fluorescence

Chantal André^{a,*}, Xavier Bossuyt^b

1. Introduction

Dans la stratégie de diagnostic des maladies auto-immunes, la recherche d'autoanticorps tient une grande place. Malgré la mise en place de technologies utilisant un antigène unique ou en multiplexage avec des antigènes purifiés ou recombinants, la détection d'une grande majorité d'autoanticorps est basée sur la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules isolées, en culture ou sur coupes tissulaires. Traditionnellement, la stratégie combine une recherche par IFI suivie d'identification des cibles par diverses techniques utilisant les antigènes spécifiques appropriés.

Les anticorps antinucléaires et anticytoplasmiques sont des marqueurs importants pour le diagnostic des maladies rhumatismales systémiques et des hépatopathies auto-immunes [1-3]. Malgré l'apparition et l'automatisation de tests immunologiques spécifiques d'antigènes, les recommandations internationales établissent que l'IFI sur cellules HEp-2 doit rester le « gold standard » pour la recherche d'anticorps antinucléaires [4], technique la plus sensible et la plus informative.

Les techniques d'IFI manuelles sont consommatrices de temps et souffrent de variations intra- et inter-laboratoires. Depuis de nombreuses années, elles ont bénéficié de l'apport des appareils préparateurs de lames réalisant la technique de façon automatisée et apportant ainsi un gain de temps et de précision par rapport aux techniques manuelles.

L'interprétation de la fluorescence nécessite l'utilisation d'un microscope à fluorescence et la lecture visuelle est aussi consommatrice de temps mais dépend essentiellement de la qualification d'opérateurs experts, condition indispensable à une bonne reproductibilité intra- et inter-laboratoires.

Les recherches, ces dernières années, s'appliquent à rendre l'IFI complètement automatisée et récemment des systèmes d'interprétation automatisée de l'immunofluorescence avec

des logiciels reconnaissant certains aspects de fluorescence ont été introduits [5, 6] et commencent à être utilisés, la plupart sont en cours d'évaluation et d'amélioration.

2. Intérêt d'automatiser la lecture en IFI

Le nombre de tests à effectuer par les laboratoires et l'harmonisation des résultats sont à la base de ces projets d'automatisation.

La demande de recherche d'autoanticorps s'est accrue depuis ces dernières années, notamment, du fait de leur intérêt clinique, la recherche d'anticorps antinucléaires, mais aussi d'autres autoanticorps tels que les anticorps anti-ADN natif en IFI sur *Crithidia luciliae* ou les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA). La variabilité dans les résultats est un point important car, malgré les directives internationales recommandant d'utiliser en IFI la lignée HEp-2 qui permet la détection de plus de trente différents antigènes nucléaires ou cytoplasmiques, il est indispensable d'harmoniser la lecture des aspects de fluorescence [4, 7-9]. Une bonne analyse de l'aspect de fluorescence oriente souvent vers la spécificité de l'anticorps et vers les tests d'identification à effectuer mais permet aussi d'interpréter avec précaution certains tests spécifiques.

3. Quelles sont les causes de variabilité des résultats en IFI ?

Les différences intra-laboratoire et inter-laboratoires en termes de résultats négatifs ou positifs et en termes de reconnaissance des aspects de fluorescence dépendent :

- des variabilités dues à la technique elle-même : les sources cellulaires utilisées, les modes de culture et de fixation des substrats, les anti-immunoglobulines fluorescentes utilisées (polyvalentes anti-IgA, -IgG et -IgM, ou anti-IgG [chaînes lourdes et légères], ou anti-chaînes lourdes gamma) ;
- des systèmes de lecture (sensibilité du microscope et de la lampe utilisée à vapeur de mercure HBO ou LED) ;
- de la variabilité dans les seuils de positivité mais aussi dans la description des aspects : si classiquement pour les anticorps antinucléaires en routine on décrit les aspects de base, homogène, moucheté, centromérique, nucléaire et moucheté à grains nucléaires multiples, mais aussi membranaire (anti-enveloppe nucléaire), en réalité plusieurs aspects peuvent se superposer et de nombreux aspects rares sont décrits. Il est important aussi de savoir interpréter les fluorescences cytoplasmiques [7, 8]. Les résultats de la lecture visuelle des aspects de fluorescence

a Service d'immunologie biologique

Centre hospitalier universitaire Henri-Mondor
51, av. du Mal de Lattre-de-Tassigny
94010 Créteil cedex

b Laboratory medicine, immunology

University Hospitals Leuven
Herestraat 49
B-3000 Leuven
Belgium

* Correspondance

chantal.andre@hmn.aphp.fr

dépendent aussi de l'interprétation par un lecteur plus ou moins expérimenté.

4. Les systèmes automatisés de lecture: ce qui est indispensable

Le système doit être adapté aux laboratoires effectuant des tests de routine pour la recherche d'autoanticorps par IFI, et non prévu pour un thème précis dans le cadre d'un laboratoire de recherche.

Différentes étapes sont nécessaires [6, 10]: l'acquisition automatisée de l'image, un contrôle de la qualité de l'image, la segmentation de l'image pour la détection de l'objet, l'extraction des caractéristiques pour décrire l'objet, la classification des objets détectés.

L'acquisition d'une image de qualité dépend de la mise au point automatisée, de l'ajustement de l'intensité de l'image, du contrôle de qualité de la finesse et de la luminosité, de la détection des artéfacts, de l'évaluation en temps réel de l'aspect de fluorescence et de la calibration de la fluorescence. L'intérêt est d'obtenir des résultats comparables entre les laboratoires, ce qui nécessite une standardisation de l'IFI avec une mesure de l'intensité en unités de fluorescence et un système calibré permettant notamment des études comparables de cohortes dans différents laboratoires.

Le système doit permettre, grâce à des logiciels adaptés, la mémorisation des images intégrées et leur archivage pour d'éventuelles comparaisons.

5. Les systèmes automatiques de lecture de lames

5.1. Les systèmes proposés

Le premier système automatisé pour la lecture de l'IFI qui a été expérimenté pour la recherche des antinucléaires est le système Aklides System (Medipan, Germany).

Différents systèmes sont en développement et, à notre connaissance, ceux actuellement proposés pour les analyses de routine avec interprétation des images sont:

- AKLIDES System (Medipan, Berlin, Germany); sur HEP-2: discrimination négatif/positif, 5 aspects;
- NOVA View (Werfen, INOVA Diagnostics Inc, Barcelona, Spain); sur HEP-2: discrimination négatif/positif, 6 aspects;
- ZENIT G Sight A (Menarini Diagnostics, Florence, Italy); sur HEP-2 ou HEP-2000: discrimination négatif/positif, 5 aspects;
- EUROPATTERN (EUROIMMUN, Lübeck, Germany); sur HEP-2: discrimination négatif/positif, 5 aspects;
- HELIOS (AESKU Diagnostics, Wendelsheim, Allemagne); sur HEP-2: discrimination négatif/positif;
- IMAGE NAVIGATOR (Immuno-Concepts, Sacramento, United States); sur HEP-2: discrimination négatif/positif.

Les systèmes comportent en général:

- un microscope à fluorescence inversé automatisé équipé d'une source de lumière LED (la chambre noire n'est plus indispensable);
- une platine porte-échantillon motorisée;
- un appareil photographique numérique CCD à haute définition;

- un ordinateur et des logiciels qui doivent contrôler les étapes de motorisation et le microscope, prendre les images numérisées, rendre les résultats et archiver les images et les données.

5.2. Les différences entre les systèmes proposés

Les différences portent essentiellement sur:

- le nombre de lames pouvant être lues dans un même passage;
- le temps de lecture d'un puits qui dépend du nombre de régions lues sur ce puits et du nombre d'images qui sont prises et mémorisées, variables selon les systèmes;
- le type de lames lues (systèmes complètement fermés permettant la lecture d'un seul type de cellules HEP-2 ou permettant aussi la lecture des lames HEP-2000);
- la présence ou non d'un marqueur de l'ADN double brin (DAPI) destiné à repérer la présence des cellules en localisant les noyaux et à optimiser la mise au point;
- le seuil de détection de la fluorescence;
- les aspects, nucléaires et cytoplasmiques, reconnus automatiquement par le système;
- les systèmes de validation par le biologiste: les images auxquelles il peut se rapporter et les commentaires qu'il peut apporter aux résultats.

5.3. Les évaluations des systèmes et les développements en cours

Les différents systèmes proposés portent tous sur la lecture automatisée de la recherche d'anticorps antinucléaires, pour certains sont ajoutées la lecture de la recherche d'anticorps anti-ADN natif sur *Crithidia luciliae*, la recherche d'anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles et la prise d'images pour la détection des anticorps sur triple substrat de rongeur.

Jusqu'à présent peu de travaux ont été publiés mais la majorité des études présentées ont utilisé le système AKLIDES. La plupart des études comparent la performance diagnostique du système automatique à la fois à l'interprétation traditionnelle visuelle et au résultat du test de confirmation par le biologiste sur le système: elles montrent une très bonne corrélation entre la lecture visuelle et l'acquisition d'image et une très bonne corrélation dans la distinction des positifs et des négatifs [6, 11-13].

Des premières évaluations du système NOVA View ont été présentées [14] montrant une bonne corrélation entre le système automatisé et la méthode conventionnelle mais qui s'améliore après réinterprétation par la lecture des images numérisées [15]. Actuellement seuls les aspects nucléaires et non cytoplasmiques ont été évalués.

La technologie du système Aklides semble aussi être une plateforme automatique utile pour la recherche des anticorps anti-ADN natif par IFI sur *Crithidia luciliae* [13, 16]. Des travaux préliminaires ont étudié l'intérêt du système Aklides pour la recherche d'ANCA montrant une bonne corrélation dans le dépistage des positifs et négatifs mais aussi la nécessité d'améliorer et compléter les études [13, 17, 18].

En plus de la prise d'images, l'interprétation de la recherche d'anticorps anti-tissus sur triple substrat de rongeur est en cours de mise au point pour certains systèmes.

Nous rapporterons pendant le colloque nos expériences respectives des évaluations des systèmes ZENIT Gsight (A Menarini Diagnostics) et NOVA View (Inova Diagnostics, Inc) pour la recherche des anticorps antinucléaires sur HEp-2.

6. Discussion

En ce qui concerne la variabilité des résultats de fluorescence : à part les systèmes mis au point sur deux types de préparation de cellules HEp-2 (permettant aussi la lecture des HEp-2000), ils sont toujours associés à un type de fabrication de lames et correspondent à des systèmes fermés. Ils permettront donc une amélioration de la reproductibilité entre les laboratoires utilisant un même système. Mais, comme il semble que de nombreux systèmes différents fermés sont en cours de développement et sont basés sur l'utilisation chacun de leurs propres réactifs, cela amènera à un certain degré de variabilité inter-laboratoires. Ils devront donc être comparés entre eux.

Actuellement, les résultats publiés montrent une très bonne discrimination entre les résultats positifs et les résultats négatifs et des images acquises de très bonne qualité, notamment pour la recherche des anticorps antinucléaires. Ils permettent ainsi pour les grandes séries de faire un tri sur les résultats négatifs. Ils ont des performances actuellement limitées au regard des aspects reconnus, de l'exactitude et des différents tests proposés. Ils ne peuvent pas remplacer

l'interprétation par un biologiste qui aura dû avoir une bonne formation à l'interprétation des images en IFI. En effet, ces systèmes n'éliminent pas la relecture par un technicien ou un biologiste et la confirmation ou la modification du résultat automatique pour chaque échantillon est indispensable. La validation comportant toujours une lecture des images, la qualité des images obtenues est donc primordiale.

Ces systèmes doivent aussi être évalués quant à leurs caractéristiques de performance clinique. Leur intérêt est aussi de pouvoir s'intégrer dans un laboratoire d'auto-immunité automatisé et de garder des images adossées au dossier patient.

7. Conclusion

Depuis peu, différents systèmes d'automatisation de l'interprétation de l'immunofluorescence indirecte sont proposés incluant la reconnaissance des aspects avec souvent d'excellents enregistrements d'images. Ils permettront d'augmenter la reproductibilité des tests et de diminuer la variabilité intra- et inter-laboratoires, mais ils sont limités dans l'interprétation automatique des aspects et des développements complémentaires sont nécessaires.

Déclaration d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH, et al. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum* 2002;47(4):434-44.
- [2] Bizzaro N, Wiik A. Appropriateness in anti-nuclear antibody testing: from clinical request to strategic laboratory practice. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22(3):349-55.
- [3] Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:320-9.
- [4] Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010;69(8):1420-2.
- [5] Hiemann R, Hilger N, Michel J, et al. Automatic analysis of immunofluorescence patterns of HEp-2 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109(1):358-71.
- [6] Hiemann R, Büttner T, Krieger T, et al. Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun Rev* 2009;9(1):17-22.
- [7] Humbel RL. Detection of antinuclear antibodies by immunofluorescence. In: Van Venrooij WJ, Maini RN, editors, *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht: Kluwer Academic; 1993. p.A2, 1-16.
- [8] Wiik AS, Høier-Madsen M, Forslid J, et al. Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun* 2010;35(3):276-90.
- [9] Wiik A, Charles P, Meyrowitsh. Multicentre-centre collaboration is needed to reach a unified and strictly defined classification of IIF ANA patterns. In: Conrad K, Chan EKL, Humbel RL, Meroni PI, Shoenfeld, editors. From prediction to prevention of autoimmune diseases, report on the 10th Dresden Symposium on autoantibodies held in Dresden on September 22-25, 2011. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2011. p.634-646.
- [10] Hiemann R, Hilger N, Sack U, et al. Objective quality evaluation of fluorescence images to optimize automatic image acquisition. *Cytometry Part A* 2006;69A(3):182-4.
- [11] Egerer K, Roggenbuck D, Hiemann R, et al. Automated evaluation of autoantibodies on human epithelial-2 cells as an approach to standardize cell-based immunofluorescence tests. *Arthritis Res Ther* 2010;12(2):R40.
- [12] Kivity S, Gilburd B, Agmon-Levin N, et al. A novel automated indirect immunofluorescence autoantibody evaluation. *Clin Rheumatol* 2012;31(3):503-9.
- [13] Melegari A, Bonaguri C, Russo A, et al. A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimmun Rev* 2012;Jan 16 [Epub ahead of print].
- [14] Buchner C. Digital image analysis results show high reproductibility and agreement with human interpretation on HEp-2 cells. In: Conrad K, Chan EKL, Humbel RL, Meroni PI, Shoenfeld, editors. From prediction to prevention of autoimmune diseases, report on the 10th Dresden Symposium on autoantibodies held in Dresden on September 22-25, 2011. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2011. p.662-663.
- [15] Krieger T. Comparison of an ANA automated reading system with conventional fluorescence microscopy. In: Conrad K, Chan EKL, Humbel RL, Meroni PI, Shoenfeld, editors. From prediction to prevention of autoimmune diseases, report on the 10th Dresden Symposium on autoantibodies held in Dresden on September 22-25, 2011. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2011. p.664-665.
- [16] Roggenbuck D, Reinhold D, Hiemann R, et al. Standardized detection of anti-dsDNA antibodies by indirect immunofluorescence- A new age for confirmatory tests in SLE diagnostics. In: Conrad K, Chan EKL, Humbel RL, Meroni PI, Shoenfeld, editors. From prediction to prevention of autoimmune diseases, report on the 10th Dresden Symposium on autoantibodies held in Dresden on September 22-25, 2011. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2011. p.678-679.
- [17] Damoiseaux J, Mallet K, Vaessen M., et al. Tervaert, Automatic reading of ANCA-slides: evaluation of the AKLIDES® system. In: Conrad K, Chan EKL, Humbel RL, Meroni PI, Shoenfeld, editors. From prediction to prevention of autoimmune diseases, report on the 10th Dresden Symposium on autoantibodies held in Dresden on September 22-25, 2011. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2011. p.683-684.
- [18] Knütter I, Hiemann R, Brumma T, et al. Performance of the automated immunofluorescence system AKLIDES® for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies. In: Conrad K, Chan EKL, Humbel RL, Meroni PI, Shoenfeld, editors. From prediction to prevention of autoimmune diseases, report on the 10th Dresden Symposium on autoantibodies held in Dresden on September 22-25, 2011. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2011. p.685-686.

Les anticorps anti-ADN

Pascale Chrétien^{a,*}

1. Introduction

Parmi la multitude d'autoanticorps retrouvés au cours du lupus érythémateux systémique ou LES, les anticorps (Ac) anti-acide désoxyribonucléique bicaténaire ou ADN double brin (ADNdb) sont considérés comme le marqueur sérique le plus important de cette pathologie. Moins spécifiques que les Ac anti-Sm ou les Ac anti-PCNA ou bien encore les Ac anti-ribosomes P, ils sont cependant beaucoup plus fréquents et leurs sensibilité et spécificité pour le LES leur confèrent une bonne valeur diagnostique pour la pathologie lupique (ils font partie des critères de l'American rheumatism association pour le diagnostic) [1].

De même, ils permettent le suivi de la pathologie puisqu'ils sont associés à l'atteinte rénale du LES [2]. En effet leur pouvoir néphritogène a été mis en évidence dans de nombreux modèles expérimentaux.

2. Les différentes formes d'ADN et d'anticorps anti-ADN

Dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN bicaténaire ou double brin est enroulé autour des histones H2A, H2B, H3 et H4, l'ensemble étant « fermé » par l'histone H1. Cette structure réalise ce qui est appelé l'ADN natif, à ne pas confondre avec l'ADN double brin. C'est le nucléosome.

Ainsi les Ac anti-nucléosome, les Ac anti-ADNdb et les Ac anti-histones peuvent être recherchés. Il faut cependant noter que les Ac anti-histones sont retrouvés au cours de très nombreuses pathologies et donc leur intérêt diagnostique est faible. En revanche, les Ac anti-nucléosome sont également un marqueur du LES [3]. Ils sont généralement présents avec les Ac anti-ADNdb mais également de façon isolée. Ce marqueur est cependant moins utilisé en pratique courante que les Ac anti-ADNdb.

3. Méthodes de détection des Ac anti-ADNdb

Classiquement, il existe trois groupes de méthodes pour rechercher les Ac anti-ADNdb [4, 5] : les techniques d'immunofluorescence indirecte, les méthodes radio-immunologiques (RIA) et enfin les méthodes immunoenzymatiques (ELISA). Mais selon que l'on recherche les Ac anti-ADN natif (Ac anti-nucléosome) ou bien les Ac anti-ADNdb soit par ELISA soit par RIA, les marqueurs recherchés sont différents. De même, la recherche des Ac anti-ADN par immunofluorescence indirecte sur étalement de *Crithidia lucilliae* met en évidence d'autres Ac anti-ADN.

Crithidia lucilliae est un trypanosome parasite de la mouche, non pathogène pour l'homme. Ce flagellé a un volumineux kinétoplaste riche en ADN à la fois circulaire et double brin réalisant ce que l'on nomme l'ADN k pour kinétoplaste (alors que l'ADN humain est double brin mais pas circulaire). Ainsi la présence dans un sérum d'Ac anti-ADNdb est visualisée par une fluorescence siégeant au niveau du kinétoplaste [4].

Les techniques aussi bien ELISA que RIA permettent de mettre en évidence des Ac anti-ADNdb.

Le test de Farr (RIA) consiste en une incubation du sérum à tester avec de l'ADN radiomarqué. Les complexes Ag-Ac sont ensuite précipités par du sulfate d'ammonium à demi-saturation permettant de laisser en suspension les antigènes n'ayant pas fixé d'Ac.

Cependant les résultats obtenus par toutes ces méthodes divergent parfois. L'antigène utilisé constitue souvent le point critique : la présence de protéines associées comme la présence d'histones notamment lors de préparation de *Crithidia lucilliae*, la présence d'ADN monocaténaire sont autant de risques de fausses positivités. De même, faut-il utiliser une technique permettant de mettre en évidence uniquement les Ac anti-ADNdb de forte avidité comme par exemple le test de Farr ? Les techniques ELISA détectent quant à elles les Ac de forte et de faible avidité.

4. Valeur diagnostique des Ac anti-ADNdb

Seuls les anticorps d'isotype IgG sont associés au LES. Cependant les sensibilités et spécificités des Ac anti-ADNdb au cours de la pathologie lupique varient considérablement selon la technique de détermination. Ainsi dans la littérature, la sensibilité de ce test varie entre 35 et 90 % selon la méthode utilisée mais aussi selon la population étudiée [6, 7].

À la question : « Les Ac anti-ADNdb peuvent-ils être retrouvés au cours d'autres pathologies que le LES ? », la réponse

a Laboratoire d'immunologie
Centre hospitalier intercommunal de Créteil
40, av. de Verdun
94010 Créteil cedex

* Correspondance
pascale.chretien@chicreteil.fr

est clairement oui. Ils ont été retrouvés au cours d'autres connectivites comme le syndrome de Sharp ou le syndrome de Gougerot-Sjögren, mais aussi au cours d'hépatites auto-immunes de type I (anciennement appelées hépatites lupoïdes) ou du syndrome primaire des anti-phospholipides [8]. Dans ces conditions s'agit-il de syndromes lupiques débutants pour lequel tous les critères de l'ARA ne sont pas encore réunis ? S'agit-il de fausse réactivité liée à un problème méthodologique ? Doit-on privilégier un dépistage à l'aide d'une technique très sensible suivie d'une confirmation par une autre très spécifique ?

Il n'existe aucun anticorps dont la spécificité soit absolue et il faut admettre pouvoir retrouver un autoanticorps dans d'autres pathologies auto-immunes que celle de prédilection.

Enfin un taux élevé d'Ac anti-ADNdb doit être interprété à la lumière du contexte clinique mais aussi avec la recherche des Ac antinucléaires totaux et éventuellement des Ac dirigés contre les antigènes nucléaires solubles si besoin.

5. Intérêt dans le suivi des patients lupiques

Le LES est une connectivite évoluant par poussées. Une augmentation du titre des Ac anti-ADNdb doit faire craindre une rechute ou poussée de la maladie. De plus

les Ac anti-ADNdb sont associés à la néphropathie lupique. De même la décroissance de ce titre donne une indication au clinicien sur le succès thérapeutique [4, 5, 9]. Les anticorps ont donc un intérêt majeur dans le suivi de la pathologie. Mais là encore le choix de la méthode intervient dans la valeur clinique du test. Ainsi pour certains auteurs, seul le test de Farr permet de détecter une augmentation du titre des Ac anti-ADNdb avec une valeur pronostique de rechute avec une sensibilité supérieure à 80 %.

6. Conclusion

La présence d'Ac anti-ADNdb (surtout à titre élevé) constitue un solide argument diagnostique en faveur de la maladie lupique même s'ils peuvent être retrouvés au cours d'autres connectivites.

De plus chez les patients lupiques, la surveillance de la pathologie comprend le dosage de ces anticorps afin de prévoir une éventuelle rechute.

Cependant, les résultats obtenus sont fonction de la méthodologie employée. La source antigénique constitue comme pour toute détermination en auto-immunité le point crucial à optimiser.

Déclaration d'intérêts : l'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
- [2] Isenberg DA, Davirajan CT, Rahman A, et al. The role of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1997;6:290-304.
- [3] Amoura Z, Piette J-C, Chabre H, et al. Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus. Correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity. *Arthritis Rheum* 1997;40(12):2217-25.
- [4] Chrétien P, Dauvin M, Hélin P, et al. Comparaison de l'immunofluorescence indirecte sur *Crithidia luciliae*, du test de Farr, et des méthodes immunoenzymatiques pour le dépistage des autoanticorps anti-ADN natif. *Ann Biol Clin* 1994; 52:645-50.

[5] Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol* 2000;53:424-32.

[6] Abuaf N, Lelong F, Johanel C, et al. La valeur diagnostique des anticorps anti-ADN dépend de la technique utilisée pour leur dépistage. *Rev Med Interne* 1987;8(2):157-62.

[7] Smeenk R, Brinkman K, Van der Brink H, et al. À comparaison of assays used for the detection of antibodies to DNA. *Clin Rheumatol* 1990;9(1 Suppl 1):63-73.

[8] Gurian LE, Rogoff TM, Ware AJ, et al. The immunologic diagnosis of chronic active "autoimmune" hepatitis: distinction from systemic lupus erythematosus. *Hepatology* 1985;5(3):397-402.

[9] Esdaile JM, Abrahamowicz M, Joseph L, et al. Laboratory tests as predictors of disease exacerbations in systemic lupus erythematosus. Why some tests fail. *Arthritis Rheum* 1996;39(3):370-8.

Anticorps dans les myopathies auto-immunes

Nicole Fabien^{a,*}

1. Introduction

La classification des myopathies auto-immunes, affections chroniques du muscle squelettique, a évolué ces dernières années avec l'inclusion de nouveaux critères cliniques et biologiques (*tableau I*) [1-3].

Cette nouvelle classification accorde une place très large aux autoanticorps (aAc). Les aAc d'intérêt peuvent être distingués en deux groupes : les aAc spécifiques des myopathies auto-immunes dont les aAc anti-aminoacyl-ARNt-synthétases, anti-signal recognition particle (SRP) et anti-Mi-2 et les aAc associés, car présents également dans d'autres maladies auto-immunes, dont les aAc anti-PM/Scl, anti-Ku, anti-U1, 2,3,4/6, 5 RNP, anti-SS-A 60, anti-TRIM21, anti-centromères et anti-Scl-70.

Cet article présente uniquement les aAc spécifiques et plus particulièrement les anticorps récemment découverts qui ont un intérêt en tant que marqueurs diagnostiques et pronostiques (*tableau II*).

2. Autoanticorps anti-aminoacyl-ARNt-synthétases

Les aAc anti-aminoacyl-ARNt-synthétases et leur apport diagnostique ont été décrits de manière détaillée dans une précédente revue [4]. Un résumé de ces données est présenté dans le *tableau III*.

3. Autoanticorps anti-signal recognition particle (SRP)

Les aAc anti-SRP sont détectés dans environ 5 à 7 % des myosites. Les patients présentant ces aAc ont généralement une atteinte musculaire sévère caractérisée

par une faiblesse musculaire à prédominance proximale atteignant les membres supérieurs et inférieurs et des atteintes cardiaques de type myocardite. Les atteintes cutanées et pulmonaires sont rares. Les résistances à la corticothérapie sont fréquemment observées. Différentes études clinicobiologiques ont confirmé la valeur des aAc anti-SRP en tant que marqueurs pronostiques de sévérité [5-7].

Ces aAc ont été rarement décrits dans les dermatomyosites juvéniles et quelques cas ont été signalés chez des patients atteints de myosites à inclusions.

Histologiquement, la myopathie avec aAc anti-SRP est caractérisée par une myopathie nécrosante active avec peu ou pas d'inflammation à la différence des dermatomyosites et polymyosites.

La nature des antigènes cibles a été décrite dans une précédente revue [4].

Les aAc anti-SRP sont détectés en immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules HEp-2 avec une fluorescence cytoplasmique diffuse intense finement granuleuse (*figure 1*) ; sur les coupes de foie et d'estomac de rat ou de souris le marquage est par contre indissociable de celui observé avec les aAc anti-ribosomes. Au niveau du foie, le cytoplasme des hépatocytes est recouvert de grosses inclusions irrégulières. Sur les coupes d'estomac c'est le cytoplasme des cellules principales, mais pas celui des cellules pariétales, qui est marqué de façon homogène. Sur coupe de pancréas, un marquage homogène à l'exception des îlots est observé. Les aAc anti-SRP sont ensuite identifiés par une technique de dot, le plus souvent, ou une technique de type ELISA. Une technique de type ALBIA (adressable laser bead immunoassay) a été récemment mise au point pour détecter et quantifier les aAc anti-SRP54 ; leur taux peut être utilisé comme un marqueur d'activité de la maladie [8].

^a Service d'immunologie

UF autoimmunité

Centre hospitalier Lyon-Sud – Hospices Civils de Lyon

INSERM U851 – UCLB

69495 Pierre-Bénite cedex

* Correspondance

nicole.fabien@chu-lyon.fr

Tableau I – Nouvelle classification des myopathies inflammatoires.

* Dermatomyosites
* Polymyosites
* Syndrome des anti-synthétases (<i>ce syndrome reste discuté</i>)
* Myosites associées aux cancers
* Myosites de chevauchement définies par la présence d'autoanticorps
* Myopathie nécrosante médiée par le système immunitaire
* Autres myopathies inflammatoires ou génétiques (myosites à inclusions, dystrophie musculaire des ceintures et myopathies génétiques)

D'après [1-3].

Tableau II – Autoanticorps rares décrits au cours des myopathies auto-immunes.

aAc anti-	Cible antigénique	Aspect en IFI cellules HEP-2	Méthodes d'identification	Prévalence et associations cliniques
CADM-140 MDA5	Clinically amyopathic dermatomyositis Melanoma differentiation-associated gene 5	Cytoplasmique finement granuleux*	RIP Immunotransfert	50-73 % DAM + PID 19-35 % DM + PID Pronostic sévère 38 % DMJ + PID
p155/140	Transcriptional intermediary factor 1 gamma (TIF1- γ ; α)	Noyau finement moucheté*	RIP Immunotransfert ELISA	13-21 % DM Cancers associés Pronostic sévère 17-29 % DMJ Manifestations cutanées sévères
p140	Nuclear matrix protein 2 (NXP2)	Non décrit	RIP Immunotransfert	< 5 % DM 18-25 % DMJ calcinose
SAE	Small ubiquitin-like modifier activating enzyme	Noyau moucheté gros grains*	RIP	< 5 % DM < 1 % DMJ
HMGCR	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase	-	RIP	< 10 % myopathies auto-immunes induites par statines
43 kda	Antigène du muscle squelettique	-	Immunotransfert	52 % des myosites à inclusions

DAM: dermatomyosite amyopathique; **DM**: dermatomyosite; **DMJ**: dermatomyosite juvénile; **PID**: pneumopathie interstitielle diffuse; **PM**: polymyosite; **RIP**: radio-immunoprécipitation; * décrits dans la littérature.

Tableau III – Autoanticorps anti-aminoacyl-ARNt-synthétases.

Aminoacyl-ARNt-synthétase	Aspect en IFI sur cellules HEP-2	Méthodes d'identification	Prévalence et associations cliniques
Histidyl: Jo-1	Fines granulations cytoplasmiques	ELISA Fluorimétrie en flux Immunodiffusion Dot	19-33 % PM + PID + arthralgies 5-10 % DM marqueur de sévérité 5 % myosites à inclusions [9, 44, 45]
Thréonyl: PL-7 Alanine: PL-12	Fluorescence cytoplasmique diffuse +/- homogène +/- dense	Dot Immunodiffusion RIP	3-5 % PM > DM > syndrome de chevauchements sclérodémie/myosite PID sans myosite [46] 3-5 % DM PID sans myosite
Isoleucyl: OJ Glycyl: EJ		Dot RIP	< 1-2 % DM + PID [47]
Asparaginyll: KS	?	RIP	< 1 % DM + PID PID sans myosite [48]
Tyrosyl: Ha	?	?	< 1 % myosite + PID
Glutaminyll: JS	?	?	< 1 %, phénomène de Raynaud
Lysyl: SC	?	RIP	< 1 %
Phénylalaninyll: Zo	?	RIP	< 1 % myosite + PID [49]
Tryptophanyl	?	?	< 1 %

DM: dermatomyosite; **IFI**: immunofluorescence indirecte; **PID**: pneumopathie interstitielle diffuse; **PM**: polymyosite; **RIP**: radio-immunoprécipitation.

4. Autoanticorps anti-Mi-2

Les aAc anti-Mi-2 ont été décrits dans les dermatomyosites avec une prévalence de 10 à 33 % et parfois dans les polymyosites et myosites à inclusions avec une moindre prévalence de 9 et 8 % respectivement [9-11]. Si les aAc anti-Mi-2 sont très spécifiques des dermatomyosites (96 % à 100 %), les aAc anti-Mi-1 ne le sont pas et ne doivent plus

être prescrits. Les aAc anti-Mi-2 n'ont pas été décrits en association avec des cancers et sont considérés comme des marqueurs de bon pronostic, bien meilleur que celui observé chez les patients présentant des aAc anti-aminoacyl-ARNt-synthétases [10, 11].

La nature des antigènes cibles a été décrite dans une précédente revue [4]. Ces aAc sont détectés en IFI sur cellules HEP-2 avec une fluorescence nucléaire d'aspect très finement moucheté, dense, et un liseré dans les cellules en

Figure 1 – Fluorescence de type anti-SRP.

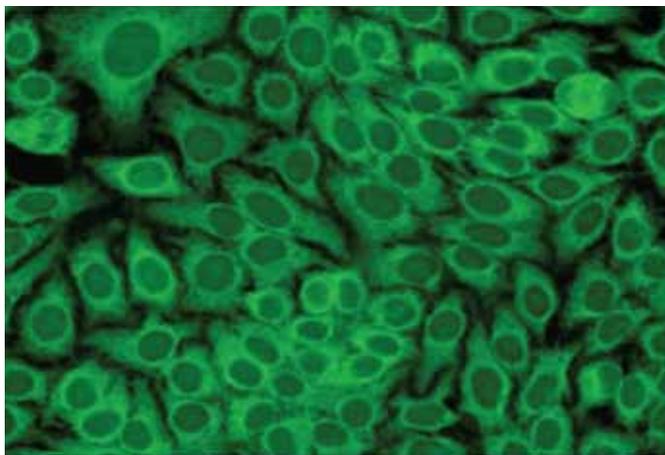


Figure 2 – Fluorescence de type anti-Mi-2.

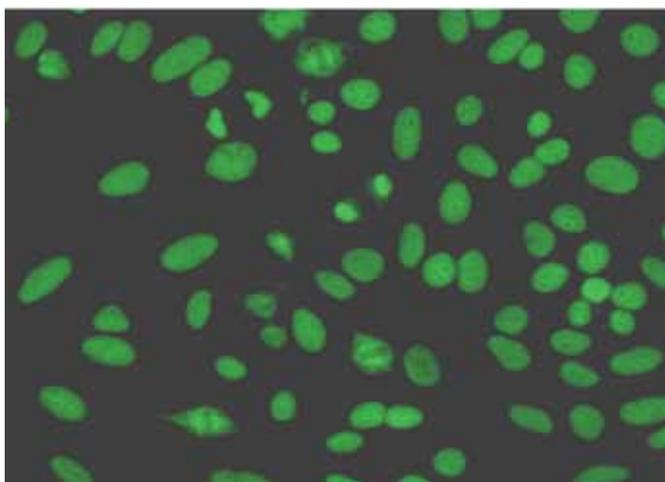
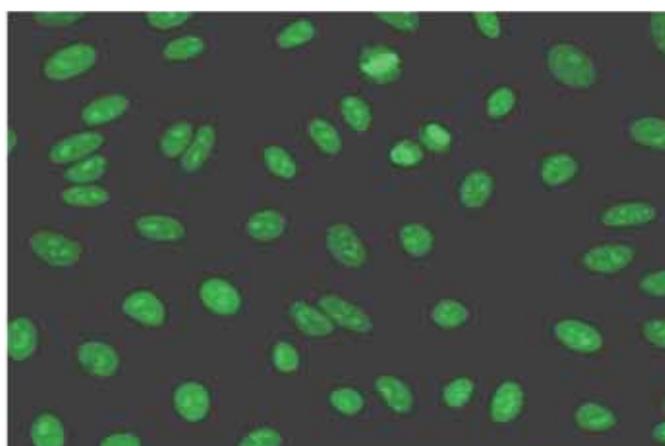


Figure 3 – Fluorescence de type anti-PM-Scl.



mitose (*figure 2*) ; ils sont identifiés classiquement par une technique de dot.

5. Autoanticorps anti-PM-Scl

Ces aAc font partie de la famille des aAc associés aux myosites car ils sont le plus souvent détectés au cours des syndromes de chevauchement polymyosite/sclérodémie (25 %). Néanmoins, ils identifient un sous-groupe de patients pouvant présenter une polymyosite ou une dermatomyosite isolée (4-8 %) [12-14]. Si certaines données ne confèrent pas à ces aAc un pronostic sévère [12, 15, 16], d'autres études ont démontré l'inverse avec l'association de manifestations pulmonaires sévères voire de carcinome [14, 17].

La nature des antigènes cibles a été décrite dans une précédente revue [4]. Ces aAc sont détectés en IFI sur cellules HEp-2 avec une fluorescence homogène du nucléole et le reste du noyau moucheté (*figure 3*) ; ils sont identifiés le plus souvent par une technique de type ELISA ou une technique de dot utilisant des antigènes recombinants PM-Scl de 100 et de 75 kDa ou un peptide nommé PM1 [18, 19].

6. Autoanticorps anti-CADM-140

Ces aAc ont été nommés ainsi car ils reconnaissent des antigènes de poids moléculaire de 140 kDa et ils ont été découverts chez des patients atteints de dermatomyosites amyopathiques ou « clinically amyopathic dermatomyositis » (C-ADM). Plus tard, l'antigène cible des aAc a été identifié comme une protéine cytoplasmique ubiquitaire codée par le gène associé à la différenciation du mélanome ou « melanoma differentiation-associated gene - 5 » (MDA5). Cette protéine fait partie de la famille des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires spécifiques des pathogènes intracellulaires. Ces protéines sont impliquées dans la réponse immunitaire innée avec induction de la réponse IFN type I et des cytokines pro-inflammatoires en réponse à une infection virale via la reconnaissance des ARN et ADN viraux.

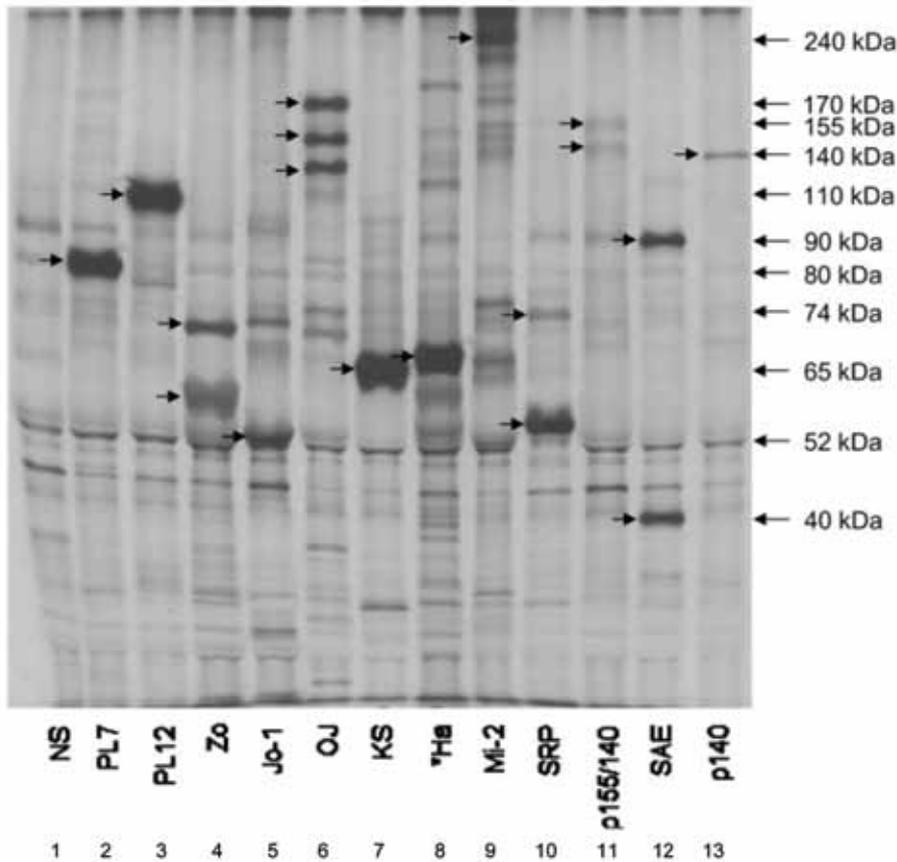
Les aAc anti-CADM-140 ont été décrits, notamment au Japon et récemment aux États-Unis, chez 13 à 35 % des patients atteints de dermatomyosites et chez 53-73 % des patients présentant une dermatomyosite amyopathique caractérisée par des lésions cutanées typiques des dermatomyosites et peu de signes de myopathie inflammatoire voire une absence d'atteinte musculaire [20-22]. Les patients présentant des aAc anti-CADM-140 ont un risque accru de développer une pneumopathie interstitielle diffuse rapidement progressive par rapport aux patients sans aAc (95 vs 32 % ; $P < 0,001$ et 50 vs 6 % ; $P = 0,008$) ; ainsi les aAc anti-CADM-140 sont considérés comme des marqueurs de pronostic sévère [23, 24].

En dehors d'un cas, aucune association avec des cancers n'a été rapportée à ce jour [21, 22, 24].

Ces aAc ont aussi été détectés chez des enfants atteints de dermatomyosite juvénile associée à une pneumopathie interstitielle diffuse [25].

Les aAc anti-CADM-140 et anti-synthétases sont décrits comme mutuellement exclusifs. Identifiés par immunotransfert ou radio-immunoprécipitation, le test de détection des aAc anti-CADM-140 est disponible aux États-Unis

Figure 4 – Détection des aAc spécifiques des myosites par technique d'immunoprécipitation.



Extrait de cellules K562.

Bande 1 : sérum normal
Bande 2 : anti-PL7
Bande 3 : anti-PL12
Bande 4 : anti-Zo
Bande 5 : anti-Jo-1

Bande 6 : anti-OJ
Bande 7 : anti-KS
Bande 8 : anti-Ha (unconfirmed)
Bande 9 : anti-Mi-2
Bande 10 : anti-SRP

Bande 11 : anti-p155/140 (TIF1- γ)
Bande 12 : anti-SAE
Bande 13 : anti-p140 (NXP2).

D'après Betteridge *et al.* 2011 [34].

(<http://www.rdiinc.com/test-catalog/new-tests/>). La mise au point d'un test est également en cours dans trois laboratoires hospitaliers en France.

En IFI sur cellules HEp-2, le marquage est cytoplasmique et finement granuleux [20].

7. Autoanticorps anti-TIF1 (anti-p155/140)

Les antigènes cibles de ces aAc sont des protéines membres de la famille des facteurs de transcription intermédiaire 1 ou transcriptional intermediary factor 1 (TIF1). Plusieurs sous-types existent dont les TIF1- α ou TRIM 24 de 140 kDa, TIF1- β ou TRIM 28 de 100 kDa et TIF1- γ ou TRIM 33 de 155 kDa (*figure 4*). Ces protéines nucléaires sont impliquées notamment dans la régulation de la transcription et de la prolifération cellulaire, dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, dans l'apoptose et la carcinogénèse.

Les aAc anti-p155/140 ont été détectés chez 15 à 21 % des patients atteints de dermatomyosites, avec une pré-

valence plus faible pour les aAc anti-p140. Leur spécificité est élevée pour ces maladies [26-28]. Dans le groupe des patients avec aAc anti-p155/140, 68 % des patients souffrent de dermatomyosite classique et 32 % des patients souffrent de dermatomyosite amyopathique [22, 29, 30]. Les lésions cutanées sont plus sévères et à l'inverse, la fréquence des pneumopathies interstitielles diffuses est plus faible chez les patients présentant ces aAc. Une étude a rapporté une association avec l'allèle HLA-DQA1*0301 [26].

La présence des aAc anti-p155/p140 doit faire évoquer l'existence d'un cancer associé à ces myopathies, que ce soit des carcinomes pulmonaires, digestifs, ovariens ou mammaires; en effet des cancers ont été découverts chez 58 à 71 % des patients présentant ces aAc *versus* 9 à 11 % des patients sans aAc ($P < 0,001$) [22, 28]. L'association avec un cancer est plus fréquemment observée si les aAc anti-TIF1- α (140 kDa) et TIF1- γ (155 kDa) sont présents simultanément par rapport à la présence d'aAc anti-TIF1- γ isolés (73 % vs 50 %; $P < 0,05$) [29]. Cette prévalence augmente avec l'âge *i.e.* 72 % des patients âgés de plus de 40 ans et 86 % des patients âgés de plus de 60 ans [29].

Une méta-analyse récemment publiée confirme le caractère prédictif de ces aAc pour les cancers dans les dermatomyosites avec une spécificité de 89 %, une sensibilité de 70 % et une valeur prédictive négative de 93 % [31]. Sachant que les myopathies auto-immunes et notamment les dermatomyosites ont une forte association avec des cancers de tout type, l'intérêt de tels marqueurs est renforcé [32]. Des peptides communs entre les cellules musculaires en régénération et les cellules tumorales exprimant fortement les autoantigènes dont les TIF1 (ce qui a été notamment démontré pour TIF1- γ dans les cancers colorectaux à un stade précoce), seraient à l'origine de la production d'aAc anti-TIF au cours de la réponse spécifique contre les antigènes tumoraux. Mais cette hypothèse devient moins probable chez les enfants. En effet, les aAc anti-p155/140 ont été également décrits dans les dermatomyosites juvéniles (29 % aux États-Unis, 23 % au Royaume-Uni et Irlande, 17 % au Japon). La présence des aAc n'est pas associée à des cancers chez ces enfants mais à un phénotype particulier avec des manifestations cutanées plus sévères [26, 29, 33-35].

Les aAc anti-p155/140 et anti-synthétases sont décrits, à ce jour, comme mutuellement exclusifs. Identifiés par immunotransfert ou radio-immunoprécipitation, un test immunoenzymatique de type ELISA a été mis au point [29]. Un test d'immunoprécipitation est disponible aux États-Unis (<http://www.rdlinc.com/test-catalog/new-tests/>) et au Royaume-Uni mais aucun test n'est disponible en France pour l'instant. En IFI sur cellules HEP-2, ces aAc, le plus souvent de faible titre, donnent une fluorescence nucléaire d'aspect finement moucheté sans marquage des nucléoles [27].

8. Autoanticorps anti-p140/MJ (NXP2)

La cible de ces aAc est une protéine de 140 kDa (*figure 4*) mais néanmoins différente des protéines CADM-140 et Tif1- α précédemment décrites, d'où parfois la confusion entre ces différents aAc. Cette protéine nommée NXP2, associée à la matrice nucléaire, est impliquée notamment dans la régulation de la transcription (activité de répression), le métabolisme des ARN et le maintien de la structure nucléaire. C'est également un substrat des enzymes de la famille des protéines SUMO (small ubiquitin-like modifier) impliquées dans les mécanismes de sumoylations qui correspondent à la liaison des protéines SUMO à une lysine présente dans diverses cibles. Les cibles ayant subi une sumoylation sont généralement impliquées dans la régulation de la transcription.

Les aAc anti-p140 ont été décrits chez 18 % à 25 % des patients atteints de dermatomyosite juvénile [33, 36]. Ces patients ont un phénotype clinique distinct avec une prévalence plus élevée de calcinose (54 % vs 15 % pour les patients sans aAc), des contractures et une atrophie musculaire importante. Les aAc anti-p140 ont été aussi récemment décrits dans les dermatomyosites de l'adulte mais avec une prévalence plus faible de l'ordre de 5 % [34]. Ils sont identifiés par des techniques de radio-immunoprécipitation et d'immunotransfert, et aucune technique

commerciale n'est disponible. L'aspect en IFI sur cellules HEP-2 n'est pas décrit.

9. Autoanticorps anti-SAE

Ces aAc ont comme antigènes cibles des enzymes nommés « SUMO-activating enzymes » (SAE) impliqués dans les mécanismes de sumoylations. Betteridge et coll. ont décrit des aAc de 40 et 90 kDa (*figure 4*) correspondant aux deux hétérodimères SAE1 et SAE2 chez 8,4 % des patients atteints de dermatomyosite amyopathique; ces maladies évolueraient vers une dermatomyosite avec déficit musculaire et différentes atteintes systémiques avec ou sans atteinte pulmonaire [37]. Aucune association avec des polymyosites, syndromes de chevauchement ou cancers n'a été rapportée.

Ces aAc ont été également décrits dans les dermatomyosites juvéniles avec une moindre prévalence (0,6 %). Identifiés par une technique de radio-immunoprécipitation, ils pourraient être analysés en routine par immunotransfert. En IFI sur cellules HEP-2 ils donnent un marquage nucléaire moucheté à gros grains sans marquage nucléolaire [37].

10. Autoanticorps anti-HMG-Coenzyme A réductase

Plusieurs études ont rapporté que les traitements par statines pouvaient entraîner des symptômes musculaires évoluant parfois vers une myopathie nécrosante avec signes de régénération des fibres musculaires, sans infiltration lymphocytaire. Chez certains de ces patients des aAc ont été découverts. La cible antigénique de ces aAc, de 100/200 kDa, a été récemment identifiée comme la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMGCR), enzyme clef de la synthèse du cholestérol et cible pharmacologique des statines, qui sont des inhibiteurs de ces enzymes [38-40]. La nouvelle entité définie comme une myopathie nécrosante médiée par le système immunitaire a été ainsi confortée. L'étude des aAc anti-HMGCR chez 750 patients présentant une myopathie a démontré que 45 patients présentaient ces aAc (6 %) dont 30 patients avaient été traités par des statines [40]. Une étude récente a démontré la spécificité élevée de ces aAc pour les patients présentant une myopathie auto-immune [41].

Les mécanismes physiopathologiques sont encore mal compris; les statines entraîneraient une surexpression de HMGCR dans le muscle, qui serait impliquée dans les mécanismes induisant la production d'aAc anti-HMGCR [40]. Les aAc dirigés contre la partie C-terminale de l'HMGCR découverts par une technique de radio-immunoprécipitation peuvent aussi être détectés par une technique immunoenzymatique de type ELISA [23, 40]. Cette technique est en cours de commercialisation aux États-Unis (communication du Dr AL Mammen).

11. Autres autoanticorps

Différents autres aAc ont été décrits comme les aAc anti-1 eukaryotic translation initiation factor 3 (EIF3) détectés chez

4 patients atteints de polymyosite et qui sont considérés comme des marqueurs de bon pronostic. Les aAc anti-KJ, anti-Fer, anti-Wa et anti-Mas dirigés pour la plupart contre des antigènes cytoplasmiques, ont été également détectés chez des patients atteints de myopathies auto-immunes proches du syndrome des anti-synthétases. Des aAc dirigés contre des enzymes de réparation de l'ADN (PMS1, PMS2, MLH1) ou contre des protéine kinases ADN-dépendantes (DNA PKCS) ont été décrits chez 1 à 8 % des patients atteints de myosites [42]. Enfin, des aAc anti-antigène du muscle squelettique de 43 kDa ont été récemment découverts dans 52 % des myosites à inclusions et seraient très spécifiques de ces myopathies [43].

12. Conclusion

Malgré leur faible prévalence, les différents aAc détectés au cours des myopathies avec composante immunologique ont contribué à établir une meilleure classification de ces maladies. Lorsque les techniques de détection des aAc récemment décrits seront disponibles, il restera à évaluer leur intérêt en pratique clinique courante en tant que marqueurs prédictifs ou pronostiques et/ou comme des critères pour juger de l'évolutivité de la maladie sous traitement.

Déclaration d'intérêts : l'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, et al. 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2004;14:337-45.
- [2] Troyanov Y, Targoff IN, Tremblay JL, et al. Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:231-49.
- [3] Benveniste O, Dubourg O, Herson S. Nouvelles classifications et physiopathologies des myopathies inflammatoires. *Rev Med Interne* 2007;28:603-12.
- [4] Fabien N. Les autoanticorps utiles au diagnostic des sclérodermies et myopathies inflammatoires auto-immunes. *Rev Fr Lab* 2010;424bis:11-21.
- [5] Miller T, Al-Lozi MT, Lopate G, et al. Myopathy with antibodies to the signal recognition particle: clinical and pathological features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:420-8.
- [6] Dimitri D, Andre C, Roucoules J, et al. Myopathy associated with anti-signal recognition peptide antibodies: clinical heterogeneity contrasts with stereotyped histopathology. *Muscle Nerve* 2007;35:389-95.
- [7] Arlet JB, Dimitri D, Pagnoux C, et al. Marked efficacy of a therapeutic strategy associating prednisone and plasma exchange followed by rituximab in two patients with refractory myopathy associated with antibodies to the signal recognition particle (SRP). *Neuromuscul Disord* 2006;16:334-6.
- [8] Benveniste O, Drouot L, Jouen F, et al. Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* 2011;63:1961-71.
- [9] Brouwer R, Hengstman GJD, Vree Egberts W, et al. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis* 2001;60:116-23.
- [10] Ghirardello A, Zampieri S, Iaccarino L, et al. Anti-Mi-2 antibodies. *Autoimmunity* 2005;38:79-83.
- [11] Ghirardello A, Zampieri S, Tarricone E, et al. Clinical implications of autoantibody screening in patients with autoimmune myositis. *Autoimmunity* 2006;39:217-21.
- [12] Oddis CV, Okano Y, Rudert WA, et al. Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl. Clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum* 1992;35:1211-7.
- [13] Maes L, Blockmans D, Verschueren P, et al. Anti-PM/Scl-100 and anti-RNA-polymerase III antibodies in scleroderma. *Clin Chim Acta* 2010;411:965-71.
- [14] Marie I, Lahaxe L, Tiev K, et al. Myopathies inflammatoires et anticorps anti-PM-Scl : à propos d'une série et revue de la littérature. *Rev Med Interne* 2010;31:540-4.
- [15] Gaudin C, Fortenfant F, Adoue D, et al. Autoanticorps anti-PM-Scl. Étude de prévalence et de signification. *Rev Med Interne* 2006;27:665-70.
- [16] Lega JC, Cottin V, Fabien N, et al. Interstitial lung disease associated with anti-PM/Scl or anti-aminoacyl-tRNA synthetase autoantibodies: a similar condition? *J Rheumatol* 2010;37:1000-9.
- [17] Hanke K, Brückner CS, Dähnrich C, et al. Antibodies against PM/Scl-75 and PM/Scl-100 are independent markers for different subsets of systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R22.
- [18] Mahler M, Fritzler MJ. PM1-Alpha ELISA: the assay of choice for the detection of anti-PM/Scl autoantibodies? *Autoimmun Rev* 2009;8:373-8.
- [19] Ge Q, Wu Y, Trieu EP, et al. Analysis of the specificity of anti-PM-Scl autoantibodies. *Arthritis Rheum* 1994;37:1445-52.
- [20] Sato S, Hirakata M, Kuwana M, et al. Autoantibodies to a 140-kd polypeptide, CADM-140, in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2005;52:1571-6.
- [21] Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, et al. The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:433-40.
- [22] Hoshino K, Muro Y, Sugiura K, et al. Anti-MDA5 and anti-TIF1-gamma antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:1726-33.
- [23] Sato S, Hoshino K, Satoh T, et al. RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: Association with rapidly progressive interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* 2009;60:2193-200.
- [24] Gono T, Kawaguchi Y, Satoh T, et al. Clinical manifestation and prognostic factor in anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody-associated interstitial lung disease as a complication of dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:1713-9.
- [25] Kobayashi I, Okura Y, Yamada M, et al. Anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody is a diagnostic and predictive marker for interstitial lung diseases associated with juvenile dermatomyositis. *J Pediatr* 2011;158:675-7.
- [26] Targoff IN, Mamyrova G, Trieu EP, et al. A novel autoantibody to a 155-kd protein is associated with dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2006;54:3682-9.
- [27] Kaji K, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. Identification of a novel autoantibody reactive with 155 and 140 kDa nuclear proteins in patients with dermatomyositis: an association with malignancy. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:25-8.
- [28] Trallero-Araguas E, Labrador-Horrillo M, Selva-O'Callaghan A, et al. Cancer-associated myositis and anti-p155 autoantibody in a series of 85 patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Medicine (Baltimore)* 2010;89:47-52.
- [29] Fujimoto M, Hamaguchi Y, Kaji K, et al. Myositis-specific anti-155/140 autoantibodies target transcription intermediary factor 1 family proteins. *Arthritis Rheum* 2012;64:513-22.
- [30] Chinoy H, Fertig N, Oddis CV, et al. The diagnostic utility of myositis autoantibody testing for predicting the risk of cancer-associated myositis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1345-9.
- [31] Selva-O'Callaghan A, Trallero-Araguas E, Grau-Junyent JM, et al. Malignancy and myositis: novel autoantibodies and new insights. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:627-32.

- [32] Zahr ZA, Baer AN. Malignancy in myositis. *Curr Rheumatol Rep* 2011;13:208-15.
- [33] Gunawardena H, Betteridge ZE, McHugh NJ. Myositis-specific autoantibodies: their clinical and pathogenic significance in disease expression. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:607-12.
- [34] Betteridge ZE, Gunawardena H, McHugh NJ. Novel autoantibodies and clinical phenotypes in adult and juvenile myositis. *Arthritis Res Ther* 2011;13:209.
- [35] Gunawardena H, Wedderburn LR, North J, et al. Clinical associations of autoantibodies to a p155/140 kDa doublet protein in juvenile dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:324-8.
- [36] Espada G, Maldonado Cocco JA, Fertig N, et al. Clinical and serologic characterization of an Argentine pediatric myositis cohort: identification of a novel autoantibody (anti-MJ) to a 142-kDa protein. *J Rheumatol* 2009;36:2547-51.
- [37] Betteridge Z, Gunawardena H, North J, et al. Identification of a novel autoantibody directed against small ubiquitin-like modifier activating enzyme in dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2007;56:3132-7.
- [38] Christopher-Stine L, Casciola-Rosen LA, Hong G, et al. A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* 2010;62:2757-66.
- [39] Grable-Esposito P, Katzberg HD, Greenberg SA, et al. Immune-mediated necrotizing myopathy associated with statins. *Muscle Nerve* 2010;41:185-90.
- [40] Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum* 2011;63:713-21.
- [41] Mammen AL, Pak K, Williams EK, et al. Rarity of anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies in statin users, including those with self-limited musculoskeletal side effects. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:269-72.
- [42] Sibilia J, Chatelus E, Meyer A, et al. Comment faire le diagnostic et mieux comprendre les myopathies inflammatoires ? L'utilité des auto-anticorps. *Presse Med* 2010;39:1010-25.
- [43] Salajegheh M, Lam T, Greenberg SA. Autoantibodies against a 43 kDa muscle protein in inclusion body myositis. *PLoS One* 2011;6:e20266.
- [44] Zampieri S, Ghirardello A, Iaccarino L, et al. Anti-Jo-1 antibodies. *Autoimmunity* 2005;38:73-8.
- [45] Gomard-Mennesson E, Fabien N, Cordier JF, et al. Clinical significance of anti-histidyl-tRNA synthetase (Jo1) autoantibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:414-20.
- [46] Hervier B, Uzunhan Y, Hachulla E, et al. Antisynthetase syndrome positive for anti-threonyl-tRNA synthetase (anti-PL7) antibodies. *Eur Respir J* 2011;37:714-7.
- [47] Sato S, Kuwana M, Hirakata M. Clinical characteristics of Japanese patients with anti-OJ (anti-isoleucyl-tRNA synthetase) autoantibodies. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:842-5.
- [48] Hirakata M, Suwa A, Takada T, et al. Clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase. *Arthritis Rheum* 2007;56:1295-303.
- [49] Betteridge Z, Gunawardena H, North J, et al. Anti-synthetase syndrome: a new autoantibody to phenylalanyl transfer RNA synthetase (anti-Zo) associated with polymyositis and interstitial pneumonia. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:1005-8.

Anticorps anti-récepteur à la phospholipase A2 : marqueur sérologique de la glomérulonéphrite extra-membraneuse

Étude d'une cohorte de 233 patients

Gabrielle Denizaut^a, Faiza Mougari^a, Eric Anton^a, Stéphanie Ripert-Bernusset^a, Eric Ballot^a, Catherine Johanet^{a,*}

1. Introduction

La glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM) est la cause la plus fréquente de syndrome néphrotique chez l'adulte et 80 % des cas sont d'origine indéterminée (forme idiopathique). Le diagnostic repose sur l'histologie rénale qui révèle un épaississement du versant externe de la membrane basale glomérulaire dû à un dépôt d'immunoglobulines (IgG4, IgG1) et de complément. Les antigènes cibles sont restés inconnus très longtemps. Ce n'est qu'en 2009 que l'antigène podocytaire, cible majeure, a été identifié au récepteur de la phospholipase A2 de type M (PLA2R) [1] et que des anticorps (Ac) anti-PLA2R ont été mis en évidence dans le sérum de patients ayant une GEM idiopathique. Leur détection s'est simplifiée en 2010 avec l'apparition d'une technique commerciale permettant une plus large étude de ce marqueur.

Nous présenterons ici d'une part une synthèse bibliographique et d'autre part les résultats observés sur une cohorte de 233 patients pour lesquels nous avons effectué la recherche d'Ac anti-PLA2R.

2. Synthèse bibliographique

2.1. Historique

Les mécanismes d'apparition de la GEM sont encore mal connus. Cependant, les Ac anti-PLA2R ne sont pas les premiers Ac dirigés contre un antigène présent à la surface des podocytes à être caractérisés.

Les Ac anti-mégaline ont été identifiés chez le rat en 1983 [2], dans la néphrite expérimentale de Heymann. Mais ce

modèle animal, bien que présentant des caractéristiques histologiques proches de la GEM humaine, n'est pas transposable à l'homme, la mégaline n'étant pas exprimée sur le podocyte humain.

Vingt ans après la découverte de la mégaline, l'équivalent humain a été identifié dans une forme rare de GEM allo-immune néonatale [3]. Il s'agit de l'endopeptidase neutre (NEP), enzyme normalement présent à la surface du podocyte. Les mères déficientes en NEP (gène muté) se sont immunisées pendant la grossesse et les Ac maternels se sont fixés sur les podocytes fœtaux.

Enfin en 2009, l'équipe de Beck et al. [1] met en évidence, grâce aux sérums de patients atteints de GEM idiopathique, un anticorps reconnaissant spécifiquement une glycoprotéine de 185 kDa dans le glomérule humain normal. La spectrométrie de masse permettra d'identifier formellement cette glycoprotéine au récepteur de type M de la phospholipase A2 (PLA2R).

Très récemment, d'autres cibles antigéniques comme l'aldose réductase et la superoxyde dismutase-2 ont été identifiées au niveau des podocytes par une approche protéomique [4].

2.2. Cible antigénique

Le PLA2R est un récepteur transmembranaire de type 1 pour la phospholipase soluble, appartenant à la famille des récepteurs au mannose (*figure 1*). Il est exprimé de façon abondante au niveau des podocytes et plus faiblement dans les poumons et les polynucléaires neutrophiles. Il est recyclé de manière constitutive à la membrane plasmique par endocytose, ce qui assure une source constante de PLA2R au niveau des pieds des podocytes. Son rôle biologique dans le rein n'est pas élucidé.

Il existe un polymorphisme du gène du PLA2R et certains génotypes sont associés à une plus grande susceptibilité génétique pour la GEM idiopathique [5] ainsi qu'à un taux de rémission faible [6].

L'autoanticorps appartient majoritairement à la sous-classe des IgG4, qui est déjà connue pour être la sous-classe prédominante dans les dépôts immuns observés dans la GEM idiopathique. D'autres sous-classes, IgG1 et IgG3, sont également présentes mais en quantité minimale.

a Unité d'Immunologie

Hôpital Saint-Antoine, AP-HP

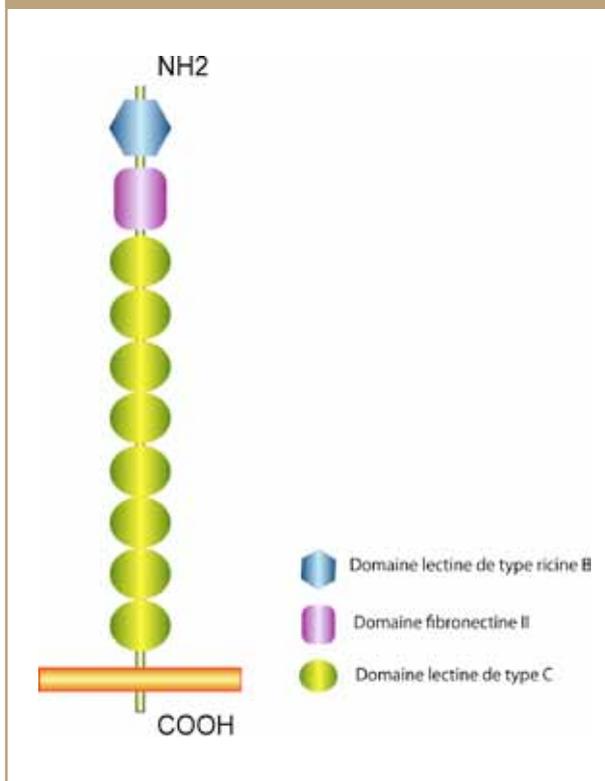
184, rue du Faubourg Saint-Antoine

75571 Paris cedex 12

* Correspondance

catherine.johanet@sat.aphp.fr

Figure 1 – Structure du récepteur de la phospholipase A2.



PLA2R et IgG4 sont colocalisés sur la membrane du podocyte dans la GEM idiopathique. De plus, les IgG éluées de biopsies rénales de patients atteints de GEM idiopathique réagissent avec le PLA2R recombinant et avec la bande de 185 kDa visualisée par Western blot. Ce n'est pas le cas pour les IgG éluées de patients atteints de GEM lupique ou de néphropathie à IgA [1].

2.3. Détection des Ac anti-PLA2R

Ces Ac ont été mis en évidence par Western blot dans des conditions non dénaturantes en utilisant comme antigène un extrait de glomérules humains normaux [1].

Depuis 2011, ils peuvent être détectés par une technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) utilisant comme antigène une lignée de cellules rénales embryonnaires humaines transfectée avec le gène du PLA2R et comme contrôle la même lignée cellulaire non transfectée [7]. L'étude comparative des deux tests a montré des résultats concordants [7].

2.4. Intérêt des Ac anti-PLA2R comme marqueur diagnostique des GEM idiopathiques

Toutes études confondues, les Ac anti-PLA2R apparaissent comme un excellent marqueur diagnostique des GEM idiopathiques.

La sensibilité varie de 57 % à 82 % [1, 7-11]. Cependant, les cohortes de patients étudiées restent modérées (36 GEM idiopathiques dans l'étude princeps de 2009 [1], 3 à 42 patients dans des études américaines et européennes [7-10], 60 dans une étude chinoise [11]).

La spécificité est également excellente (89 à 100 % selon les études) [1, 7-10]. Des Ac anti-PLA2R ont été détectés dans quelques cas de GEM secondaire (lupus érythémateux disséminé, hépatite virale B, cancer) [11].

2.5. Intérêt des Ac anti-PLA2R dans le suivi des GEM idiopathiques

Les Ac anti-PLA2R apparaissent comme des marqueurs d'activité de la maladie. Ainsi, Beck et al. [1, 12] mettent en évidence une corrélation entre la présence de l'Ac anti-PLA2R et une maladie cliniquement active avec protéinurie et hypoalbuminémie. De plus, chez les patients en rémission clinique, les Ac anti-PLA2R diminuent ou disparaissent avant même que la protéinurie ne soit complètement résolue. Hofstra et al. [9] ont suivi douze patients ayant une GEM idiopathique aux différentes phases de la maladie (phase initiale, rémission puis rechute) et ont également montré une diminution du taux des Ac pendant la phase de rémission et une réascension de ceux-ci en cas de récurrence de la maladie.

Enfin, en 2011, Beck et al. montrent que les Ac anti-PLA2R disparaissent chez 68 % des patients après un an de traitement immunosuppresseur. Parmi ceux-ci, 59 % auront une rémission complète et 88 % une rémission partielle vs 0 % et 33 % dans le groupe de patients présentant un taux d'Ac stable [10]. Ces données suggèrent la possible utilisation de ces anticorps pour prédire la réponse au traitement immunosuppresseur [10, 13].

Concernant le risque de récurrence de GEM après transplantation rénale, une première étude suggère que la présence d'Ac anti-PLA2R avant transplantation pourrait être un facteur de risque de récurrence de la maladie [14]. Cependant, Debiec et al. en 2011 ont montré que les Ac anti-PLA2R ne sont impliqués que dans 50 % des récurrences après transplantation [15]. Par ailleurs, ces Ac ne sont pas présents dans les GEM *de novo* [15].

3. Étude d'une cohorte de 233 patients atteints de GEM

3.1. Critères de sélection

- Détection des Ac anti-PLA2R dans l'unité d'auto-immunité de l'hôpital Saint-Antoine entre janvier 2011 et janvier 2012.
- Obtention des renseignements clinico-biologiques suivants (sous forme de questionnaire adressé à chaque prescripteur) : protéinurie, créatininémie, histologie rénale en faveur d'une GEM, idiopathique ou secondaire (recherche de la cause), traitement.

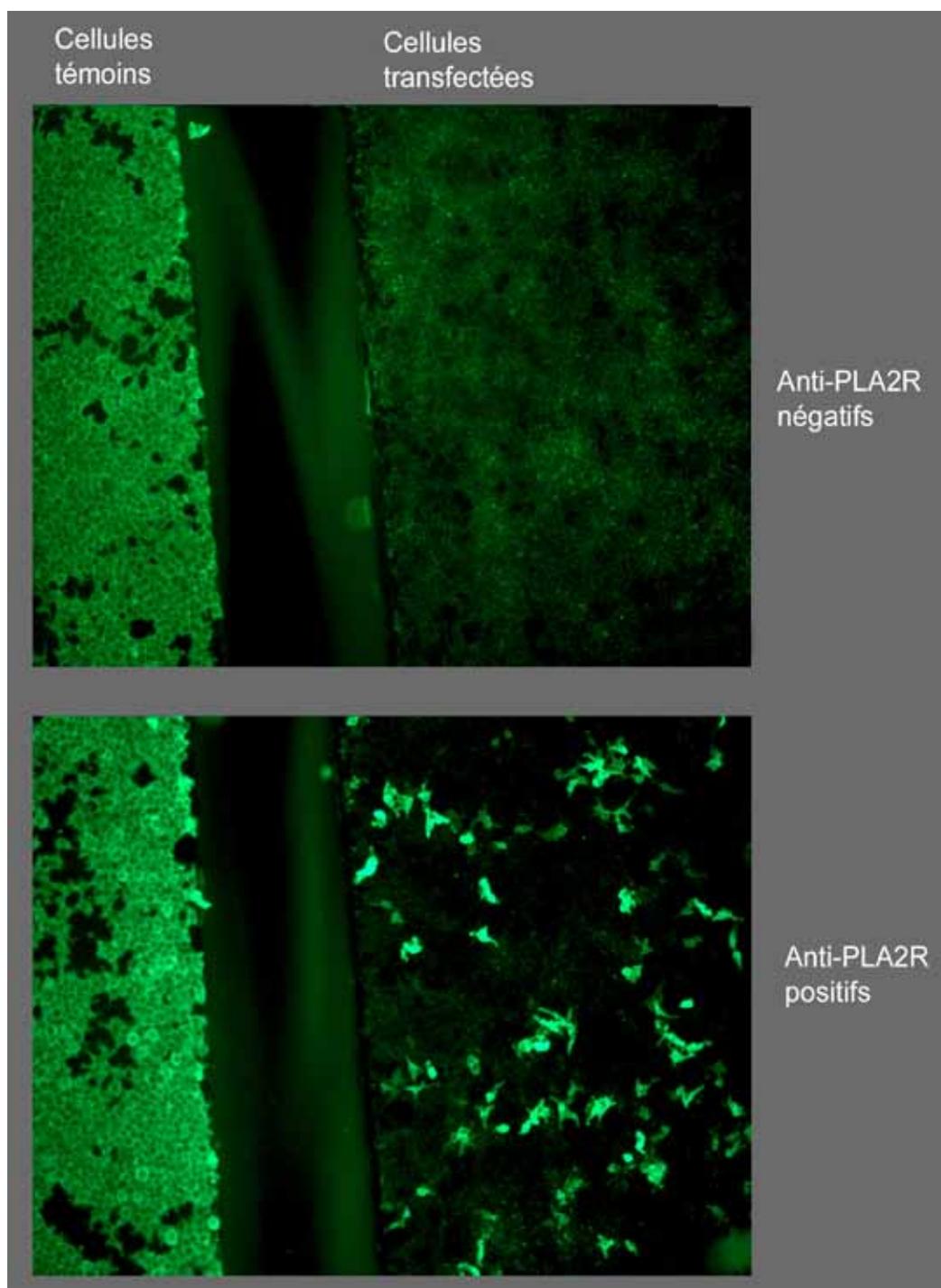
3.2. Détection des Ac anti-PLA2R

Les Ac anti-PLA2R ont été détectés par IFI sur cellules rénales embryonnaires humaines transfectées (EUROIMMUN) (figure 2). Le seuil de positivité correspond à la dilution au 1/10, les sérums positifs sont titrés jusqu'au 1/1 000.

3.3. Description de la cohorte

Des renseignements complets ont été obtenus pour 233 patients présentant une GEM histologiquement prouvée.

Figure 2 – Détection des Ac anti-PLA2R par immunofluorescence indirecte.



Parmi eux, 166 patients ont une GEM idiopathique (âge moyen 52 ans, 72 % d'hommes) et 67 patients une GEM secondaire (âge moyen 49 ans, 37 % d'hommes).

Le groupe des GEM secondaires est constitué de 45 GEM lupiques, 12 GEM néoplasiques, 4 GEM secondaires à une infection, 3 GEM liées à une réaction de greffon contre l'hôte (GVH), 2 GEM d'origine médicamenteuse et 1 GEM secondaire à un syndrome de Sharp.

Dans le groupe des GEM idiopathiques, 35 patients ont subi une transplantation rénale six ans en moyenne avant le prélèvement. Parmi eux, 28 patients présentent une GEM sur greffon (dont 12 récidives et 9 GEM *de novo*) et 7 patients n'ont pas de GEM sur greffon.

Un suivi a été possible pour 42 patients ayant une GEM idiopathique, et pour lesquels plusieurs prélèvements (de 2 à 7) nous ont été adressés.

3.4. Prévalence des Ac anti-PLA2R dans la cohorte

La prévalence des Ac anti-PLA2R est de 36 % (60/166) dans les GEM idiopathiques vs 1,5 % (1/67) dans les GEM secondaires ($p = 0,0001$), où il s'agit d'un patient ayant une GEM secondaire à un adénocarcinome prostatique.

La valeur prédictive positive du test en faveur du diagnostic de GEM idiopathique est donc excellente (VPP = 98,4 %). Il existe une corrélation entre la présence de l'Ac et l'activité de la maladie évaluée sur la protéinurie. La fréquence du marqueur est de 45,5 % dans les GEM idiopathiques avec protéinurie > 3 g/j vs 18 % quand la protéinurie est < 3 g/j ($p = 0,004$). Cependant, il n'y a pas de corrélation significative entre le taux de la protéinurie et le titre des Ac anti-PLA2R.

Chez les patients transplantés, la prévalence des Ac est de 42 % quand il existe une récurrence de la maladie sur le greffon vs 0 % dans les GEM *de novo* et lorsque le greffon ne présente pas de GEM ($p = 0,019$).

3.5. Suivi de 42 patients atteints de GEM idiopathique

Durant l'année de suivi, 19 patients (45 %) présentent une diminution du titre ou une disparition des

Ac anti-PLA2R et 23 patients (55 %) une augmentation. Chez 73 % des patients présentant une diminution du titre d'Ac anti-PLA2R, la protéinurie est également diminuée. Inversement, lorsque le titre des Ac est stable ou augmente, la protéinurie augmente dans 91 % des cas.

4. Conclusion

Nos résultats sur une importante cohorte de patients sont en accord avec ceux de la littérature. Les Ac anti-PLA2R apparaissent comme d'excellents marqueurs diagnostiques de la GEM idiopathique. Leur présence semble corrélée à l'activité de la maladie et la variation de leur titre pourrait permettre de prédire la réponse au traitement immunosuppresseur.

Remerciements

Nous tenons à remercier l'ensemble des néphrologues qui nous ont fourni les renseignements clinico-biologiques nécessaires à cette étude, et tout particulièrement le Professeur P. Ronco (Tenon).

Déclaration d'intérêts: les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Beck LH, Bonegio RGB, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009;361(1):11-21.
- [2] Kerjaschki D, Farquhar MG. Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (gp330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J Exp Med* 1983;157:667-86.
- [3] Debiec H, Guignon V, Mougenot B, et al. Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *N Engl J Med* 2002;346(26):2053-60.
- [4] Prunotto M, Carnevali ML, Candiano G, et al. Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(3):507-19.
- [5] Kim S, Chin HJ, Na KY, et al. Single nucleotide polymorphisms in the phospholipase A2 receptor gene are associated with genetic susceptibility to idiopathic membranous nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2011;117(3):c253-8.
- [6] Liu YH, Chen CH, Chen SY, et al. Association of *phospholipase A2 receptor 1 polymorphisms* with idiopathic membranous nephropathy in Chinese patients in Taiwan. *J Biomed Sci* 2010;17:81.
- [7] Debiec H, Ronco P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2011;364(7):689-90.
- [8] Gunnarsson I, Schlumberger W, Rönnelid J. Antibodies to M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) and membranous lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 2011;Dec 16[Epub ahead of print].
- [9] Hofstra JM, Beck LH, Beck DM, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6(6):1286-91.
- [10] Beck LH Jr, Fervenza FC, Beck DM, et al. Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(8):1543-50.
- [11] Qin W, Beck LH Jr, Zeng C, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(6):1137-43.
- [12] Beck LH Jr, Salant DJ. Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead. *Kidney Int* 2010;77(9):765-70.
- [13] Cravedi P, Ruggenenti P, Remuzzi G. Circulating anti-PLA2R autoantibodies to monitor immunological activity in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(8):1400-2.
- [14] Stahl R, Hoxha E. PLA2R autoantibodies and recurrent membranous nephropathy after transplantation. *N Engl J Med* 2010;363(5):496-8.
- [15] Debiec H, Martin L, Jouanneau C, et al. Autoantibodies specific for the phospholipase A2 receptor in recurrent and *de novo* membranous nephropathy. *Am J Transplant* 2011;11(10):2144-52.

Les synaptopathies auto-immunes

René-Louis Humbel^{a,*}

1. Introduction

Le concept de synaptopathie définit une maladie du système nerveux liée à des anomalies de la fonction synaptique. Le terme de synapse, du grec synaptein pour connexion, a été introduit par Charles Scott Sherrington en 1897 pour nommer les zones de contact entre neurones. Les synapses sont constituées de trois éléments qui doivent interagir de façon précise. L'élément pré-synaptique de la terminaison axonale renferme les vésicules synaptiques qui sont les organites de stockage des neuromédiateurs. L'élément post-synaptique est constitué d'une membrane qui renferme les récepteurs des neuromédiateurs et des canaux ioniques. Ces deux éléments sont séparés par la fente synaptique. La transmission synaptique débute par une stimulation de l'élément pré-synaptique et un recrutement des vésicules synaptiques. Celles-ci sont entourées d'une membrane très riche en protéines assurant leur arrimage à la membrane pré-synaptique et la libération des neuromédiateurs. Des récepteurs spécifiques et des canaux ioniques sont présents dans la membrane et assurent la libération et la distribution des neuromédiateurs. Sur la membrane post-synaptique se trouvent de nombreux récepteurs et canaux ioniques et de nombreuses protéines d'échafaudage et de contrôle. Plusieurs molécules des éléments synaptiques sont la cible des autoanticorps (*figure 1*). Ces anticorps reconnaissent soit des récepteurs-canaux (récepteurs du glutamate, récepteur de la glycine, récepteur du GABA), soit des canaux ioniques (canaux potassiques, canaux calciques) et protéines associées. Du fait de leur localisation membranaire ces molécules sont particulièrement bien exposées et accessibles aux autoanticorps (*tableau I*).

2. Les synaptopathies

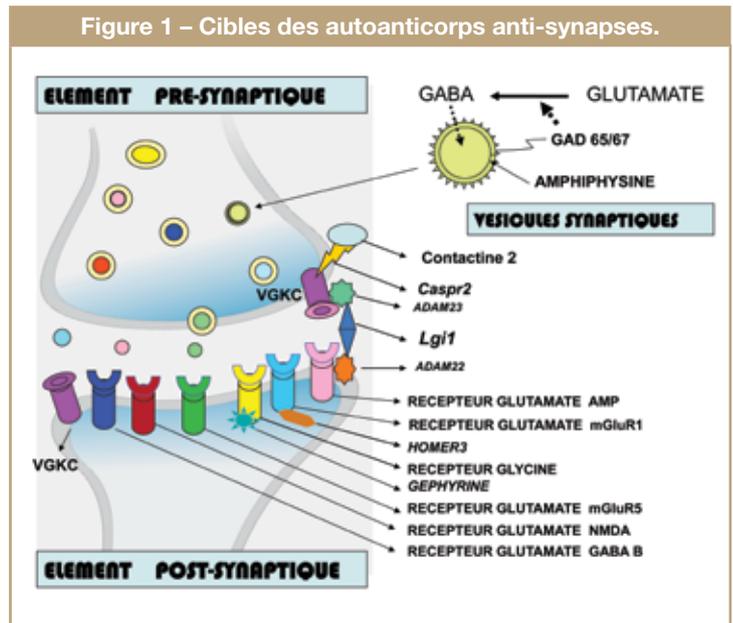
Les synaptopathies sont des maladies qui résultent d'une interruption de la communication synaptique. Des études récentes des dix dernières années ont montré que de plus en plus de ces maladies sont associées à des manifestations auto-immunes, objectivées par la présence, chez les malades, d'autoanticorps spécifiques pour des constituants synaptiques et par une bonne réponse à l'immunothérapie.

^a Laboratoire luxembourgeois d'immunopathologie (LLIP)

37, rue Romain Fandel
L-4149 Esch-sur-Alzette – Luxembourg

* Correspondance
rlhumbel@llip.lu

Figure 1 – Cibles des autoanticorps anti-synapses.



Les synaptopathies auto-immunes comportent des maladies du système nerveux central et du système nerveux périphérique. Ces dernières sont connues depuis longtemps puisqu'elles constituent les syndromes myasthéniques. Dans cette présentation, seules les synaptopathies auto-immunes du système nerveux central seront abordées. Les cibles antigéniques des autoanticorps se situent essentiellement dans les parties internes des lobes temporaux du cerveau correspondant à la structure appelée le système limbique. Celui-ci comprend les régions de l'hippocampe, l'amygdale temporale et les gyrus circulaires qui sont fortement impliquées dans les fonctions cognitives, la mémoire, le comportement et les mouvements volontaires, ainsi que l'hypothalamus qui règle les activités et le rythme du sommeil. En conséquence, les atteintes de ces structures se manifestent par des troubles neurologiques particuliers qui se retrouvent dans une entité appelée encéphalite limbique. Elle se manifeste par des anomalies neuropsychiatriques survenant de façon aiguë ou subaiguë et dominées par des troubles cognitifs, troubles de la mémoire antérograde, syndrome de confusion, trouble du sommeil, troubles du comportement et des crises d'épilepsie. Les symptômes initiaux sont variables en fonction du type d'autoanticorps présents dans le sang (*tableau II*).

L'encéphalite limbique survient à tout âge, y compris chez les petits enfants. Certaines de ces encéphalites limbiques sont associées à un cancer. Les tumeurs les plus fréquentes sont le cancer pulmonaire, surtout microcellulaire, le thymome, le tératome ovarien, la maladie de Hodgkin, le neuroblastome (*tableau III*).

Tableau I – Molécules cibles des autoanticorps dans les éléments synaptiques.

Vésicules synaptiques	
Amphiphysine	Protéine de la membrane des vésicules Nécessaire à l'endocytose des vésicules par la membrane présynaptique. Épitope : domaine SH3 de l'isoforme I
Glutamate-décarboxylase (GAD)	Enzyme de conversion du glutamate en acide gamma-aminobutyrique (GABA) Dans le cerveau : GAD65 (GAD 2) et GAD67 (GAD 1) Dans le cytosol et la membrane des vésicules synaptiques Épitopes : extrémité N-terminale (linéaires)
Membranes synaptiques (pré et post)	
Canaux potassiques (VGKC)	Canaux potassiques ioniques voltage-dépendants Sous-unités Kv 1.1, Kv 1.2, Kv 1.6 Épitope : Kv 1.1
Protéines Lgi1	Protéine transynaptique associée aux VGKC Connexion à ADAM 23 pré-synaptique et ADAM 22 post-synaptique Épitope : extrémité extracellulaire
Caspr2	Protéine d'adhérence du complexe VGKC aux paranodes des axones myélinisés Épitope : partie extracellulaire
TAG-1 (Contactin 2)	Protéine du complexe VGKC avec la protéine Caspr2 Épitope : non connu
Membrane post-synaptique	
Récepteur glutamate NMDAR (N-Méthyl-D-Aspartate)	Liaison du glutamate Transmission synaptique rapide Tétramère (NR1, NR2) Épitope : extrémité N-terminale de la sous-unité NR1
Récepteur glutamate AMP (α -Amino-3-hydroxy-5-Méthyl-4-isoxazolePropionate)	Récepteur ionotrope du glutamate Transmission synaptique rapide Tétramère GluR1, 2, 3, 4 Épitope : sous-unités GluR1 (30 %) GluR2 (60 %)
Récepteur glutamate mGlu1 (mGluR1)	Récepteur métabotrope couplé aux protéines G Cellules de Purkinje et dendrites Épitope : domaine extracellulaire aminoterminal
Protéine HOMER 3	Protéine associée aux mGluR1 Liaison du récepteur à la membrane post-synaptique Épitope : domaine extracellulaire
Récepteur glutamate mGluR5 (mGluR5)	Surtout exprimée dans l'hippocampe Épitope : domaine extracellulaire (seulement 1 cas décrit)
Récepteur glycine (GlyR)	Récepteur essentiel avec le glutamate Neurotransmetteur inhibiteur Complexe pentamérique α/β Épitopes : sous-unités α 1 (cerveau), sous-unité α 2 (moelle épinière)
Géphyrine	Protéine d'ancrage du récepteur GlyR dans la membrane post-synaptique Épitope : sous-unités β
Récepteur GABA B (GABA RB)	Récepteur essentiel pour le GABA pré- et post-synaptique Neurotransmetteur inhibiteur Épitope : sous-unités B1 et B2

Tableau II – Manifestations cliniques associées aux principaux autoanticorps dirigés contre les antigènes synaptiques.

Anticorps anti-	Clinique
VGKC-Lgi1	Troubles du sommeil Dystonie faciobrachiale Troubles mnésiques sévères Convulsions dystoniques Epilepsie Hyponatrémie
VGKC-Caspr2	Hyperexcitabilité neuromusculaire Crampes, fasciculations Hallucinations, délire Troubles mnésiques
Récepteur Glu-NMDA	Dyskinésie orofaciale Chorée, choréoathétose Posture dystonique Désintégration du langage Epilepsie Catatonie
Récepteur Glu-AMP	Psychose sévère Troubles mnésiques
Récepteur GABA B	Epilepsie Psychose Hallucinations Agressivité Troubles du sommeil
GAD Amphiphysine	Rigidité musculaire Ataxie Encéphalomyélite Epilepsie
Récepteur glycine	
Récepteur mGluR5	Démence
Récepteur mGluR1	Ataxie cérébelleuse
Homer 3	Ataxie cérébelleuse

Tableau III – Principaux cancers associés aux encéphalopathies auto-immunes.

Anticorps anti-	Néoplasies
Amphiphysine	Cancer pulmonaire microcellulaire Cancer du sein
Canaux potassiques - Protéine Lgi1	Cancer thyroïde Cancer pulmonaire microcellulaire Cancer rein Thymome Cancer pulmonaire microcellulaire Thymome malin
- Protéine Caspr2	
Récepteur Glu-NMDAR	Tératome ovarien (testiculaire) Tératome abdominal Neuroblastome
Récepteur Glu-AMP	Cancer pulmonaire microcellulaire Thymome malin Cancer sein
Récepteur glycine	Rares (thymome)
Récepteur GABA B1	Cancer pulmonaire microcellulaire
Récepteur mGluR1	Maladie de Hodgkin
Récepteur mGluR5	Maladie de Hodgkin
Glutamate décarboxylase (GAD)	Rares (1 cas : tumeur pancréas)

La prise en charge de la maladie est conditionnée par la précocité du diagnostic d'où l'intérêt grandissant de la recherche et de l'identification précise des autoanticorps. Elle comporte l'instauration rapide d'une immunothérapie et, en cas de tumeur, le traitement du cancer sous-jacent, si possible par la résection tumorale.

3. Méthodes de détection des anticorps (tableau IV)

Le diagnostic sérologique des encéphalites limbiques auto-immunes est basé sur la recherche de divers autoanticorps spécifiques dans le sérum. L'utilisation du LCR peut être utile mais elle ne peut remplacer celle du sérum. En effet, la concentration en immunoglobulines du LCR est très faible, rendant la recherche des autoanticorps peu sensible. Les réactions d'interprétation difficile en raison de la présence d'anticorps antinucléaires peuvent en partie être éliminées par adsorption préalable du sérum avec un extrait de foie. La plupart des anticorps concernés reconnaissent des molécules exprimées au niveau des membranes dans leur conformation moléculaire native. C'est pourquoi il n'existe pas de méthodes comme l'ELISA ou le dot, sauf pour l'amphiphysine qui existe sous forme d'une protéine recombinée.

Les anticorps anti-neuronaux à cible membranaire sont recherchés par immunofluorescence sur des coupes de tissus neuronaux, cervelet et hippocampe de singe ou de rat. Ils marquent essentiellement la couche moléculaire sur ces deux tissus avec une intensité variable suivant le type d'anticorps. Pour certains anticorps, on dispose depuis peu de cellules transfectées qui surexpriment un antigène spécifique.

Les anticorps anti-VGKC sont recherchés par une technique de radio-immunoprécipitation qui utilise un extrait de cerveau de rat dans lequel les VGKC sont spécifiquement marqués

Tableau IV – Méthodes utilisées pour la recherche des autoanticorps associés aux synaptopathies.

	Immunofluorescence			Autres tests disponibles
	Cervelet	Hippocampe	Cellules transfectées	
Amphiphysine	C. moléculaire	C. moléculaire	-	Immunodot
Glutamate décarboxylase (GAD)	C. moléculaire Pourtour des neurones	C. moléculaire	-	RIA, ELISA, Dot (GAD65)
Canaux potassiques (VGKC)	C. moléculaire	C. moléculaire	Disponible	Radio-immunoprécipitation
Lgi1	C. moléculaire	C. moléculaire	Disponible	-
Caspr2	C. moléculaire	C. moléculaire	Disponible	-
Récepteur glutamate NMDA		C. moléculaire (+/-)	Disponible NR1	-
Récepteur glutamate AMP	-	C. moléculaire	Disponible GluR1/R2	
Récepteur glutamate mGluR1	Cytoplasme cell. Purkinje Dendrites	-	-	-
Récepteur glutamate mGluR5	-	C. moléculaire	-	
Récepteur GABA B	-	C. moléculaire GABA B R1/2	Disponible	-

C. moléculaire : couche moléculaire.

par l' α -dendrotoxine, elle-même couplée à l'iode 125. Cette méthode décèle les anticorps spécifiques pour les canaux potassiques Kv 1.1, Kv 1.2 et Kv 1.6 ainsi que les anticorps reconnaissant des protéines associées Lgi1, Caspr2 et autres. Près de 20 % des anticorps anti-VGKC détectés par radio-immunoprécipitation ne reconnaissent pas les protéines Lgi1 et Caspr2. Certains sont spécifiques pour la sous-unité Kv 1.1 des canaux potassiques mais il existe encore des spécificités non identifiées.

Déclaration d'intérêts : l'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Intérêt des anticorps anti-aquaporine-4 dans le diagnostic et le suivi de la neuromyéélite optique

Thierry Vincent^{a,*}

1. Introduction

La découverte des autoanticorps NMO-IgG et de leur cible antigénique l'aquaporine-4 (AQP4) par l'équipe de Vanda Lennon en 2004-2005 a profondément modifié notre compréhension de la neuromyéélite optique (NMO ou maladie de Devic) [1, 2]. Longtemps considérée comme un sous-type de sclérose en plaque (SEP), il est maintenant clair que la NMO est une maladie à part entière avec un processus physiopathologique propre qui, contrairement à la SEP, met en jeu principalement l'immunité à médiation humorale [3]. Le rôle pathogène des anticorps anti-AQP4 est en effet maintenant clairement démontré grâce à différents modèles animaux permettant le transfert passif de la maladie chez le rat suite à l'injection intra-thécale ou intra-cérébrale d'immunoglobulines (IgG) de patients NMO [4, 5]. De nombreuses études menées ces dernières années se sont attachées à évaluer de façon objective la valeur de ces anticorps dans la prise en charge des patients.

2. Intérêt diagnostique des anti-AQP4

La NMO est une maladie démyélinisante du système nerveux central (SNC) comme la SEP mais au pronostic beaucoup plus péjoratif avec 50 % des patients à 5 ans qui perdent leur autonomie de marche et/ou la vision d'au moins un œil [6]. De plus les traitements immunomodulateurs de la SEP sont inefficaces dans la NMO et peuvent même aggraver certains patients d'où la nécessité d'un diagnostic différentiel précoce entre ces deux pathologies pour pouvoir proposer sans délai le traitement le plus adapté.

La première technique décrite pour identifier les NMO-IgG fut l'immunofluorescence indirecte (IFI) sur coupe de cerveau/cervelet/moelle épinière de souris [1]. L'étude, réalisée sur 102 patients nord-américains et 20 patients japonais, conclut à une sensibilité de 73 % et une spécificité de 91 %. Surtout, aucun des patients contrôles atteints de SEP ne présentait d'anticorps NMO-IgG. Cette excellente spécificité ne fut jamais démentie dans les études ultérieures, quelle que soit la technique utilisée, et les NMO-IgG sont désormais inclus dans les critères diagnostiques de la NMO révisés en 2006 [7].

L'identification en 2005 de l'AQP4 comme cible antigénique des NMO-IgG [2] a permis le développement de plusieurs techniques utilisant la protéine recombinante, en particulier l'ELISA, l'immunoprécipitation (RIPA/FIPA) ou les tests cellulaires avec cellules génétiquement modifiées pour exprimer l'AQP4 [8-11]. Ces techniques ont l'avantage d'être spécifiques de l'AQP4, opératoire indépendantes et, pour certaines, quantitatives. Selon certaines études, les techniques utilisant l'AQP4 recombinante, et notamment les tests cellulaires, seraient également plus sensibles que l'IFI [11, 12].

L'IFI sur coupe de cervelet reste cependant la technique de référence pour le dépistage. Certes c'est une méthode subjective, semi-quantitative et qui nécessite un minimum d'expérience, mais l'IFI présente l'avantage, contrairement aux techniques « recombinantes », de permettre l'identification simultanée de divers autoanticorps et pas seulement des anticorps anti-AQP4. Nous avons observé en particulier les cas de plusieurs patients atteints de maladies démyélinisantes du SNC et présentant en IFI un marquage punctiforme atypique en périphérie des micro-vaisseaux et le long de la pie-mère [11]. La topographie du marquage, similaire mais facilement distinguable de l'aspect beaucoup plus linéaire des NMO-IgG, suggère la présence d'un anticorps ciblant un antigène de la barrière hémato-encéphalique, donc potentiellement pathogène, mais autre que l'AQP4. Enfin, même si l'IFI est sans doute un peu moins sensible que les tests cellulaires, ses performances sont le plus souvent suffisantes en dépistage lors d'un événement démyélinisant où les titres observés sont en général élevés (> 1/200).

Au final, d'après les différentes séries publiées, la spécificité des anti-AQP4 reste excellente (91-100 %) et seule la sensibilité semble légèrement en retrait, plus proche des 50-60 % que des 73 % publiés dans l'étude initiale [12-14].

^a Laboratoire d'immunologie

Centre hospitalier universitaire – Hôpital Saint-Éloi
80, avenue Augustin-Fliche
34295 Montpellier cedex 5

* Correspondance

t-vincent@chu-montpellier.fr

3. Intérêt pronostique des anti-AQP4

Les anticorps anti-AQP4 présentent un double intérêt pronostique :

- chez un patient présentant une myélite transverse longitudinalement extensive (LETM) isolée ou une névrite optique (NO) récurrente isolée, la présence d'anti-AQP4 augmente d'une part le risque de récurrence et d'autre part le risque pour le patient de compléter le tableau pour aboutir à une forme complète de NMO [15, 16]. Les LETM et les NO avec présence de NMO-IgG sont ainsi considérées comme des formes débutantes et/ou limitées de NMO et partagent son mauvais pronostic ;
- la présence de NMO-IgG chez un patient présentant une NMO, une LETM ou une NO récurrente est associée à un mauvais pronostic avec des poussées plus sévères et/ou des séquelles fonctionnelles plus importantes par rapport aux patients dits « séronégatifs » [17, 18].

4. Intérêt des anti-AQP4 dans le suivi thérapeutique des patients

Le plus souvent, lorsqu'un anticorps est directement pathogène, sa concentration sérique varie avec l'évolution clinique de la maladie. Il peut alors être utilisé comme biomarqueur, permettant de suivre l'efficacité thérapeutique.

Concernant les anticorps anti-AQP4, dont le pouvoir pathogène est maintenant clairement démontré, les premières études montraient en effet une bonne corrélation entre concentration sérique et activité de la maladie [19, 20]. Ces résultats n'ont cependant pas été confirmés par d'autres études. L'équipe de la Mayo Clinic en particulier n'a pas retrouvé de corrélation entre l'activité de la maladie et la

concentration sérique des anticorps mais avec leur activité cytolytique mesurée grâce à un test de cytotoxicité [21]. Nous avons également développé un test de cytotoxicité mesurant la lyse de cellules cibles exprimant l'AQP4 après incubation avec les sérums des patients en présence de complément. Nous avons observé une excellente corrélation entre concentration sérique et activité cytolytique des anticorps anti-AQP4. En revanche, ni les concentrations sériques, ni les activités cytolytiques n'étaient corrélées avec l'évolution clinique des patients au cours du traitement (article soumis). La réponse à cette controverse est peut-être apportée par l'équipe de Dujmovic qui montre une corrélation entre l'évolution de la maladie et la concentration des anticorps non pas dans le sérum mais dans le LCR [22]. Il est en effet logique de penser que les anticorps présents dans le LCR sont plus directement pathogènes que ceux du sérum [4, 5]. La ponction lombaire est cependant un geste trop invasif pour être utilisable de façon systématique dans le suivi des patients.

5. Conclusion

L'intérêt des anticorps anti-AQP4 dans le diagnostic de la NMO est maintenant parfaitement établi, notamment grâce à leur excellente spécificité permettant quasiment d'affirmer le diagnostic lorsqu'ils sont présents. Seule la sensibilité de ces anticorps reste médiocre malgré l'utilisation de nouveaux tests utilisant la protéine recombinante. Aucune de ces techniques n'a fait la preuve définitive de sa supériorité sur l'IFI qui reste encore la technique de référence au diagnostic. Les résultats contradictoires des dernières études ne permettent pas pour l'instant d'affirmer l'intérêt des anti-AQP4 comme biomarqueur dans le suivi longitudinal des patients.

Déclaration d'intérêts : l'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004;364(9451):2106-12.
- [2] Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, et al. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 2005;202(4):473-7.
- [3] Saikali P, Cayrol R, Vincent T. Anti-aquaporin-4 auto-antibodies orchestrate the pathogenesis in neuromyelitis optica. *Autoimmun Rev* 2009;9(2):132-5.
- [4] Saadoun S, Waters P, Bell BA, et al. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 2010;133(Pt2):349-61.
- [5] Kinoshita M, Nakatsuji Y, Kimura T, et al. Neuromyelitis optica: passive transfer to rats by human immunoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;386(4):623-7.
- [6] Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, et al. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* 2007;6(9):805-15.
- [7] Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006;66(10):1485-9.
- [8] Hayakawa S, Mori M, Okuta A, et al. Neuromyelitis optica and anti-aquaporin-4 antibodies measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neuroimmunol* 2008;196(1-2):181-7.
- [9] Waters P, Jarius S, Littleton E, et al. Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica and longitudinally extensive transverse myelitis. *Arch Neurol* 2008;65(7):913-9.
- [10] Jarius S, Probst C, Borowski K, et al. Standardized method for the detection of antibodies to aquaporin-4 based on a highly sensitive immunofluorescence assay employing recombinant target antigen. *J Neurol Sci* 2010;291(1-2):52-6.
- [11] De Vidi I, Boursier G, Delouche N, et al. Strategy for anti-aquaporin-4 auto-antibody identification and quantification using a new cell-based assay. *Clin Immunol* 2011;138(3):239-46.
- [12] Waters P, Vincent A. Detection of anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: current status of the assays. *Int MS J* 2008;15(3):99-105.
- [13] Fazio R, Malosio ML, Lampasona V, et al. Anti-aquaporin 4 antibodies detection by different techniques in neuromyelitis optica patients. *Mult Scler* 2009;15(10):1153-63.
- [14] McKeon A, Fryer JP, Apiwattanakul M, et al. Diagnosis of neuromyelitis spectrum disorders: comparative sensitivities and specificities of immunohistochemical and immunoprecipitation assays. *Arch Neurol* 2009;66(9):1134-8.

[15] Weinschenker BG, Wingerchuk DM, Vukusic S, et al. Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Ann Neurol* 2006;59(3):566-9.

[16] Matiello M, Lennon VA, Jacob A, et al. NMO-IgG predicts the outcome of recurrent optic neuritis. *Neurology* 2008;70(23):2197-200.

[17] Akman-Demir G, Tuzun E, Waters P, et al. Prognostic implications of aquaporin-4 antibody status in neuromyelitis optica patients. *J Neurol* 2011;258(3):464-70.

[18] Jarius S, Frederikson J, Waters P, et al. Frequency and prognostic impact of antibodies to aquaporin-4 in patients with optic neuritis. *J Neurol Sci* 2010;298(1-2):158-62.

[19] Jarius S, Aboul-Enein F, Waters P, et al. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain* 2008;131(Pt11):3072-80.

[20] Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, et al. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre. *Brain* 2007;130(Pt5):1235-43.

[21] Hinson SR, McKeon A, Fryer JP, et al. Prediction of neuromyelitis optica attack severity by quantitation of complement-mediated injury to aquaporin-4-expressing cells. *Arch Neurol* 2009;66(9):1164-7.

[22] Dujmovic I, Mader S, Schanda K, et al. Temporal dynamics of cerebrospinal fluid anti-aquaporin-4 antibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neuroimmunol* 2011;234(1-2):124-30.