



ISSN 1773-035X
20 €

RFL

REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES

N° 424 bis
Juillet/Août 2010



SUPPLÉMENT

6^e Colloque • GEAI 2010



Actualités
Autoanticorps

Vendredi 11 juin 2010

64712

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

RESPONSABLE MARKETING

PRESSE PROFESSIONNELLE :
Céline Dufour (50 54)
c.dufour@elsevier.com

RESPONSABLE DE MARCHÉ BIOLOGIE :

David Fournier (51 16)
d.fournier@elsevier.com
GSM : 06 14 50 99 11

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© 2010 - 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'appli-
quent 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 revente et toute autre forme de distribution de
documents. Des tarifs spéciaux sont disponibles pour les insti-
tutions d'enseignement qui souhaitent faire des photocopies à
des fins non commerciales d'enseignement. Les personnes peu-
vent obtenir les autorisations nécessaires et payer les redevan-
ces 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 insti-
tutions. L'autorisation de l'éditeur est requise pour toute revente
ou divulgation en dehors de l'institution. L'autorisation de l'édi-
teur 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 arti-
cle. Prière de prendre contact avec l'éditeur à son adresse indi-
quée ci-dessus. À l'exception de ce qui est indiqué ci-dessus,
aucune partie de cette publication ne peut être reproduite, sai-
sie 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'utilisa-
tion 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 81 120 – ISSN 1773-035x

Dépôt légal : à parution

Couverture :

© DR

Index des annonceurs :

A. Menarini diagnostics	6
Bio-Advance	4
Bio-Rad	4 ^e de couv.
Elsevier Masson	48 – 56 – 3 ^e de couv.
InGen	2 ^e de couv.
Phadia	10

édito

6^e Colloque du GEAI

Il y a cinquante ans, la sérologie auto-immune se limitait à peu de choses près à la recherche du facteur rhumatoïde. L'histoire des autoanticorps a en fait débuté avec l'introduction de la technique d'immunofluorescence dans les laboratoires d'immunologie. Par la suite, d'énormes progrès technologiques ont été accomplis si bien qu'actuellement on connaît plus d'une centaine d'autoanticorps. La recherche des autoanticorps est une étape essentielle dans le diagnostic d'une maladie auto-immune. Pour cela nous disposons de plusieurs méthodes et de nombreux réactifs dont il faut faire un choix judicieux. A défaut de pouvoir soumettre à une évaluation personnelle tous les réactifs qui sont proposés par les firmes spécialisées, le biologiste doit se contenter des informations fournies par des études réalisées et publiées par différentes équipes.

Le groupe du GEAI est composé de praticiens de l'auto-immunologie dont la préoccupation principale est d'évaluer les différentes méthodes et réactifs proposés pour la recherche et l'identification des autoanticorps et leur application à la pratique médicale. Le but des colloques du GEAI est de partager nos réflexions avec les autres auto-immunologistes et de faire le point sur les connaissances récentes sur les autoanticorps.

Depuis le précédent colloque, les membres du GEAI n'ont ménagé aucun effort pour donner un cachet particulier à cette nouvelle édition et pour en faire une manifestation créative. La collaboration des firmes de réactifs et d'appareillage de diagnostic est indispensable pour l'organisation de ce colloque et je leur adresse tous nos remerciements.

Je formule le souhait que ce 6^e colloque du GEAI connaisse le même succès éclatant que les précédents, et que grâce au travail des membres du groupe, la recherche scientifique et technologique dans le domaine de l'auto-immunologie continue de progresser.

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 6^e Colloque du GEAI :

Bio-Advance – Bio-Rad – BMD – Brahms – Bühlmann France – Diasorin – Eurobio – InGen – Instrumentation Laboratory – Labodia France – Mast – Menarini – Orgentec – Phadia.

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

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

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

Trésorier : Alain Chevailler, Immunologie et allergologie, CHU Larrey, Angers.

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

Membres : Isabel Abreu, Immunologie, Faculté de médecine, Lisbonne – Pascale Chrétien, Hématologie et immunologie, CHI Créteil – Sylvain Dubucquoi, Immunologie, CHRU Lille – Andrée Escande, Immunologie, CHU Saint-Eloi, Montpellier – Nicole Fabien, Auto-immunité, HC Lyon-Sud, Pierre-Bénite – Françoise Fortenfant, Immunologie, CHU Ranguel, Toulouse – Joëlle Goetz, Immunologie, CHU Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg – Catherine Johanel, Immunologie, CHU Saint-Antoine, Paris – Bruno Larida, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA – Jean-Claude Monier, Caluire – Nils-Olivier Olsson, Immunologie, CHU Plateau technique de biologie, Dijon – Marielle Sanmarco, Immunologie, Hôpital de la Conception, Marseille – Jean Sibilila, Rhumatologie, CHU Hautepierre, Strasbourg – Marie-France Taillefer, Laboratoire Biocentre, Bondues.

VENDREDI 11 JUIN 2010 - INSTITUT PASTEUR

Actualités sur les autoanticorps

Autoanticorps en 2010 : introduction au Colloque du GEAI René-Louis Humbel.....	7
Les autoanticorps utiles au diagnostic des sclérodermies et myopathies inflammatoires auto-immunes Nicole Fabien.....	11
Autoanticorps anti-centromère : résultats discordants Daniela Lakomy, René-Louis Humbel, Nils-Olivier Olsson.....	22
Anticorps antinucléaires et cancer René-Louis Humbel.....	27
PR séronégatives : mythe ou réalité ? Et si c'était, pour partie, la faute du biologiste ? Sylvain Dubucquoi, Marie Joncquel, Peggy Philippe, René-Marc Flipo.....	32
L'accréditation en auto-immunité Françoise Fortenfant, Marie-France Taillefer.....	40
Marqueurs sérologiques au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin Catherine Johanet, Eric Ballot.....	44
Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles de spécificités autres qu'anti-protéinase 3 ou anti-myéloperoxydase : corrélations clinico-biologiques Maxime Boyer, Alain Chevailler.....	49

Flashs d'actualités

• Anticorps anti-enveloppe nucléaire Eric Ballot, Catherine Johanet.....	57
• Epidémiologie de la cirrhose biliaire primitive : évaluation de l'incidence de la maladie en France Catherine Johanet, Farid Gaouar, Anne-Violaine Salle, Benjamin Diemert, Sofia Meurisse, Olivier Chazouillères, Fabrice Carrat, Raoul Poupon, Christophe Corpechot.....	63
• Suivi clinicobiologique des grossesses lupiques Joëlle Goetz, Arnaud Theulin, Jean Sibilia.....	64

Cas cliniques

• A propos de la diversité des profils immunologiques du syndrome des antiphospholipides Marielle Sanmarco.....	66
• Présentation de deux cas cliniques Jean Sibilia	

Autoanticorps en 2010 : introduction au Colloque du GEAI

René-Louis Humbel^{a,*}

1. Introduction

L'auto-immunologie est en plein développement car elle présente d'importantes perspectives pour des pathologies complexes responsables de nombreuses maladies. On compte actuellement plus de soixante maladies étiquetées « auto-immunes » essentiellement parce qu'elles sont associées à la présence d'autoanticorps dans le sérum. Plus de cent cinquante autoanticorps ont pu être identifiés. Ceux-ci présentent un intérêt majeur en médecine. Ils font partie des critères de diagnostic et/ou de classification de nombreuses affections. Ils précèdent généralement l'expression clinique complète de la maladie et ils peuvent constituer un facteur prédictif puissant de son évolution. Ils permettent souvent de dépister les formes frustes de certaines maladies ou celles qui se présentent avec des tableaux cliniques atypiques.

2. Maladies auto-immunes et autoanticorps

Un certain nombre de maladies ont reçu récemment la qualification d'auto-immunes car on y a mis en évidence des autoanticorps. Généralement ces maladies ont été décrites il y a longtemps mais ce n'est que récemment que les autoanticorps correspondants ont été caractérisés. La neuromyélite optique (NMO) décrite en 1894 par les médecins lyonnais Devic et Gault a pu être classée dans les maladies auto-immunes en 2004 par la mise en évidence d'anticorps antisystème nerveux (les anticorps anti-NMO) dont l'antigène cible a été identifié avec l'aquaporine 4 en 2005. Les anticorps antinucléaires ont permis une reclassification des myopathies. Ainsi les anticorps anti-synthétases (Jo-1, PL-7, PL-12) sont associés à des atteintes pulmonaires de type pneumopathies interstitielles infiltrantes souvent sévères. Les anticorps anti-SRP caractérisent une myopathie nécrosante des ceintures avec atteintes cardiaques et pulmonaires. La valeur prédictive de certains autoanticorps a pu être démontrée. Le diabète juvénile insulino-dépendant (diabète de type 1) est une maladie auto-immune du pancréas endocrine qui est diagnostiquée

très précocement par la présence d'anticorps anti-îlots (et/ou d'anticorps anti-GAD, anti-IA2, anti-insuline). Ces anticorps sont absents dans le diabète de type 2 qui survient à l'âge adulte et qui est généralement non insulino-dépendant. Néanmoins ces anticorps sont parfois retrouvés chez des diabétiques de type 2 chez qui le régime et le traitement par les antidiabétiques oraux ne parviennent plus à contrôler leur glycémie. Ces anticorps anti-GAD et anti-IA2 signalent alors l'apparition d'une réponse auto-immune contre le pancréas qui entraîne la perte de la sécrétion d'insuline et qui doit être remplacée par une insulinothérapie. La présence d'anticorps anti-thyropéroxydase (TPO) permet de prédire l'hypothyroïdie chez les sujets âgés, asymptomatiques, et ceci avant même la détection du trouble fonctionnel hormonal (élévation de la TSH), ce qui permet l'instauration précoce d'une thérapie de substitution. Le développement et l'utilisation de plus en plus fréquente des techniques de recherche des anticorps anti-transglutaminase tissulaire (anti-tTG) ont révélé l'incidence élevée de formes frustes, paucisymptomatiques, voire latentes de la maladie cœliaque chez l'adulte. Certains anticorps sont des marqueurs de gravité de la maladie à laquelle ils sont associés. Les anticorps anti-protéines et peptides citrullinés se sont révélés comme les marqueurs les plus spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde. Leur présence est plus particulièrement associée aux formes graves de la maladie qui évoluent vers des atteintes articulaires sévères et qui relèvent des biothérapies récemment introduites dans l'arsenal thérapeutique. Dans la maladie de Crohn, les anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) sont associés à un phénotype particulier, cliniquement sévère, à expression principalement iléale avec complications (sténoses et fistules), et qui peuvent relever d'un traitement par les anti-TNF α .

3. Nouveaux autoanticorps

De plus en plus d'autoanticorps ont été découverts mais leur signification clinique n'est pas toujours établie. Les anticorps antinucléaires dits anti-DFS70 (pour l'aspect en immunofluorescence sur les noyaux des cellules HEp-2 « dense fine speckled » et 70 kD le poids moléculaire de l'antigène cible) sont fréquemment détectés lors de la recherche des anticorps antinucléaires. Aucune association avec une maladie particulière n'a pu être montrée, et on les trouve même chez des sujets sains. La protéine DFS70 est surexprimée dans le noyau des cellules soumises à un stress oxydatif. Cette hyperproduction peut entraîner chez certains sujets prédisposés, en particulier ceux appartenant aux groupes HLA-DRB1, -DQ1B1 et -DPB1, une réponse immunitaire contre la protéine DFS70. Les anticorps dits anti-nématine ont été rapportés chez certains malades atteints d'hépatite C traités par l'interféron alpha. Les asso-

^a Laboratoire luxembourgeois d'immunopathologie (LLIP)

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

* Correspondance
rthumbel@llip.lu

© 2010 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

ciations cliniques avec les anticorps anticytoplasmiques marquant les structures où se contrôle le catabolisme des ARN messagers ne sont pas connues (anti-P-bodies). Si la biologie moléculaire permet actuellement l'identification très rapide des autoantigènes, la signification clinique des autoanticorps apparaît beaucoup plus lente à établir. Ainsi se pose la question du choix des autoanticorps à rechercher au laboratoire. Ce choix se portera bien entendu d'abord sur ceux pour lesquels une signification clinique a été démontrée. Ensuite on s'adressera aux anticorps dont la sensibilité et la spécificité cliniques sont élevées. Ces deux conditions n'allant souvent pas de pair, le choix du biologiste sera conditionné par les possibilités techniques dont il dispose pour rechercher aisément ces autoanticorps et pour les identifier.

4. Méthodes de recherche des autoanticorps

Les techniques immunologiques ont beaucoup évolué ces vingt dernières années. Elles ont permis le développement de méthodes de plus en plus sensibles et surtout spécifiques pour la recherche et l'identification d'autoanticorps.

C'est grâce à l'introduction de la technique d'immunofluorescence dans les années 50 que la plupart des autoanticorps ont été mis en évidence. Elle est encore utilisée dans la majorité des laboratoires d'immunologie comme technique de première intention pour la détection des autoanticorps. L'immunofluorescence indirecte est un test multiparamétrique qui permet la détection simultanée d'un maximum d'autoanticorps. La finesse des images permet de décrire de nombreux anticorps distincts reliés à des spécificités différentes.

Des coupes de tissus et des cellules isolées ou en culture sont largement disponibles dans le commerce pour la recherche des principaux autoanticorps. Récemment ont été introduits des substrats constitués de cellules transfectées qui surexpriment certains autoantigènes. De tels substrats sont actuellement disponibles pour les anticorps anti-SSA/Ro 60, anti-desmogléines 1 et 3, anti-BP230 de la membrane basale épidermique, anti-aquaporine 4, anti-récepteur de glutamate NMDAR et anti-antigènes pancréatiques PA1 et PA2. Les résultats de l'immunofluorescence sont influencés par de nombreux facteurs qui peuvent être maîtrisés. En principe, les fabricants des réactifs (coupes de tissus, cultures cellulaires, antiglobulines fluorescentes) doivent fournir au biologiste des préparations aptes à détecter les autoanticorps pour lesquels ils sont vendus. Le biologiste s'en assurera par l'utilisation de sérums témoins. L'examen microscopique est une étape essentielle. Elle est fortement liée à la qualité du microscope, en particulier à l'éclairage, qui est dépendant du degré d'usure de la lampe et du réglage correct du faisceau lumineux si on utilise une lampe à vapeur de mercure. L'introduction des lampes LED composées d'une diode électroluminescente représente un énorme progrès en immunofluorescence. Ces lampes ont une durée de vie de milliers d'heures et ne nécessitent aucun réglage. Elles peuvent être allumées et éteintes à tout moment. Il est bien connu que l'intensité

de la fluorescence, au niveau de la préparation examinée, baisse plus ou moins rapidement durant l'observation. Ceci est particulièrement gênant si plusieurs observateurs examinent successivement la préparation au microscope. L'addition de produits dits « anti-fading » au liquide de montage permet de réduire cet effet. On peut espérer que le marquage des antiglobulines par des fluorochromes, autres que le FITC, qui résistent au photoblanchiment soit introduit par les fabricants de réactifs. L'efficacité du microscope peut également être contrôlée par des standards optiques basés sur l'utilisation de lames portant des microsphères ou des cellules fluorescentes d'intensité variable. L'interprétation des résultats nécessite une connaissance approfondie des images de fluorescence observées. Pour cela, les biologistes et les techniciens doivent recevoir des formations adaptées pour accéder à une connaissance parfaite des aspects microscopiques. Récemment, des systèmes automatisés d'acquisition des images microscopiques ont été développés. Ils sont composés d'une caméra et d'un logiciel spécialement élaboré pour reconnaître les différents aspects de fluorescence et évaluer son intensité. Vu le très grand nombre d'aspects différents qui peuvent être observés, par exemple pour les anticorps antinucléaires, le développement de ces logiciels sera laborieux.

Les méthodes immunoenzymatiques (ELISA, dot) et immunofluorimétriques (Luminex®) sont des procédés aujourd'hui largement utilisés dans les laboratoires d'auto-immunité. Des réactifs sont commercialisés pour la recherche de nombreux autoanticorps. Leurs performances sont grandement dépendantes de la nature et de la qualité des antigènes utilisés et de la manière dont ils sont utilisés. Les antigènes d'origine animale ont été peu à peu remplacés par des antigènes d'origine humaine ou des antigènes recombinants. Toutefois il faut garder à l'esprit que les antigènes obtenus par génie génétique, malgré leur pureté, ne sont pas totalement identiques aux antigènes naturels. L'immobilisation des antigènes dans les techniques immunoenzymatiques en phase solide peut entraîner des modifications conformationnelles qui peuvent détruire ou masquer certains épitopes. Cet inconvénient a pu être levé par diverses procédures respectant la conformation moléculaire des autoantigènes. Un premier procédé est basé sur l'utilisation d'antigènes biotinylés qui sont ajoutés au sérum en phase liquide. Sur ce principe ont été développés des tests ELISA pour les anticorps anti-GAD et anti-IA2 qui ne pouvaient être préalablement mesurés que par les techniques radio-immunologiques. C'est sur ce même principe que peuvent être quantifiés les autoanticorps anti-aquaporine 4. Un autre procédé consiste à immobiliser l'autoantigène par l'intermédiaire d'un anticorps monoclonal (ELISA de capture) ou par un procédé chimique (anchor ELISA). La supériorité des tests ELISA reposant sur ces procédés a été bien démontrée pour la mesure des anticorps anti-PR3. Les peptides synthétiques sont également utilisés pour la recherche de certains autoanticorps. Leur qualité antigénique n'est pas égale pour toutes les préparations, elle dépend de la composition en acides aminés, de la longueur et de la structure des chaînes peptidiques. Ainsi les peptides citrullinés CCP2 et CCP3 ne réagissent pas de la même

façon avec les anticorps du sérum des malades atteints de polyarthrite rhumatoïde.

Peu à peu les firmes de diagnostic ont développé des trousse de réactifs adaptés aux automates de chimie clinique. Ceci a fait naître la tendance de transférer les tests d'auto-immunité vers les laboratoires de chimie. L'action la plus regrettable a été de remplacer la recherche des anticorps antinucléaires par immunofluorescence sur cellules HEp-2 par des ELISA automatisés utilisant des cupules recouvertes d'un extrait total de noyaux cellulaires ou d'un mélange d'antigènes purifiés ou recombinants. Les performances de ces tests, qui ne décèlent qu'un nombre restreint d'anticorps, ont été plusieurs fois mises en cause. Récemment les rhumatologues de l'American College of Rheumatology (ACR) ont épinglé les laboratoires nord-américains qui utilisaient des méthodes autres que l'immunofluorescence pour la recherche des anticorps antinucléaires et ceci à la suite de plusieurs résultats faussement négatifs rapportés dans des cas de lupus. L'ACR a rappelé ses exigences en recommandant l'immunofluorescence et l'obligation pour les laboratoires d'indiquer la méthode utilisée pour la recherche des anticorps antinucléaires.

5. Accréditation en auto-immunologie

Une gigantesque procédure, lourde et onéreuse, visant à accréditer tous les laboratoires médicaux est en marche. Elle constitue un grand pas en vue de l'amélioration des performances et de la qualité des analyses. Les techniques en auto-immunité sont nombreuses, basées sur des principes différents de ceux de la chimie clinique, ce qui n'est pas sans poser des problèmes aux biologistes et aux auditeurs des organismes d'accréditation. Les différentes

techniques immunologiques mesurent des populations d'anticorps dont la réactivité immunologique est hautement hétérogène contre des préparations antigéniques d'origines très diverses et dont l'antigénicité est très variable. Il est donc concevable que les différentes techniques varient dans leur capacité à évaluer les autoanticorps d'un même sérum. Au cours d'une maladie auto-immune la production d'autoanticorps est diverse. Cette diversité peut survenir à tous les stades depuis l'initiation, la propagation, la pérennisation de la réponse auto-immune et sous l'effet du traitement. Elle est la conséquence d'un processus d'extension ou de restriction épitopique. Ce phénomène influe sur la spécificité des autoanticorps. Un exemple très typique nous est fourni par les anticorps anti-PR3 qui réagissent différemment dans les tests ELISA suivant que le sérum provient d'un patient atteint de la maladie de Wegener en phase initiale active ou d'un malade sous traitement.

La standardisation est donc une tâche ardue car les sérums proposés comme « matériel de référence » possèdent leur propre hétérogénéité et ils ne sont pas disponibles pour tous les autoanticorps. Toutefois il existe un bon consensus dans l'approche qualitative, c'est-à-dire pour l'identification de nombreux autoanticorps. Des sérums de référence sont disponibles pour bon nombre d'anticorps antinucléaires et des programmes de contrôle de qualité nationaux ou commerciaux sont organisés, y compris pour des anticorps relativement rares (BMD, Biologie Prospective). L'auto-immunologie doit être réalisée dans un laboratoire capable de mettre en œuvre l'ensemble des techniques nécessaires à la détection et l'identification précise des autoanticorps. Le biologiste doit vérifier et s'informer continuellement sur les limites des techniques et des réactifs utilisés ainsi que sur l'utilité clinique des autoanticorps qu'il est appelé à rechercher.

Les autoanticorps utiles au diagnostic des sclérodermies et myopathies inflammatoires auto-immunes

Nicole Fabien^{a,*}

1. Sclérodermies

1.1. Introduction

Les sclérodermies sont caractérisées par un processus fibrosant évolutif et par des lésions vasculaires des capillaires et des artéioles essentiellement. Ces lésions peuvent toucher le système viscéral, d'où toute la gravité des sclérodermies. La physiopathologie est complexe mais certaines anomalies immunologiques, dont la réponse humorale avec une activation polyclonale lymphocytaire B, se révèlent être utiles au clinicien. Ainsi, la présence d'autoanticorps (aAc) antinucléaires de spécificité variée ciblant des antigènes intervenant dans le processus de régulation transcriptionnelle (protéines centromériques, topo-isomérase, ARN polymérase) permet d'étayer un diagnostic hésitant devant une forme débutante et permet d'individualiser les syndromes de chevauchement sclérodermies/myosites.

1.2. Diagnostic clinique

- Le syndrome de Raynaud est le signe clinique le plus précoce et constant, pouvant précéder de plusieurs mois le début de la maladie (70 %).
- Les signes cutanés sont centrés sur l'épaississement et la sclérose du derme et du tissu cellulaire sous-cutané. Le visage est figé. L'ouverture de la bouche peut être limitée. Une hyperpigmentation cutanée est souvent associée. Une sclérose des glandes salivaires peut expliquer un syndrome sec.
- Les télangiectasies sont très évocatrices, prédominantes au niveau des lèvres et au niveau des doigts.
- L'atteinte pulmonaire est marquée cliniquement par une dyspnée et des râles crépitants des bases. L'hypertension artérielle pulmonaire et la pneumopathie interstitielle fibrosante constituent les plus fréquentes des manifestations respiratoires.

- L'atteinte rénale est caractérisée par un syndrome urémohémolytique. Sa gravité a été limitée par l'utilisation des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.
- L'atteinte digestive essentiellement œsophagienne doit être recherchée précocement. En dehors de l'œsophage, l'atteinte du grêle est caractérisée par des épisodes subocclusifs ou de la diarrhée.
- L'atteinte cardiaque, fréquente histologiquement (50 % des cas) est plus rare cliniquement.
- L'atteinte articulaire est marquée par des polyarthralgies inflammatoires et l'atteinte neurologique est plus rare.

La classification clinique des critères diagnostiques de la sclérodermie a été fixée dans le domaine de la recherche par l'American Rheumatism Association (ARA) [1]. Ces critères sont essentiellement cliniques avec une distinction entre les sclérodermies systémiques limitées (sclérodactylie et acrosclérose) et les sclérodermies systémiques diffuses. Le syndrome anciennement nommé « CREST » (Calcinose, Raynaud, œsophagite, Sclérodactylie, Télangiectasie) est la forme la plus fréquente des sclérodermies systémiques limitées. Le syndrome de Sharp avec doigts boudinés et sans sclérose est à part et peut évoluer secondairement vers une sclérodermie.

En pratique et pour un diagnostic plus précoce devant une suspicion clinique de sclérodermie, une capillaroscopie, une recherche des aAc antinucléaires, une radiographie des mains à la recherche des calcifications puis des examens œsophagiens et pulmonaires sont les examens les plus couramment prescrits [2, 3].

1.3. Recherche des autoanticorps

Les différentes spécificités d'aAc antinucléaires observés au cours des sclérodermies (**tableau I**) ont contribué à établir une classification de ces maladies afin de mieux identifier des groupes d'individus avec des signes cliniques, des réponses aux traitements et des pronostics différents. Une association nette a pu être établie d'une part entre les aAc anti-centromère et les syndromes de forme systémique limitée, et d'autre part entre les aAc anti-Scl-70 et les sclérodermies systémiques diffuses. D'autres aAc tels que les aAc anti-ARN polymérase III, anti-PM-Scl, anti-fibrillarine/U3 RNP sont également détectés dans les sclérodermies. Leur sensibilité et leur spécificité varient selon les études. En général un seul type d'aAc est présent [4, 5] mais des cas d'association ont été rapportés [6].

Malgré l'intérêt diagnostique de ces aAc, certains patients souffrant de sclérodermie ne possèdent pas de tels aAc renforçant le fait qu'un résultat négatif n'exclut pas le diagnostic de sclérodermie.

a Service d'immunologie

UF auto-immunité

Centre hospitalier Lyon-Sud – Hospices civils de Lyon

INSERM U851 – UCLB

69495 Pierre-Bénite cedex

* Correspondance

nicole.fabien@chu-lyon.fr

Tableau I – Antigènes cibles des autoanticorps antinucléaires présents au cours des sclérodermies.

Noyau	Cible et fonction
ADN topo-isomérase I (Scl-70)	Protéine de 100 kDa Relaxation de l'ADN compact
Centromères	Protéines de 19-80-140 kDa Attachement fuseau de mitose
ARN polymérase II et III	Protéines de 145 à 220 kDa
U1 SnRNP (small nuclear ribonucleoprotein)	ARN et protéine de 70 kDa, protéine A de 33 kDa, protéine C de 22 kDa
Nucléole	
ARN polymérase I	Protéines de 11 à 210 kDa Transcription ARNr
Fibrillarine / U3-RNP	Protéine de 34 kDa des U3 RNP
PM-Scl	11 protéines de 20 à 110 kDa
NOR-90	Protéines de 90 kDa associées à l'organisateur nucléolaire (<i>human upstream binding factor</i>)
Protéines des RNP nucléolaires	Protéines associées à ARN 7-5A, 7-5B, 7-2S
ARN nucléolaires	ARN 4-6S
Nucléole et autres structures	
To/Th	Protéines de 11 à 210 kDa Transcription ARNr

1.4. Autoanticorps utiles au diagnostic et recherchés en pratique courante

1.4.1. Autoanticorps anti-Scl-70

• Antigène cible

Les aAc anti-« Scl-70 » ont été nommés ainsi car ils ont été découverts chez des patients atteints de sclérodermie. L'antigène cible a été identifié comme de l'ADN topo-isomérase I qui, sous sa forme native, a un poids moléculaire de 100 kDa avec un produit de dégradation de 70 kDa. Les aAc anti-Scl-70 font partie, du fait d'un artefact, des aAc anti-ENA (*extractable nuclear antigen*) car

lors de l'extraction nucléaire, l'ADN topo-isomérase I est protéolysée et se retrouve alors dans l'extrait contenant les antigènes nucléaires solubles du noyau.

La topo-isomérase I est une protéine associée à la matrice nucléaire dans le nucléoplasme, localisée également dans le nucléole et dans les régions d'organisation du nucléole (NOR). La fonction de la topo-isomérase I est de relaxer ou décompacter la chromatine faite d'ADN de sa structure superenroulée en une structure détendue. Cette relaxation permet aux ARN polymérase d'accéder aux séquences à transcrire, ce qui correspond au début de la transcription. L'antigène paraît donc jouer un rôle important dans la réplication de l'ADN. Le clonage et l'expression de la topo-isomérase I humaine recombinante ont été réalisés. Les aAc anti-topo-isomérase I sont plutôt de type IgG et IgA [7]. Les épitopes majoritaires reconnus sont situés du côté C-terminal de la protéine mais surtout au niveau des acides aminés 405 à 484 [8].

• Méthodes de détection

Ces anticorps donnent un aspect typique homogène dit « dépoli » ou flou en immunofluorescence indirecte sur cellules HEP-2. La région chromosomique des cellules en mitose est marquée. Un marquage nucléolaire plutôt de type moucheté peut être également associé (*figure 1*). Différentes méthodes peuvent être utilisées pour identifier ces aAc :

- techniques immunoenzymatiques de type ELISA ou dot, ou techniques Luminex® qui utilisent comme antigènes soit des extraits purifiés contenant des constituants solubilisés de la matrice nucléaire [9], soit de la topo-isomérase I humaine recombinante [10];
 - technique d'immunotransfert avec l'antigène purifié : les aAc anti-Scl 70 reconnaissent des antigènes de poids moléculaire de 100 et 70 kDa correspondant à la protéine native et à son produit de dégradation;
 - technique d'immunodiffusion d'Ouchterlony.
- Ces différentes techniques ont des sensibilités différentes [7, 9, 11].

• Prévalence et signification clinique

Depuis leur découverte en 1986, l'ensemble des études portant sur les aAc anti-Scl-70 sont consensuelles concernant leur spécificité dans les formes diffuses des sclérodermies, bien qu'ils aient été observés dans quelques cas de formes limitées des sclérodermies, et sur leur association à un pronostic plus sévère.

- **Sensibilité (tableau II)** : elle varie de 30 à 70 % dans les formes diffuses et elle très faible dans les formes limitées. Ces valeurs proviennent de l'analyse de l'équipe de Spencer-Green en 1997 sur 497 articles publiés entre 1966 et 1994 [12] et de l'étude de Steen et coll. [13]. La variation de sensibilité serait due principalement aux populations étudiées, géographiquement différentes, avec comme exemple une sensibilité variant de 26 % pour la population australienne à 76 % pour la population thaïlandaise [14]. La fréquence des aAc anti-Scl-70 est significativement plus élevée chez des patients de moins de 50 ans [15]. Ils sont particulièrement associés à certains groupes HLA : DR2 et DR5 chez les sujets de race blanche.

Figure 1 – Fluorescence de type anti-Scl-70.

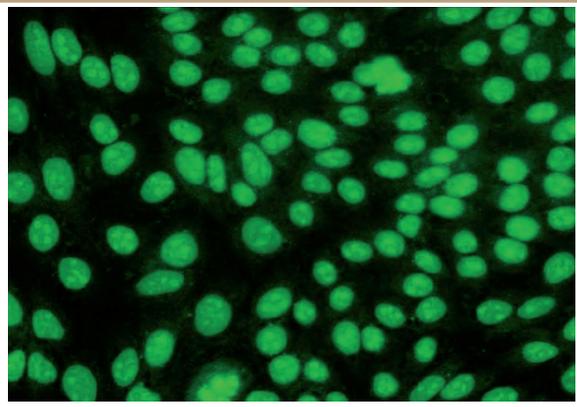


Tableau II – Prévalence des autoanticorps au cours des sclérodermies.

Autoanticorps anti	Prévalence
Topo-isomérase I (Scl-70)	4 à 28,4 % toutes formes confondues 70-76 % formes diffuses 13 % formes limitées 12 % PM/sclérodermie
Centromère	16 à 34 % toutes formes confondues 57-82 % formes limitées 25 % syndrome de Raynaud I 8 % formes diffuses
ARN polymérase I	4-20 % toutes formes confondues 13 % formes diffuses
ARN polymérase II	4-33 % toutes formes confondues
ARN polymérase III	5-23 % toutes formes confondues 6 % formes limitées 45 % formes diffuses
Fibrillarine (U3-RNP)	3,5 à 4,4 % toutes formes confondues 10 % formes limitées 5% formes diffuses
PM-Scl	3 % toutes formes confondues 24 % PM/sclérodermie 5 % DM
NOR 90	Rare
Th/T0 (7-2MRP RNP)	2-10 % toutes formes confondues 8-19 % formes limitées 1-11 % formes diffuses 3 % PM/sclérodermie 3 % syndrome Raynaud
Fibrilline	49 % formes limitées 37 % formes diffuses 35 % syndrome de Sharp
U1-RNP	8 % toutes formes confondues 14 % formes cutanées limitées 3 % formes diffuses
Ku	1-14 % toutes formes confondues 26-55 % PM/sclérodermie

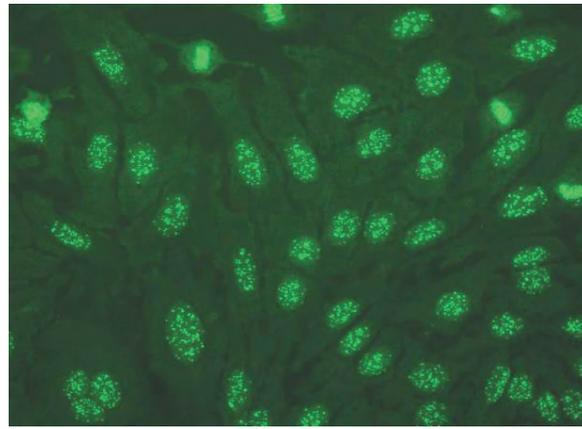
PM : polymyosite ; DM : dermatomyosite.

Le titre des aAc ne semble pas évoluer au cours de la maladie ; ainsi le suivi du titre de ces aAc n'a en théorie aucun intérêt dans le suivi de la maladie [16].

- **Spécificité, valeur prédictive** : la spécificité est de 98 % par comparaison à des groupes de sujets atteints d'autres maladies rhumatismales et s'élève à 99,6 % par comparaison à des groupes contrôles de sujets sains. Ces aAc sont rarement détectés dans les lupus érythémateux systémiques (LES) et les connectivites mixtes [17]. Ils ont une valeur prédictive dans les phénomènes de Raynaud où ils apparaissent avant que la sclérodermie ne se développe. En revanche, aucune valeur prédictive pour les complications cardiaques ou rénales ou la survie des patients n'a été démontrée.

L'association avec certains cancers a été évoquée, notamment avec des cancers pulmonaire, mammaire, œsophagien, utérin, ovarien, prostatique, rénal et avec certaines hémopathies malignes [18].

Figure 2 – Fluorescence de type anti-centromère.



- **Association avec les signes cliniques** : les aAc anti-Scl-70 ont été détectés dans 70 % des fibroses interstitielles pulmonaires et dans les maladies vasculaires périphériques. Ces aAc sont associés à une maladie systémique le plus souvent sévère et sont donc de mauvais pronostic. La présence de ces aAc serait également corrélée aux atteintes cutanées diffuses et aux complications rénales et pourrait être associée à la survenue de cancers [13].

1.4.2. Autoanticorps anti-protéines centromériques

• Antigène cible

Les protéines centromériques sont présentes sur le kinétochore qui correspond à la région centrale des chromosomes, site d'attachement des microtubules pour les cellules en division. Les antigènes cibles des aAc observés dans les sclérodermies correspondent aux protéines CENP-A de 19 kDa, CENP-B de 80 kDa, CENP-C de 140 kDa et « D » [19]. Les centromères jouent un rôle dans le mouvement et la bonne répartition des chromosomes durant la mitose. Ces protéines interagissent avec l'appareil mitotique via les microtubules quand la cellule reste en division.

Les aAc anti-centromère sont usuellement présents à un titre assez élevé et sont de classe IgG, bien souvent IgG1, sauf pour les aAc anti-CENP-C avec une prédominance d'IgM. Les aAc dans la plupart des sérums reconnaissent un épitope majeur au niveau de l'extrémité C-terminale des protéines.

• Méthodes de détection

La technique d'immunofluorescence indirecte sur cellule HEp-2 est utilisée pour dépister ces aAc (figure 2). Cette technique suffit également à les caractériser car leur aspect est très évocateur avec une fluorescence de 30 à 40 grains réguliers sur les noyaux de toutes les cellules à l'interphase, et, en phase mitotique, avec l'alignement des grains le long du fuseau de mitose ou sur la plaque équatoriale. Cependant, en cas de doute, une technique immunoenzymatique de type ELISA ou dot ou une technique Luminex® avec un antigène recombinant [20] ou une technique d'immunotransfert avec des extraits nucléaires de cellules en culture peuvent être utilisées.

• Prévalence et signification clinique

Les aAc anti-centromère ont été décrits dans les sclérodermies systémiques limitées et sont utilisés depuis comme marqueur biologique de cette maladie.

- **Sensibilité (tableau II)** : les variations de sensibilité [12, 13] sont le plus souvent dues aux différences raciales avec 36 % de sensibilité dans la population blanche et 4 % chez les Noirs Américains [21]. La fréquence des aAc est significativement moins élevée chez des patients de moins de 50 ans [15]. Le titre des aAc ne semble pas évoluer au cours de la maladie, ainsi le suivi du titre de ces aAc n'a en théorie aucun intérêt dans le suivi de la maladie [22].

- **Spécificité, valeur prédictive** : la spécificité de ces aAc s'élève à 95 % par comparaison à des patients souffrant d'une autre connectivite et à 99,8 % par comparaison aux sujets sains. De rares cas ont été décrits dans les sclérodermies diffuses [13], mais aussi, en dehors de toute sclérodermie et de tout phénomène de Raynaud, chez des patients atteints de syndrome de Gougerot-Sjögren, de polyarthrite rhumatoïde (PR), de LES, ou d'arthralgies [23, 24]. Les aAc anti-centromère ont également été signalés dans quelques hépatites chroniques actives sans signe de sclérodermie associée. Leur détection chez des malades atteints de syndrome de Raynaud isolé peut être prédictive d'une évolution vers une sclérodermie systémique limitée.

Ces aAc peuvent être également détectés en association avec des aAc anti-mitochondrie de type M2 (E2 PDH) et ce, dans environ 20 % des cirrhoses biliaires primitives qui sont associées le plus souvent à une sclérodermie systémique limitée [25].

- **Association avec les signes cliniques** : les aAc anti-centromère sont de meilleur pronostic par rapport aux aAc anti-Scl-70. L'association avec certains signes cliniques comme l'ischémie « digitale », la calcinose, l'absence de complications rénales, les arthralgies, le syndrome de Raynaud et les télangiectasies a été largement décrite. La fréquence des fibroses pulmonaires interstitielles est aussi plus faible par rapport aux aAc anti-Scl-70 [26]. Génétiquement, les phénotypes associés à la présence d'aAc anti-centromère sont HLA-DR1, -DR4 et -DRW8 [21].

1.4.3. Autoanticorps anti-antigènes nucléolaires

Le nucléole est une structure riche en ARN où s'effectue la synthèse des ribosomes. Trois domaines morphologiques distincts peuvent être définis à l'intérieur du nucléole : un centre fibrillaire ou « core » contenant des ribonucléoprotéines, entouré de composants fibrillaires denses, eux-mêmes entourés de composants granulaires contenant des particules pré-ribosomales [27].

Les aAc anti-nucléolaires détectés par immunofluorescence indirecte ont été mis en évidence dans les années 1960. Leur présence a été largement décrite dans les sclérodermies, plus rarement dans d'autres maladies auto-immunes ou dans certains cancers. La sensibilité des aAc selon les études varie de 7 à 71 % [28] reflétant les différents critères cliniques des sclérodermies et les différents groupes ethniques et les différentes méthodes de détection utili-

sées [29]. Plusieurs antigènes cibles ont été décrits dont l'ARN polymérase de type I, des ribonucléoprotéines telles que les U3-RNP qui sont localisées dans le centre fibrillaire, et les antigènes cibles des aAc anti-PM/Scl situés dans les constituants granulaires.

La présence d'aAc anti-nucléolaires n'est pas spécifique des sclérodermies. En effet sur certaines cellules HEP-2 et en fonction des lots, des fluorescences nucléolaires peuvent être observées avec une fréquence notable mais le plus souvent à titre faible. Ainsi, l'identification de l'antigène cible par une autre technique est indispensable.

1.4.3.1. Autoanticorps anti-ARN polymérase

• Antigène cible

Seule l'ARN polymérase I est située dans le centre fibrillaire du nucléole mais pour simplifier nous évoquerons également dans ce sous-chapitre les ARN polymérase de type II et III situées dans le nucléoplasme. Les ARN polymérase (I, II, III) sont des complexes enzymatiques formés de multiples sous-unités différentes composées de 8 à 14 protéines avec des poids moléculaires différents pour les 2 sous-unités les plus larges : 190 et 120 kDa pour le type I, 220 et 145 kDa pour le type II, 155 et 138 kDa pour le type III.

Le rôle des ARN polymérase est de catalyser la transcription des gènes en ARN à partir de l'ADN chez les eucaryotes. L'ARN polymérase I assure la transcription des gènes qui codent pour les molécules précurseurs des ARN ribosomiaux (rARN). L'ARN polymérase II transcrit les gènes qui codent pour les précurseurs des ARNm et les petits ARN nucléaires hétérogènes ou ARNhn. L'ARN polymérase III assure la synthèse des ARN de transfert et l'ARN-5S des ribosomes. Un nombre important de petits ARN nucléolaires, qui sont souvent associés à des protéines communes comme la fibrillarine, sont codés par des gènes indépendants transcrits par les ARN polymérase II ou III.

Les aAc anti-ARN polymérase de type I ont été décrits en 1982 [30], les aAc anti-types II et III dans les années 1990 [31, 32].

• Méthodes de détection

Par immunofluorescence indirecte sur cellules HEP-2, les aAc anti-ARN polymérase de type I donnent dans les cellules en interphase un aspect nucléolaire moucheté fin, et, dans les cellules en mitose, un marquage ponctué au niveau des régions d'organisation du nucléole et au niveau des chromosomes avec des grains de petite taille. Les aAc anti-ARN polymérase de type III donnent un marquage le plus souvent moucheté parfois associé à un marquage nucléolaire. En raison d'un aspect en immunofluorescence qui n'est pas très typique, ces derniers aAc doivent être recherchés spécifiquement en fonction du contexte clinique [33, 34].

Ces trois types d'aAc ont été caractérisés par des techniques de radio-immunoprécipitation utilisant des polymérase purifiées à partir de cellules tumorales de rat ou de foie de lapin marqués à la ³⁵S-méthionine. Actuellement les techniques de détection sont des immunotransferts utilisant des extraits de cellules HeLa ou HEP-2 ou des techniques de type ELISA utilisant

des antigènes recombinants notamment pour l'ARN polymérase de type III [35].

- **Prévalence et signification clinique**

- **Sensibilité** : la plupart des sérums avec aAc anti-type I présentent aussi des aAc anti-types III ou II [31]. En revanche, les aAc anti-centromère, anti-Scl-70, anti-ARN polymérase ne sont, le plus souvent, pas associés [36]. La fréquence d'HLA-DR4 est significativement plus élevée chez les patients positifs en aAc anti-ARN polymérase que dans les contrôles normaux. Les aAc anti-ARN polymérase de type III sont présents dans 5 à 19 % des sclérodermies. Plus fréquemment détectés dans les formes diffuses, ils seraient associés aux atteintes articulaires, tendineuses et surtout rénales [37].

- **Spécificité, valeur prédictive** : la spécificité de ces aAc semble excellente mis à part 2 % de patients avec LES [38].

- **Association avec les signes cliniques** : les patients présentant des aAc anti-ARN polymérase I, II et III ont un pronostic plus sévère par rapport aux patients présentant des aAc anti-Scl-70 [31]. La mortalité est plus élevée chez les patients avec aAc anti-ARN polymérase I avec 45 % de survie à 5 ans et 30 % à 10 ans par rapport aux aAc anti-Scl-70 avec 80 % de survie à 5 ans et 66 % à 10 ans. La présence de ces aAc est associée à des lésions cutanées plus développées et des complications viscérales surtout cardiaques et rénales [5, 31, 39]. En revanche, on note une fréquence plus faible des fibroses pulmonaires interstitielles, des maladies vasculaires périphériques, des télangiectasies et des myopathies inflammatoires par rapport aux patients avec aAc anti-Scl-70.

1.4.3.2. Autoanticorps anti-fibrillarine/U3-RNP

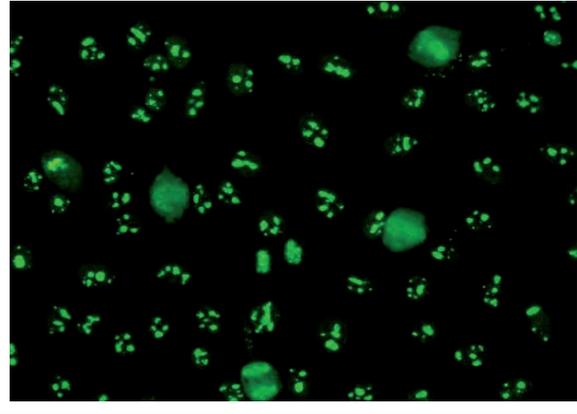
- **Antigène cible**

L'antigène cible est la fibrillarine, protéine localisée dans le composant fibrillaire dense du nucléole. Cette protéine de 34 kDa est associée à l'U3 RNP qui est la plus abondante des petites particules ribonucléoprotéiques nucléolaires (sno-RNP), composée de 217 nucléotides d'ARN et de plusieurs protéines incluant la fibrillarine et 5 protéines non identifiées. La fibrillarine est impliquée dans la maturation des pré-ARNr, la formation des sous-unités ribosomales et l'assemblage des ribosomes. Elle a également un rôle dans le transport des pré-ARNm et des pré-ARNr. La protéine a été complètement séquencée et clonée. Les épitopes reconnus par les aAc anti-fibrillarine sont conformationnels et retrouvés dans la partie C-terminale (entre les acides aminés 257 à 312) avec également une région au sein de la partie N-terminale (les premiers 156 acides aminés). Les aAc sont appelés anti-U3-RNP ou anti-U3SnRNP [40]. La fibrillarine entrant également dans la composition d'autres sno-RNP moins abondantes comme les 8, 13, 14, 15 ou Y RNP, ces sno-RNP sont aussi reconnues par immunoprécipitation par les aAc anti-fibrillarine.

- **Méthodes de détection**

En immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2, les aAc donnent un marquage de type nucléolaire homogène

Figure 3 – Fluorescence de type anti-fibrillarine.



pur avec un aspect dit « clumpy » ou en gros grains et un marquage au niveau des chromosomes condensés dans les cellules en métaphase, sans marquage du nucléoplasme des cellules interphasiques (figure 3).

Ces aAc peuvent être identifiés par une technique d'immunotransfert ou de radio-immunoprécipitation utilisant des nucléoles ou des noyaux purifiés comme source antigénique ou bien par technique de type ELISA utilisant des antigènes recombinants.

- **Prévalence et signification clinique**

- **Sensibilité (tableau II)** : les aAc anti-fibrillarine/U3-RNP sont très rares (4 %) mais plus fréquents chez les Nord-Américains (40 %) [41-43]. Ils sont plus fréquemment détectés chez des sujets jeunes, de sexe masculin [40, 42, 44]. Ils coexistent rarement avec les aAc dirigés contre d'autres antigènes antinucléolaires [40].

- **Spécificité, valeur prédictive** : ces aAc ont été décrits initialement comme spécifiques des sclérodermies en comparaison d'autres maladies rhumatismales, mais depuis ils ont également été détectés dans quelques cas de LES, PR, syndrome de Sharp et syndrome de Gougerot-Sjögren. Ils sont plus fréquents dans les sclérodermies de sévérité moyenne [40, 42, 44].

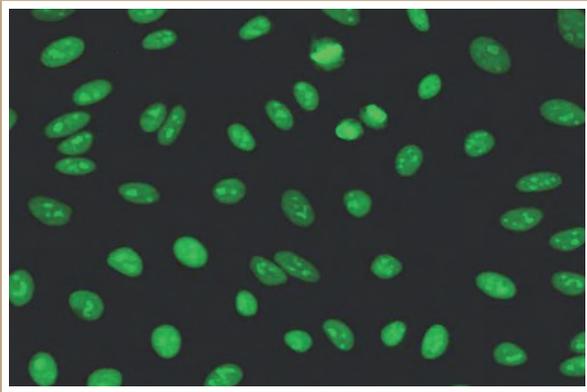
- **Association avec les signes cliniques** : ces aAc sont associés aux cas avec hypertension pulmonaire, complications rénales ou cardiaques, télangiectasies, lésions cutanées diffuses, désordres pigmentaires, calcinose et myosite [40, 43]. Ils sont plus fréquents dans les sclérodermies de sévérité moyenne, chez des sujets jeunes, de sexe masculin et chez des sujets noirs [40, 42, 44].

1.4.3.3. Autoanticorps anti-PM-Scl

- **Antigène cible**

Nommés ainsi car ils ont été décrits dans les sérums de patients atteints d'un syndrome de chevauchement polymyosite/sclérodermie. L'antigène désigné « PM-Scl » est un complexe de 11 à 16 protéines de 20 à 100 kDa. Il est présent de façon enrichie dans les extraits nucléolaires et la détection en microscopie électronique montre qu'il fait partie d'un composant granulaire du nucléole, suggérant son rôle dans la maturation ribosomale et/ou de transport des ribosomes. La cible des aAc correspond majoritairement à trois protéines de 100 kDa, 75 kDa et 37 kDa [45].

Figure 4 – Fluorescence de type anti-PM-Scl.



• Méthodes de détection

En immunofluorescence indirecte sur cellules HEP-2, ces aAc donnent un marquage homogène du nucléole avec le reste du noyau moucheté (figure 4). La première technique de détection classiquement utilisée était l'immunodiffusion d'Ouchterlony. L'immunotransfert révèle 11 bandes positives dont une bande intense au niveau de la protéine de 100 kDa et d'autres bandes entre 68 à 80 kDa et entre 20 à 39 kDa mais cette technique ne permet pas de mettre en évidence des épitopes conformationnels.

Des techniques ELISA et de dot utilisant des antigènes recombinants PM-Scl de 100 et de 75 kDa ou peptide PM1 sont maintenant disponibles [45, 46].

• Prévalence et signification clinique

- **Sensibilité** : 50 % des aAc anti-nucléolaires présents au cours des syndromes de chevauchement sont des anti-PM-Scl [47]. Ils sont présents chez 3 % des patients atteints de sclérodémie systémique.

La plupart des patients n'ont aucun des autres aAc habituellement associés aux sclérodémies ou aux myosites et sont fréquemment porteurs de l'haplotype HLA DR3-DQ2 [48].

- **Spécificité, valeur prédictive** : ces aAc identifient un sous-groupe de patients présentant une myosite, une sclérodémie systémique limitée ou un syndrome de chevauchement des deux maladies [48]. Certains auteurs décrivent une faible évolutivité de ces syndromes [49]. Les aAc anti-PM-Scl sont également décrits dans le syndrome de Sjögren et pourraient être considérés comme des marqueurs prédictifs d'une maladie sous-jacente avec présentations sub-clinique ou atypique de maladies habituellement associées aux sclérodémies [50].

- **Association avec les signes cliniques** : la fréquence des aAc anti-PM-Scl est élevée dans les syndromes de Raynaud isolés, certaines maladies pulmonaires interstitielles et dans les arthrites. Le risque de développer une fibrose pulmonaire en association à une myosite est plus élevé. Les deux signes cliniques les plus fréquents et significativement plus sensibles par rapport aux autres aAc sont la calcinose et l'arthrite. La survie à 10 ans de ces patients est de 100 % et aucune complication viscérale sérieuse n'a été notée, conférant à ces aAc un bon pronostic [48].

1.5. Autoanticorps non recherchés en pratique courante

1.5.1. Autoanticorps anti-Th/To

Ces aAc décrits indépendamment et appelés anti-To, anti-Th ou anti-Twa, reconnaissent le même autoantigène, protéine nucléolaire de 40 kDa de la ribonucléoprotéine-7-2/ MRP-RNP présente dans le composant granulaire de la région fibrillaire du nucléole. Cette protéine a une activité d'endoribonucléase [51].

Leur aspect en immunofluorescence indirecte sur cellules HEP-2 est de type nucléolaire homogène pur. Les techniques d'identification nécessitent pour l'instant des immunotransferts ou des techniques en radio-immunoprécipitation avec des antigènes purifiés ou recombinants. Ainsi elles restent difficilement réalisables en pratique courante. Ces aAc sont détectés chez 4 % des patients atteints de sclérodémie. Leur spécificité est de 99 % par comparaison à d'autres connectivites. Ils sont présents surtout dans les formes moyennement sévères des sclérodémies, et ils sont souvent associés à de l'hypertension, la fibrose pulmonaire, des complications rénales, une atteinte digestive basse, des lésions cutanées plutôt limitées [51-54].

1.5.2. Autoanticorps anti-NOR

L'antigène « NOR 90 » est une protéine de 90 kDa localisée dans la région d'organisation du nucléole ou NOR, région dans laquelle on retrouve également l'antigène Scl-70, la fibrillarine/U3-RNP, et l'ARN polymérase I. Cette région correspond au site où les nucléoles se reforment après la mitose. L'antigène « NOR 90 » se lie au promoteur du gène des ARN ribosomiaux et augmente l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I. Ce facteur de transcription est également connu sous le nom d' « hUBF » (*human upstream binding factor*). Par immunofluorescence indirecte sur cellules HEP-2, ces aAc donnent des aspects caractéristiques au niveau des cellules en métaphase, avec un aspect moucheté du nucléole et des petits dots distincts, aspect caractéristique mais néanmoins proche de celui observé avec les aAc anti-ARN polymérase I. Ces aAc ne sont pas identifiés en routine. La signification clinique de ces aAc est limitée du fait de leur faible prévalence. Ils sont également décrits chez des patients atteints de LES, de PR ou de carcinome hépatocellulaire [55].

1.5.3. Autoanticorps anti-nucléophosmine/B23

La nucléophosmine, phosphoprotéine associée à l'ARN de 37 kDa, est localisée dans le composant granulaire du nucléole. Elle est impliquée dans les stades tardifs de l'assemblage des ribosomes et peut-être dans le transport des ribosomes du nucléole au cytoplasme. Ces aAc, identifiés grâce à une technique d'immunotransfert utilisant une protéine recombinante puis grâce à une technique ELISA, ont été décrits dans 11 % des sclérodémies. Leur aspect en immunofluorescence indirecte sur cellules HEP-2 est de type nucléolaire homogène pur. Leur prévalence serait plus élevée dans l'hypertension pulmonaire [56].

1.6. Autres autoanticorps

Les aAc anti-Ku ont été décrits dans les sclérodermies avec une sensibilité de 14 %, sans association préférentielle avec les formes diffuses ou limitées, et de 26 à 55 % dans les syndromes de chevauchement sclérodermie/polymyosite [57]. Ces aAc donnent un aspect finement moucheté en immunofluorescence indirecte et peuvent être identifiés grâce à une technique de dot, d'immunodiffusion, de radio-immunoprécipitation ou encore une technique ELISA.

D'autres aAc ont été détectés mais ils ne sont pas recherchés en pratique courante en raison de leur faible spécificité ou de leur méthode de détection délicate. Les aAc anti-U11/U12-RNP, présents dans 3 % des patients atteints de sclérodermie, seraient des marqueurs de fibrose pulmonaire [58]. Les aAc anti-U1-RNP sont présents chez 8 % des patients atteints de sclérodermie [58] et les aAc anti-Sm sont très rares. Les aAc anti-cellules endothéliales (28 à 54 %) [59, 60], les aAc anti-annexine V [61], les aAc anti-fibrilline [62], les aAc anti-collagènes I, III, IV, VI, les aAc anti-centrioles et les aAc anti-histones ont été également décrits dans des sclérodermies.

Enfin des aAc dirigés contre le récepteur du *platelet-derived growth factor* (PDGF) ont été récemment découverts. Ces aAc activeraient le récepteur du PDGF entraînant ainsi l'expression du gène codant pour le collagène. Le test d'identification de ces aAc qui est un test fonctionnel de mesure de la production des radicaux libres après incubation des sérums avec des fibroblastes de souris exprimant ou non des récepteurs du PDGF est trop complexe pour permettre de rechercher ces aAc en pratique courante [63].

2. Myopathies inflammatoires auto-immunes

2.1. Introduction

Les myosites « auto-immunes » font partie du groupe des myopathies inflammatoires. Maladies systémiques, caractérisées par des lésions inflammatoires de différents muscles (myosite), de la peau et d'autres tissus, leur physiopathologie est complexe mais, comme pour les sclérodermies, la présence d'aAc antinucléaires de spécificité variée permet d'étayer le diagnostic et permet d'individualiser différentes entités cliniques [64].

2.2. Diagnostic clinique

Le diagnostic des myosites « auto-immunes », i.e. dermatomyosite et polymyosite, est basé historiquement sur les critères proposés par Bohan, Peter et al. [65].

Le diagnostic de polymyosite est affirmé avec certitude par la présence d'au moins 4 de ces critères détaillés ci-dessous. Le diagnostic de dermatomyosite nécessite en plus la présence des lésions dermatologiques.

1. Déficit moteur proximal symétrique, progressif avec ou sans dysphagie ou atteinte des muscles respiratoires. Les muscles atteints sont le siège d'une atrophie, d'une faiblesse et de douleurs spontanées ou à la palpation. Le déficit musculaire touche les muscles proximaux (ceintures scapulaire et pelvienne) avec d'autres territoires touchés (musculature para vertébrale lombaire, myo-

carde, muscles respiratoires, carrefour aéropharyngé). D'autres symptômes peuvent être associés tels que : arthrite, fibrose pulmonaire, adénopathies, splénomégalie, tachycardie, péricardite, névralgies, hypoesthésies, acrocyanose, et parfois syndrome de Raynaud.

2. Elévation sérique des enzymes musculaires, surtout les CPK, mais aussi élévation des transaminases qui peut être un point d'appel, LDH, aldolase.

3. Triade caractéristique à l'électromyogramme : potentiel moteur court et polyphasique, fibrillation et décharge répétée à haute fréquence.

4. Biopsie musculaire caractéristique : nécrose des fibres musculaires, phagocytose, foyers de régénération avec basophiles, distribution péri fasciculaire de l'atrophie, exsudats inflammatoires interstitiels.

5. Lésions dermatologiques précises : érythème péri-orbitaire en lunette prédominant sur les paupières supérieures et/ou érythème douloureux, squameux de la sertissure des ongles ou de la face d'extension des articulations.

Cependant la classification selon les critères de Bohan a été remise en cause et d'autres critères ont été proposés par le Consensus d'experts américano-européen lors du 119th European Neuromuscular Centre International Workshop [66]. La classification des myopathies inflammatoires s'est affinée avec l'inclusion d'autres critères cliniques comme l'atteinte isolée au muscle ou non, l'association à un cancer, des critères histopathologiques et des critères biologiques dont la détection d'aAc. Ainsi, cette nouvelle classification permet la distinction entre les dermatomyosites, les polymyosites et les autres myopathies inflammatoires ou génétiques (myosites à inclusion, dystrophie musculaire des ceintures et myopathies génétiques) mais aussi avec les myosites de chevauchement définies par la présence d'aAc [57]. Une étude rétrospective canadienne fait état de quatre catégories de myopathies inflammatoires primitives : les dermatomyosites pures, les polymyosites pures, les myosites associées aux cancers et les myosites de « chevauchement » [67].

Le syndrome dit des anti-synthétases (ASS) a été aussi individualisé mais reste discuté [68-70]. Ce syndrome est caractérisé par l'association d'une myosite (polymyosite ou dermatomyosite), d'une polyarthrite généralement non érosive (90 %), d'un syndrome de Raynaud (60 %), d'une pneumopathie interstitielle (50 à 100 %), d'une hyperkératose fissuraire et desquamante des mains ou « mains de mécanicien », de fièvre et d'aAc anti-synthétases [71, 72]. Ce syndrome est fréquemment associé à d'autres maladies auto-immunes : PR, LES, syndrome de Gougerot-Sjögren (27 % des cas) ou sclérodermie systémique (30 % des cas) [70, 73-75]. Polymyosite et dermatomyosite associées à la sclérodermie constituent des syndromes de chevauchement dans lesquels peuvent être détectés des aAc anti-nucléoles de type anti-PM-Sci. La polymyosite constitue la myopathie inflammatoire la plus fréquente dans ces syndromes de chevauchement, observée dans 77 % *versus* 23 % des cas pour la dermatomyosite.

La dermatomyosite et la polymyosite diffèrent d'un point de vue histologique :

- la **dermatomyosite** est caractérisée par des infiltrats lymphocytaires B et T CD4+ en zone périvasculaire, des dépôts d'IgG, IgM, C3 et C5b9 au niveau des vaisseaux de petits calibres, des lésions endothéliales, et une microangiopathie avec thrombose et nécrose des capillaires et des artérioles ;

- la **polymyosite** est caractérisée par des infiltrats de lymphocytes T CD8+ et de macrophages prédominants dans les régions endomysiales sans tropisme vasculaire, autour des fibres musculaires responsables d'un processus cytotoxique à médiation cellulaire, par l'expression de molécules HLA de classe I par les myocytes, et par l'absence de microangiopathie, de dépôts d'immunoglobulines, de complexes immuns, et de lésions ischémiques myocytaires.

La polymyosite est observée à tous les âges, mais surtout chez l'adulte. La dermatomyosite, plus fréquente que la polymyosite, est observée aussi à tous les âges mais avec deux pics : 10-20 ans et 40-60 ans. La dermatomyosite de l'adulte est fréquemment associée à une tumeur maligne (cancer bronchique à petites cellules, cancer de l'œsophage, de l'estomac, du foie, de la sphère génitale...). La mort survient souvent par troubles des muscles respiratoires ou défaillance cardiaque.

2.3. Recherche des autoanticorps

Deux groupes d'aAc peuvent être distingués : aAc dits « spécifiques » des myosites (anti-aminoacyl-ARNt-

synthétases, anti-SRP, anti-Mi-2) et aAc associés aux myosites (anti-PM-Scl, anti-Ku, anti-U1, U2, U3, U5 RNP, anti-fibrillarine, anti-SS-A/Ro, anti-centromère, anti-Scl-70).

2.3.1. Autoanticorps anti-aminoacyl-ARNt-synthétases

Les cibles de ces aAc correspondent à différents aminoacyl-ARNt-synthétases, enzymes qui permettent la liaison de chaque acide aminé à son ARNt lors de la synthèse protidique. Les aminoacyl-ARNt-synthétases sont groupées en deux classes en fonction de leur structure (type I ou type II), chaque classe étant elle-même divisée en sous-classes (Ia, Ib...). Chaque classe comprend dix synthétases.

Les aAc anti-aminoacyl-ARNt-synthétases décrits sont détectés en immunofluorescence indirecte sur cellules HEP-2 [76] puis identifiés par différentes techniques (*tableau III*).

Les patients atteints de myosite possèdent majoritairement les aAc anti-Jo-1, avec 25 % des patients atteints de polymyosite (19-33 %) et 5-10 % des patients atteints de dermatomyosite [77]. Tous les autres aAc réunis ne sont présents que dans moins de 5 % des myosites. Un même patient ne présente que très rarement différents types d'aAc anti-ARNt-synthétase mais ceci doit être conforté sur de plus larges cohortes de patients. La spécificité des aAc anti-Jo-1 est de 99 % surtout pour

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

Cible	Aspect en IFI sur cellules HEP-2	Méthodes d'identification	Sensibilité
Jo-1 : histidyl-ARNt-synthétase	Fines granulations cytoplasmiques (<i>figure 5</i>)	ELISA Luminex® Immunodiffusion Dot	20-25 %
PL-7 : thréonyl-ARNt-synthétase PL-12 : alanine-ARNt-synthétase	Fluorescence cytoplasmique diffuse, +/- homogène, +/- dense de l'ensemble des cellules (<i>figure 6</i>)	Dot Immunodiffusion (PL-7) Radio-immunoprécipitation	< 5 %
OJ : isoleucyl-ARNt synthétase EJ : glycy-ARNt-synthétase	Fluorescence cytoplasmique diffuse, +/- homogène, +/- dense de l'ensemble des cellules	Dot Radio-immunoprécipitation	< 2 %
KS : asparaginy-ARNt-synthétase	?	Radio-immunoprécipitation	< 1 %

Figure 5 – Fluorescence de type anti-Jo-1.

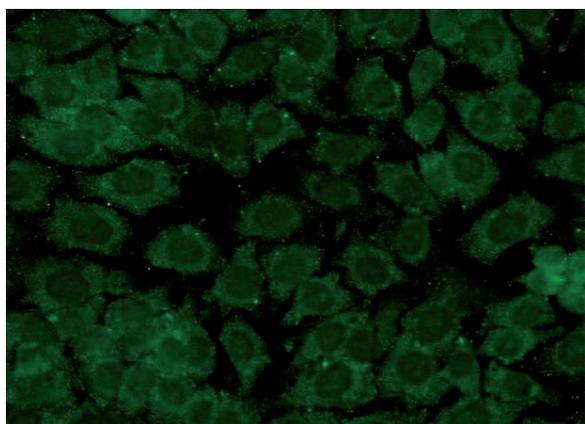
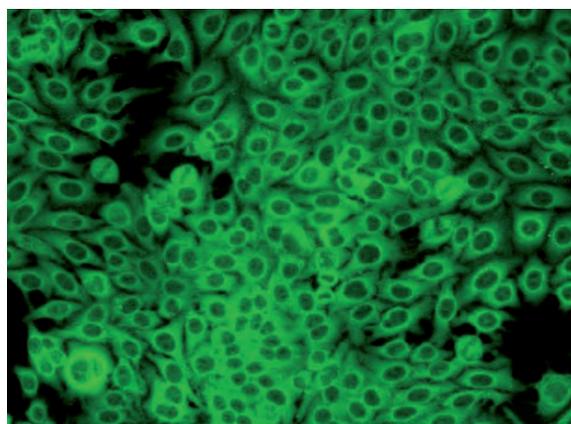


Figure 6 – Fluorescence de type anti-PL-7.



les titres élevés [78]. Ils constituent un marqueur de polymyosite avec fibrose pulmonaire interstitielle et sont le plus souvent associés aux signes cliniques suivants : arthrites, fièvre et syndrome de Raynaud.

Les aAc anti-OJ, très rares, sont détectés le plus souvent chez des patients atteints de myosites avec maladie pulmonaire interstitielle [79]. Les aAc anti-KS sont également très rares et ont été plutôt détectés chez des patients atteints de maladie pulmonaire interstitielle que chez des patients atteints de myosite [80]. Très peu d'études ont été réalisées sur l'association symptômes cliniques et présence d'aAc anti-PL-7 et PL-12.

La spécificité de l'ensemble de ces aAc n'est pas totale car ils ont été décrits ponctuellement dans d'autres maladies ; néanmoins leur caractère prédictif doit être encore évalué avant de parler de faux positifs.

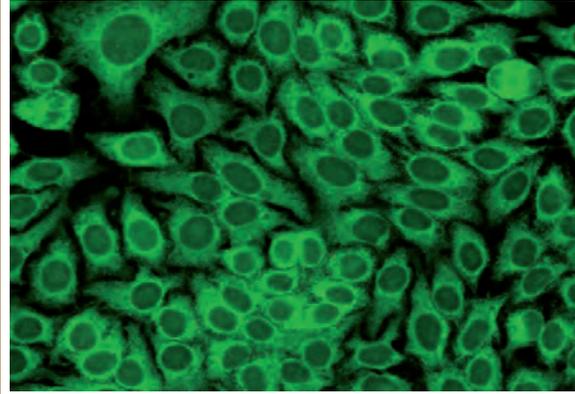
2.3.2. Autoanticorps anti-SRP

Le complexe protéique SRP (*signal recognition particle*) est constitué par un petit ARN 7S (300 nucléotides) et par 6 protéines (nommées selon leurs poids moléculaires : SRP9, 14, 19, 54, 68 et 72). L'ARN est associé à 2 hétérodimères (SRP9/14 ; SRP68/72) et 2 protéines (SRP19 ; SRP54). Ce complexe régule la translocation et permet le passage des protéines synthétisées par le ribosome vers le système réticuloendoplasmique durant la synthèse protéique. La cible majoritaire des aAc est la protéine SRP 54.

Les aAc anti-SRP sont détectés en immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2 (*figure 7*). Ils marquent de façon intense le cytoplasme avec un aspect différent de celui observé avec les aAc anti-Jo-1 et les autres aAc anti-ARNt-synthétases. Sur les coupes de foie et d'estomac de rat ou de souris le marquage est en revanche 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, on observe un marquage homogène à l'exception des îlots (Pr R.L Humbel, LLIP, Luxembourg). Ces aAc sont identifiables par une technique de radio-immunoprécipitation avec un extrait de cellules HeLa marquées au ³⁵S ou ³²P ou par une technique de dot utilisant un antigène humain recombinant.

Détectés dans 5 % environ des myopathies inflammatoires idiopathiques, fréquemment associées à une myocardite, ces aAc sont souvent associés à l'haplotype HLA-DR5, -DRw52, -DQA1*0301. Les enzymes musculaires, créatine kinase et aldolase, sont fortement augmentées dans le sérum. Histologiquement, la myopathie avec aAc anti-SRP est caractérisée par une myopathie nécrosante active avec peu ou pas d'inflammation. Les patients présentent également une atteinte musculaire sévère caractérisée par une faiblesse musculaire à prédominance proximale atteignant les membres supérieurs et inférieurs. Différents travaux présentent ces aAc comme des éléments de mauvais pronostic avec 25 % de survie à 5 ans [81-83]. Ces aAc ont été également décrits chez des patients atteints de sclérodermies [84].

Figure 7 – Fluorescence de type anti-SRP.



2.3.3. Autres autoanticorps

Dans la dermatomyosite surtout, des aAc anti-Mi-1 et Mi-2 ont été décrits dans 4 à 18 % des cas mais les aAc anti-Mi1 ne sont pas spécifiques de la maladie [85]. Ces aAc anti-Mi-1 sont dirigés contre les IgG bovines. Les aAc anti-Mi-2 sont dirigés contre une hélicase impliquée dans l'activation de la transcription. Ils donnent un aspect moucheté fin en immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2 et sont identifiés par dot, immunodiffusion ou ELISA. Quand ils sont associés à une forme de dermatomyosite très corticosensible, ils sont de bon pronostic. Ils sont souvent associés à HLA-DR7 [85-87].

Des aAc dirigés contre l'antigène CADM-140 (*clinically amyopathic dermatomyositis*), identifiables par immunotransfert ou radio-immunoprécipitation, ont été détectés dans 19 % des dermatomyosites et 53 % des cancers associés aux dermatomyosites [88]. La présence d'aAc anti-p155/140, décrits dans 11 % des myosites, doit également évoquer l'existence d'un cancer associé aux myosites.

Enfin, des aAc anti-nucléoles de type anti-fibrillarine (14 %) ont également été décrits dans ces maladies ainsi que des aAc anti-SS-A/Ro (25 à 30 %), des aAc anti-Ku (4-23 %) et des aAc anti-U1RNP (15 %) [72].

3. Conclusion

Les différents aAc présents au cours des sclérodermies et des myopathies inflammatoires idiopathiques avec composante immunologique ont contribué à établir une meilleure classification de ces maladies. Il reste à mieux définir si certains de ces aAc peuvent être considérés comme des marqueurs prédictifs ou pronostiques et/ou comme des critères pour juger de l'évolutivité de la maladie sous traitement. Parallèlement, le problème des discordances entre immunofluorescence négative et/ou non typique et identification positive par d'autres techniques persiste pour différents aAc. Ainsi, la sensibilité et la spécificité des techniques de détection doivent être améliorées en raison de l'utilité de ces aAc dans le diagnostic de ces maladies en pratique courante.

Références

- [1] Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee, Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23(5):581-90.
- [2] Fabien N, Rousset H, [Immunological diagnosis of scleroderma]. *Pathol Biol (Paris)* 2002;50(4):243-55.
- [3] Mouthon L, Garcia De La Pena-Lefebvre P, Chanseaud Y, et al. [Pathogenesis of systemic scleroderma: immunological aspects]. *Ann Med Interne (Paris)* 2002;153(3):167-78.
- [4] Johanet C, Agostini MM, Vayssairat M, et al. [Anti-Scl-70 and anti-centromere autoantibodies. Biological markers of 2 forms of systemic scleroderma]. *Presse Med* 1989;18(5):207-11.
- [5] Bunn CC, Denton CP, Shi-Wen X, et al. Anti-RNA polymerases and other autoantibody specificities in systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1998;37(1):15-20.
- [6] Harvey GR, Rands AL, McHugh NJ. Anti-RNA polymerase antibodies in systemic sclerosis (SSc): association with anti-topoisomerase I antibodies and identification of autoreactive subunits of RNA polymerase II. *Clin Exp Immunol* 1996;105(3):468-74.
- [7] Hildebrandt S, Weiner E, Senecal JL, et al. The IgG, IgM, and IgA isotypes of anti-topoisomerase I and anticentromere autoantibodies. *Arthritis Rheum* 1990;33(5):724-7.
- [8] Meesters TM, Hoet M, van den Hoogen FH, et al. Analysis of an immunodominant epitope of topoisomerase I in patients with systemic sclerosis. *Mol Biol Rep* 1992;16(2):117-23.
- [9] Tsay GJ, Fann RH, Hwang J. Specificity of anti-Scl-70 antibodies in scleroderma: increased sensitivity of detection using purified DNA topoisomerase I from calf thymus. *J Rheumatol* 1990;17(10):1314-9.
- [10] Verheijen R, Van den Hoogen F, Beijer R, et al. A recombinant topoisomerase I used for autoantibody detection in sera from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1990;80(1):38-43.
- [11] Kuwana M, Medsger TA, Jr., Wright TM. Detection of anti-DNA topoisomerase I antibody by an enzyme-linked immunosorbent assay using overlapping recombinant polypeptides. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76(3):266-78.
- [12] Spencer-Green G, Alter D, Welch HG. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies. *Am J Med* 1997;103(3):242-8.
- [13] Steen VD, Powell DL, Medsger TA, Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1988;31(2):196-203.
- [14] Kuwana M, Kaburaki J, Arnett FC, et al. Influence of ethnic background on clinical and serologic features in patients with systemic sclerosis and anti-DNA topoisomerase I antibody. *Arthritis Rheum* 1999;42(3):465-74.
- [15] Kyndt X, Launay D, Hebbar M, et al. [Influence of age on the clinical and biological characteristics of systemic scleroderma]. *Rev Med Interne* 1999;20(12):1088-92.
- [16] Vazquez-Abad D, Russell CA, Cusick SM, et al. Longitudinal study of anticentromere and antitopoisomerase-I isotypes. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;74(3):257-70.
- [17] Aeschlimann A, Meyer O, Bourgeois P, et al. Anti-Scl-70 antibodies detected by immunoblotting in progressive systemic sclerosis: specificity and clinical correlations. *Ann Rheum Dis* 1989;48(12):992-7.
- [18] Kyndt X, Hebbar M, Queyrel V, et al. [Systemic scleroderma and cancer. Search for predictive factors of cancer in 123 patients with scleroderma]. *Rev Med Interne* 1997;18(7):528-32.
- [19] Muro Y, Sugimoto K, Okazaki T, et al. The heterogeneity of anticentromere antibodies in immunoblotting analysis. *J Rheumatol* 1990;17(8):1042-7.
- [20] Vazquez-Abad D, Wallace S, Senecal JL, et al. Anticentromere autoantibodies. Evaluation of an ELISA using recombinant fusion protein CENP-B as antigen. *Arthritis Rheum* 1994;37(2):248-52.
- [21] Genth E, Mierau R, Genetzky P, et al. Immunogenetic associations of scleroderma-related antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1990;33(5):657-65.
- [22] Hildebrandt S, Jackh G, Weber S, et al. A long-term longitudinal isotypic study of anti-topoisomerase I autoantibodies. *Rheumatol Int* 1993;12(6):231-4.
- [23] Zuber M, Gotzen R, Filler I. Clinical correlation of anticentromere antibodies. *Clin Rheumatol* 1994;13(3):427-32.
- [24] Tubach F, Hayem G, Elias A, et al. Anticentromere antibodies in rheumatologic practice are not consistently associated with scleroderma. *Rev Rhum Engl Ed* 1997;64(6):362-7.
- [25] Akimoto S, Ishikawa O, Muro Y, et al. Clinical and immunological characterization of patients with systemic sclerosis overlapping primary biliary cirrhosis: a comparison with patients with systemic sclerosis alone. *J Dermatol* 1999;26(1):18-22.
- [26] Vlachoyiannopoulos PG, Drosos AA, Wiik A, et al. Patients with anticentromere antibodies, clinical features, diagnoses and evolution. *Br J Rheumatol* 1993;32(4):297-301.
- [27] Goetz J, Conduite à tenir devant une fluorescence nucléolaire. *Rev Fr Lab* 2008;404bis:45-7.
- [28] Picillo U, Migliaresi S, Vatti M, et al. Demographic differences in the frequencies of scleroderma-related autoantibodies. *Arthritis Rheum* 1993;36(9):1332-4.
- [29] Reveille JD, Durban E, Goldstein R, et al. Racial differences in the frequencies of scleroderma-related autoantibodies. *Arthritis Rheum* 1992;35(2):216-8.
- [30] Stetler DA, Rose KM, Wenger ME, et al. Antibodies to distinct polypeptides of RNA polymerase I in sera from patients with rheumatic autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(23):7499-503.
- [31] Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, et al. Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1993;91(4):1399-404.
- [32] Hirakata M, Okano Y, Pati U, et al. Identification of autoantibodies to RNA polymerase II. Occurrence in systemic sclerosis and association with autoantibodies to RNA polymerases I and III. *J Clin Invest* 1993;91(6):2665-72.
- [33] Yamasaki Y, Honkanen-Scott M, Hernandez L, et al. Nucleolar staining cannot be used as a screening test for the scleroderma marker anti-RNA polymerase I/III antibodies. *Arthritis Rheum* 2006;54(9):3051-6.
- [34] Santiago M, Baron M, Hudson M, et al. Antibodies to RNA polymerase III in systemic sclerosis detected by ELISA. *J Rheumatol* 2007;34(7):1528-34.
- [35] Parker JC, Burlingame RW, Webb TT, et al. Anti-RNA polymerase III antibodies in patients with systemic sclerosis detected by indirect immunofluorescence and ELISA. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(7):976-9.
- [36] Ferri C, Bernini L, Cecchetti R, et al. Cutaneous and serologic subsets of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1991;18(12):1826-32.
- [37] Meyer O, De Chaisemartin L, Nicaise-Roland P, et al. Anti-RNA polymerase III antibody prevalence and associated clinical manifestations in a large series of French patients with systemic sclerosis: a cross-sectional study. *J Rheumatol* 2010;37(1):125-30.
- [38] Satoh M, Ajmani AK, Ogasawara T, et al. Autoantibodies to RNA polymerase II are common in systemic lupus erythematosus and overlap syndrome. Specific recognition of the phosphorylated (IIo) form by a subset of human sera. *J Clin Invest* 1994;94(5):1981-9.
- [39] Harvey GR, Butts S, Rands AL, et al. Clinical and serological associations with anti-RNA polymerase antibodies in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1999;117(2):395-402.
- [40] Okano Y, Steen VD, Medsger TA, Jr. Autoantibody to U3 nucleolar ribonucleoprotein (fibrillar) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1992;35(1):95-100.
- [41] Takeuchi K, Turley SJ, Tan EM, et al. Analysis of the autoantibody response to fibrillar in human disease and murine models of autoimmunity. *J Immunol* 1995;154(2):961-71.
- [42] Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, et al. Racial differences in the distribution of systemic sclerosis-related serum antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1994;37(6):902-6.
- [43] Tormey VJ, Bunn CC, Denton CP, et al. Anti-fibrillar antibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(10):1157-62.
- [44] Arnett FC, Reveille JD, Goldstein R, et al. Autoantibodies to fibrillar in systemic sclerosis (scleroderma). An immunogenetic,

- serologic, and clinical analysis. *Arthritis Rheum* 1996;39(7):1151-60.
- [45] Ge Q, Wu Y, Trieu EP, et al. Analysis of the specificity of anti-PM-Scl autoantibodies. *Arthritis Rheum* 1994;37(10):1445-52.
- [46] Mahler M, Fritzler MJ. PM1-Alpha ELISA: the assay of choice for the detection of anti-PM/Scl autoantibodies? *Autoimmun Rev* 2009;8(5):373-8.
- [47] Hietarinta M, Meyer O, Haim T, et al. Antinuclear and antinucleolar antibodies in patients with scleroderma-polymyositis overlap syndrome. *Br J Rheumatol* 1996;35(12):1326-7.
- [48] Oddis CV, Okano Y, Rudert WA, et al. Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl. Clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum* 1992;35(10):1211-7.
- [49] Gaudin C, Fortenfant F, Adoue D, et al. [Anti PM-Scl antibodies. Study of prevalence and of meaning]. *Rev Med Interne* 2006;27(9):665-70.
- [50] Vandergheynst F, Ocmant A, Sordet C, et al. Anti-PM/Scl antibodies in connective tissue disease: Clinical and biological assessment of 14 patients. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24(2):129-33.
- [51] Okano Y, Medsger TA, Jr. Autoantibody to Th ribonucleoprotein (nucleolar 7-2 RNA protein particle) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990;33(12):1822-8.
- [52] Falkner D, Wilson J, Medsger TA, Jr., et al. HLA and clinical associations in systemic sclerosis patients with anti-Th/To antibodies. *Arthritis Rheum* 1998;41(1):74-80.
- [53] Mitri GM, Lucas M, Fertig N, et al. A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* 2003;48(1):203-9.
- [54] Fischer A, Pfalzgraf FJ, Feghali-Bostwick CA, et al. Anti-Th/To-positivity in a cohort of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2006;33(8):1600-5.
- [55] Imai H, Fritzler MJ, Neri R, et al. Immunocytochemical characterization of human NOR-90 (upstream binding factor) and associated antigens reactive with autoimmune sera. Two MR forms of NOR-90/hUBF autoantigens. *Mol Biol Rep* 1994;19(2):115-24.
- [56] Ulanet DB, Wigley FM, Gelber AC, et al. Autoantibodies against B23, a nucleolar phosphoprotein, occur in scleroderma and are associated with pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum* 2003;49(1):85-92.
- [57] Benveniste O, Dubourg O, Herson S. New classifications and pathophysiology of the inflammatory myopathies. *Rev Med Interne* 2007;28(9):603-12.
- [58] Fertig N, Domsic RT, Rodriguez-Reyna T, et al. Anti-U11/U12 RNP antibodies in systemic sclerosis: a new serologic marker associated with pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009;61(7):958-65.
- [59] Negi VS, Tripathy NK, Misra R, et al. Antiendothelial cell antibodies in scleroderma correlate with severe digital ischemia and pulmonary arterial hypertension. *J Rheumatol* 1998;25(3):462-6.
- [60] Ihn H, Sato S, Fujimoto M, et al. Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc): association with pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 2000;119(1):203-9.
- [61] Sugiura K, Muro Y. Anti-annexin V antibodies and digital ischemia in patients with scleroderma. *J Rheumatol* 1999;26(10):2168-72.
- [62] Tan FK, Arnett FC, Reveille JD, et al. Autoantibodies to fibrillin 1 in systemic sclerosis: ethnic differences in antigen recognition and lack of correlation with specific clinical features or HLA alleles. *Arthritis Rheum* 2000;43(11):2464-71.
- [63] Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354(25):2667-76.
- [64] Sordet C, Goetz J, Sibilia J. Contribution of autoantibodies to the diagnosis and nosology of inflammatory muscle disease. *Joint Bone Spine* 2006;73(6):646-54.
- [65] Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292(8):403-7.
- [66] 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(5):337-45.
- [67] 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(4):231-49.
- [68] Bernstein RM, Morgan SH, Chapman J, et al. Anti-Jo-1 antibody: a marker for myositis with interstitial lung disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;289(6438):151-2.
- [69] Marguerie C, Bunn CC, Beynon HL, et al. Polymyositis, pulmonary fibrosis and autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Q J Med* 1990;77(282):1019-38.
- [70] Imbert-Masseau A, Hamidou M, Agard C, et al. Antisynthetase syndrome. *Joint Bone Spine* 2003;70(3):161-8.
- [71] Nishikai M, Reichlin M. Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis and dermatomyositis. Characterization of the Jo-1 antibody system. *Arthritis Rheum* 1980;23(8):881-8.
- [72] Targoff IN. Immune manifestations of inflammatory muscle disease. *Rheum Dis Clin North Am* 1994;20(4):857-80.
- [73] Love LA, Leff RL, Fraser DD, et al. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)* 1991;70(6):360-74.
- [74] Hirakata M, Mimori T, Akizuki M, et al. Autoantibodies to small nuclear and cytoplasmic ribonucleoproteins in Japanese patients with inflammatory muscle disease. *Arthritis Rheum* 1992;35(4):449-56.
- [75] Hausmanowa-Petrusewicz I, Kowalska-Oledzka E, Miller FW, et al. Clinical, serologic, and immunogenetic features in Polish patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum* 1997;40(7):1257-66.
- [76] Krebs M, Evrard B, Espinouze T, et al. Dense cytoplasmic fluorescence on HEp-2 cells: do not overlook anti-PL. *Pathol Biol (Paris)* 2008;56(1):15-20.
- [77] Zampieri S, Ghirardello A, Iaccarino L, et al. Anti-Jo-1 antibodies. *Autoimmunity* 2005;38(1):73-8.
- [78] Gomard-Menesson 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.
- [79] Sato S, Kuwana M, Hirakata M. Clinical characteristics of Japanese patients with anti-OJ (anti-isoleucyl-tRNA synthetase) autoantibodies. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46(5):842-5.
- [80] 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(4):1295-303.
- [81] 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(4):420-8.
- [82] 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(3):389-95.
- [83] 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(5):334-6.
- [84] Kao AH, Lacomis D, Lucas M, et al. Anti-signal recognition particle autoantibody in patients with and patients without idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum* 2004;50(1):209-15.
- [85] Targoff IN, Reichlin M. The association between Mi-2 antibodies and dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 1985;28(7):796-803.
- [86] Ghirardello A, Zampieri S, Iaccarino L, et al. Anti-Mi-2 antibodies. *Autoimmunity* 2005;38(1):79-83.
- [87] Brouwer R, Hengstman GJ, Vree Egberts W, et al. Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis* 2001;60(2):116-23.
- [88] 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(5):1571-6.

Anticorps anti-centromère : résultats discordants

Daniela Lakomy^a, René-Louis Humbel^b, Nils-Olivier Olsson^{a,*}

1. Introduction

Décrits pour la première fois par Moroi en 1980 [1], les anticorps anti-centromère (ACA) sont des marqueurs classiques des sclérodermies systémiques. Leur mise en évidence par immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules HEp-2 est facile : dans la très grande majorité des cas ils donnent des aspects caractéristiques avec une vingtaine de grains de taille moyenne et régulière, disséminés dans les noyaux des cellules en interphase, et alignés sur la plaque équatoriale des cellules en métaphase (*figure 2 de l'article de Nicole Fabien*). Les trois principales cibles antigéniques des ACA sont des protéines constitutives du kinétochore : CENP-A (19 kDa), CENP-B (80 kDa) et CENP-C (140 kDa) [2]. La plupart des sérums ACA positifs reconnaissent une ou plusieurs de ces trois protéines. Une minorité de sérums reconnaissent d'autres protéines constitutives du kinétochore : CENP-D (47 kDa) [3], CENP-G, CENP-H ou CENP-I. D'autres protéines transitoirement associées au kinétochore pendant la division cellulaire, CENP-E et CENP-F [4], sont reconnues par le sérum de certains patients, mais ces anticorps sont beaucoup plus rares et donnent sur HEp-2 des aspects de fluorescence très différents (MSA2, MSA3). L'identification de ces protéines a permis de les utiliser, sous forme native ou recombinante, pour analyser la spécificité des sérums. La première de ces protéines produites sous forme recombinante a été CENP-B [5, 6], et elle s'est avérée être reconnue par presque tous les sérums ACA positifs [7].

Cette protéine CENP-B est utilisée dans de nombreux réactifs pour le dépistage ou la caractérisation des ACA. Certains réactifs utilisent comme préparation antigénique un mélange des protéines CENP-B et CENP-A (CENP-A/B). Contrairement à d'autres anticorps antinucléaires, il n'est pas nécessaire d'utiliser ces réactifs en deuxième intention pour confirmer ou caractériser des aspects de fluorescence, tant ceux donnés par les ACA sont, dans la très grande majorité des cas, caractéristiques. Cependant l'utilisation de plus en plus répandue de techniques

multiplex, de type immunodot ou Luminex[®], pour caractériser les ANA dépistés en première intention par IFI sur HEp-2 a conduit à réaliser de nombreuses recherches d'anticorps anti-CENP-B ou anti-CENP-A/B. Cette démarche aboutit parfois à des résultats discordants : soit ces spécificités ne sont pas retrouvées dans des sérums donnant des aspects d'ACA caractéristiques en IFI, soit, à l'inverse, des résultats positifs sont obtenus avec des sérums qui ne donnent pas d'aspect d'ACA en IFI. Nous avons tenté d'analyser ces discordances

2. Matériel et méthodes

Une recherche rétrospective de résultats discordants dans la mise en évidence d'ACA a été effectuée dans les bases de données de plusieurs laboratoires du GEAI. Deux types de discordances ont été recherchés :

- **type A** : aspects de fluorescence typiques d'ACA sur HEp-2, associés à un résultat négatif avec (au moins) un test utilisant CENP-B ou un mélange CENP-A/B comme préparation antigénique ;
- **type B** : résultat positif avec (au moins) un test utilisant CENP-B ou CENP-A/B comme préparation antigénique, associé à l'absence d'aspect caractéristique d'ACA sur HEp-2.

Les lames d'HEp-2 et les conjugués utilisés dans les centres participants provenaient de différents fournisseurs : EuroImmuno / Bio-Advance, ImmunoConcepts / Eurobio, Kallestad[™] / Bio-Rad, Zeus / InGen ou préparations « maison ». De même les techniques utilisées en deuxième intention pour caractériser les ANA étaient variées : dot (Dot ENA D-tek, Inno-lia[™] d'Innogenetics/InGen), ELISA (Varelisa[™]), Luminex[®] (AtheNA Multi-Lyte[®] ANA III Plus, Bio-Plex[™], Fidis[™]) ; dans toutes ces techniques les réactifs comportaient la protéine CENP-B. Enfin des tests utilisant un mélange d'antigènes CENP-A et CENP-B ont été utilisés en complément par certains laboratoires : soit par immunodot (D-tek), soit par ELISA (INOVA).

Dix-neuf de ces sérums qui avaient été conservés congelés ont été réanalysés au Laboratoire luxembourgeois d'immunopathologie (LLIP) : d'une part par IFI sur HEp-2, d'autre part à l'aide de techniques ELISA utilisant séparément les protéines CENP-A et CENP-B recombinantes (INOVA) ou des peptides synthétiques (Dr Fooke), et avec la technique immunodot de D-tek qui utilise un mélange des protéines recombinantes CENP-A et CENP-B. Quatre sérums supplémentaires reçus au LLIP ont également été analysés à l'aide de cette batterie de tests.

Les dossiers médicaux correspondants ont été consultés en recherchant si un diagnostic de maladie auto-immune avait été retenu ou s'il existait des signes évocateurs de maladie auto-immune, en particulier de sclérodermie.

a Laboratoire d'immunologie

Centre hospitalier universitaire
Plateau technique de biologie
2, rue Angélique Ducoudray – B.P. 37013
21070 Dijon cedex

b Laboratoire luxembourgeois d'immunopathologie (LLIP)

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

* Correspondance

nils.olsson@chu-dijon.fr

© 2010 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

3. Résultats

Soixante-neuf discordances ont été retrouvées : 24 de type A (*tableau I*) et 45 de type B (*tableau II*). Pour les 19 sérums réanalysés au LLIP (*tableau III*), les résultats des tests ELISA et de l'immunofluorescence n'ont confirmé les discordances observées que dans 8 cas (sérums n° 6, 25, 26, 40, 41, 42, 43, 45).

Pour les discordances de type A, 11 sérums provenaient de patients porteurs d'une maladie auto-immune avérée, mais il ne s'agissait de sclérodermie que dans un seul cas. Pour les discordances de type B, 17 sérums provenaient de patients porteurs d'une maladie auto-immune avérée, mais il ne s'agissait de sclérodermie que dans 2 cas.

4. Discussion

Les ACA constituent un marqueur classique des sclérodermies systémiques. Selon les populations étudiées et les techniques utilisées, leur fréquence varie de 11 à 56 % [8-10]. Ils sont surtout associés à des sclérodermies systémiques limitées, autrefois désignées par le terme de syndrome CREST. Ces anticorps ont donc à la fois un intérêt diagnostique et un intérêt pronostique, ces formes cliniques étant en général assez peu évolutives, contrairement à celles qui s'accompagnent d'anticorps anti-topoisomérase I (anti-Scl-70) ou d'anticorps anti-ARN-polymérase. Néanmoins il est apparu au fil des années que leur spécificité est loin d'être absolue (*tableau IV*) [11, 12]. En effet ils sont retrouvés dans d'autres maladies auto-immunes systémiques comme le lupus érythémateux systémique [8, 13-15], le syndrome de Sjögren primaire [8, 16-19], la polyarthrite rhumatoïde [8] ou les connectivites mixtes [11]. Ils peuvent également être mis en évidence dans d'autres pathologies que les connectivites [8, 20]. Le cas de la cirrhose biliaire primitive est particulier puisque son association avec la sclérodermie, en particulier de forme limitée, est bien documentée : elle constitue le classique syndrome de Reynolds dans lequel la CBP peut précéder la sclérodermie ou inversement. La fréquence des ACA dans la CBP varie de 9 à 30 % [8, 21-24] et leur présence au moment du diagnostic pourrait définir une forme de CBP ayant un risque élevé d'évolution vers l'hypertension portale [23]. La présence d'ACA a également été rapportée dans des cancers, en particulier pulmonaires [25]. Ils ont parfois aussi été détectés chez des sujets porteurs d'un déficit en IgA [26] et chez des sujets apparemment indemnes de toute pathologie [27]. Dans une étude taïwanaise ayant porté sur plus de 3 500 patients, des ACA ont été mis en évidence par IFI chez

Tableau I – Discordances observées entre IFI et techniques « moléculaires » : type A.

Sérum n°	ANA : aspects en IFI sur HEp-2	Ac anti-CENP-B	Ac anti-CENP-A/B	Clinique
1	Centromère 1280	Nég	Pos	Syndrome sec - Cirrhose biliaire primitive ?
2	Centromère 2000	Nég	Nég	Polyarthrite rhumatoïde
3	Centromère 100	Nég	Pos	SAPL
4	Centromère 1280	Nég	Pos	Diabète de type 1
5	Centromère 200	Nég	Nég	Churg & Strauss ?
6	Centromère 320 + moucheté	Nég		Purpura thrombopénique idiopathique
7	Centromère 320	Nég		Lupus érythémateux systémique
8	Centromère ≥ 1280	Nég	Pos	Cytolyse sur foie greffé
9	Centromère ≥ 1280	Nég	Limite	Polyarthrite rhumatoïde
10	Centromère atypique ≥ 1280	Nég	Nég	Thrombocytémie essentielle
11	Centromère 320	Nég	Nég	Artériopathie, arythmie cardiaque
12	Centromère atypique 160	Nég	Nég	Pré-éclampsie
13	Centromère 320	Nég	Limite	SAPL - Lupus érythémateux systémique ?
14	Centromère 1600	Nég	Pos	Carcinome pulmonaire
15	Centromère 800	Nég	Pos	Connectivite ?
16	Centromère 640	Nég	Pos	Arthralgies
17	Centromère 160	Nég	Pos	Polyarthrite rhumatoïde
18	Centromère 320	Nég	Pos	Polychondrite atrophiante
19	Centromère 640	Nég	Pos	Syndrome sec
20	Centromère 320	Nég	Pos	Polyarthrite rhumatoïde
21	Centromère 160	Nég	Pos	Greffe rénale pour polykystose
22	Centromère 2500	Nég		Vascularite à ANCA + Raynaud
23	Centromère 2500	Nég		Sclérodermie systémique limitée
24	Centromère 640	Nég	Pos	Vascularite à ANCA

SAPL : syndrome des anti-phospholipides.

67 patients et seulement 11 d'entre eux (16 %) présentaient une sclérodermie systémique limitée [8].

Bien que les ACA fassent partie des ANA les plus faciles à identifier par IFI sur HEp-2, leur recherche peut réserver quelques difficultés, et aboutir à des résultats discordants. Cette étude rétrospective n'avait pas pour but d'estimer la fréquence réelle des discordances de résultats dans la recherche des ACA, ce qui nécessiterait une étude prospective utilisant une batterie de tests bien définie. De plus, l'observation de telles discordances dépend de la stratégie et des techniques utilisées au laboratoire. En effet, la découverte d'un aspect typique d'ACA sur HEp-2 ne nécessite pas de rechercher des Ac anti-CENP-B ni d'autres ANA. En revanche, l'utilisation systématique de techniques multiplex, après le dépistage des ANA par IFI, permet de mettre en évidence de telles discordances. Cette étude montre en tout cas que ces discordances ne sont pas exceptionnelles.

À quoi peut correspondre un aspect typique d'ACA sur HEp-2 avec une recherche négative d'Ac anti-CENP-B (discordance de type A) ? La première explication est la présence d'Ac dirigés contre une ou plusieurs autres protéines du centromère. Ainsi, dans cette étude, 20 sérums ayant donné des résultats négatifs en Ac anti-CENP-B

6^e Colloque Geai 2010

Tableau II – Discordances observées entre IFI et techniques « moléculaires » : type B

Sérum n°	ANA : aspects en IFI sur HEp-2	Ac anti-CENP-B	Ac anti-CENP-A/B	Clinique
25	Nég	Pos	Pos	
26	Nucléolaire 1280	Pos		Pneumocystose sur LLC
27	Moucheté 320	Pos		Polyarthrite rhumatoïde ?
28	Moucheté 640 + SS-A	Pos		Waldenström
29	Moucheté 80	Pos		Sclérodémie systémique limitée
30	Moucheté 320	Pos		Déficit neurologique aigu
31	Moucheté ≥ 1280 + SS-A	Pos		
32	Moucheté ≥ 1280	Pos		Cancer pulmonaire
33	Moucheté 5120	Pos		VHB chronique + hépatite delta
34	Moucheté + nucléolaire ≥ 1280	Pos		Sclérodémie systémique diffuse
35	Moucheté ≥ 1280	Pos	Pos	Accident vasculaire cérébral
36	Moucheté 320	Pos		Gastrite chronique à <i>Helicobacter</i>
37	Homogène 160	Pos		Insuffisance rénale chronique
38	Moucheté 640 + SS-A	Pos		Gastrite chronique à <i>Helicobacter</i>
39	Moucheté + membranaire		Pos	Lupus érythémateux systémique ?
40	Homogène + NuMA 1600	Pos	Pos	Raynaud + Sjögren + lymphome
41	Moucheté 100	Pos	Pos	Bilan pré-greffe du foie
42	Homogène + moucheté 1600	Pos	Pos	Lupus érythémateux systémique
43	Moucheté 100	Pos		Pneumopathie interstitielle diffuse
44	Moucheté 1600	Pos		Lupus érythémateux systémique
45	Homogène 800	Pos faible	Pos faible	PPR + syndrome lupique
46	Nég	Pos		Sclérodémie + cirrhose biliaire primitive
47	Moucheté + nucléolaire ≥ 640	Pos		Scléromyosite
48	Homogène + moucheté 640	Pos		Sjögren + sarcoïdose
49	Moucheté 80	Pos		Leucémie aiguë myéloïde
50	Homogène 640	Pos		
51	Homogène + moucheté 1280		Pos	Polyarthrite rhumatoïde
52	Moucheté 640		Pos faible	Cardiomyopathie
53	Moucheté 160		Pos	Lupus érythémateux systémique
54	Moucheté + nucléolaire 1280		Pos	Lupus érythémateux systémique + SAPL
55	Nucléolaire ≥ 1280		Pos	Arthralgies
56	Homogène + moucheté 1280		Limite	Syndrome polyalgique
57	Nucléolaire 640	Pos		Leucémie
58	Homogène + moucheté 320	Pos		Hémorragie méningée
59	Multiple nuclear dots	Pos		Cirrhose biliaire primitive
60	Moucheté 160	Pos		
61	Moucheté 160	Pos		Rhumatisme inflammatoire
62	Moucheté 160	Pos		Greffe de foie
63	Homogène + moucheté 640	Pos		Raynaud
64	Moucheté 80	Pos		Polyarthrite rhumatoïde
65	Moucheté 640	Pos		Polyarthrite rhumatoïde
66	Nég	Pos		Névrite optique rétrobulbaire
67	Nég	Pos		
68	Moucheté 2500	Pos		Perforation cornéenne spontanée
69	Moucheté 1280	Pos		

LLC : leucémie lymphoïde chronique; NuMA : nuclear mitotic apparatus; PPR : pseudopolyarthrite rhizomélitique; SAPL : syndrome des anti-phospholipides; VHB : virus de l'hépatite B.

Tableau III – Discordances de résultats vérifiées au LLIP.

Sérum n°	ANA : aspects en IFI sur HEp-2	Ac anti-CENP-A		Ac anti-CENP-B		Ac anti-(CENP-A/B)
		ELISA Inova N < 30	ELISA Dr Fooke N < 1,5	ELISA Inova N < 20	ELISA Dr Fooke N < 1,5	Dot D-tek
6	Centromère	36	0,3	3	0,6	Pos
7	Centromère	14	2,4	44	0,9	Nég
14	Centromère	52	1,5	35	1,5	Pos
15	Centromère	20	1,2	22	0,9	Pos
16	Centromère	7	3,1	152	2,9	Pos
17	Nég	4	0,4	10	0,6	Nég
18	Centromère	4	0,4	98	0,6	Pos
19	Centromère	13	1,3	55	0,9	Pos
20	Centromère	5	0,4	95	0,7	Nég
21	Centromère	7	0,3	51	1,0	Nég
LLIP1	Centromère	28	1,4	109	2,7	Pos
25	Nég	6	1,3	49	7,0	Nég
26	Nucléolaire	4	0,4	110	4,0	Nég
27	Homogène	13	1,2	16	1,2	Nég
40	Homogène + mitoses	77	3,2	135	9,5	Pos
41	Nég	7	0,7	51	5,8	Pos
42	Moucheté	11	1,0	80	2,6	Nég
43	Nég	8	0,8	109	6,0	Nég
44	Moucheté	6	0,4	14	1,0	Nég
45	Homogène	11	0,6	46	1,3	Nég
LLIP2	Homogène	17	2,4	111	2,0	Nég
LLIP3	Grains	25	1,2	5	0,7	Pos
LLIP4	Homogène	14	2,5	66	2,3	Nég

Tableau IV – Fréquence des ACA en dehors des sclérodermies.

Maladie	Fréquence	Références
Cancer du poumon		25
Cancer du sein	33 %	30
Cirrhose biliaire primitive	30 %	8
	9 %	21
	18 %	22
	26 %	23
	29 %	24
Connectivite mixte		11
Déficit en IgA	5 %	26
Lupus érythémateux systémique		8
	2 %	13
	2 %	14
	4 %	15
Maladie de Basedow		8
Polyarthrite rhumatoïde		8
Purpura thrombopénique idiopathique		8
Syndrome de Sjögren primaire		8
	17 %	16
		17
	27 %	18
	2 %	19
Vitiligo		8

par différentes techniques ont été réanalysés dans le même centre avec un test utilisant comme préparation antigénique un mélange des deux protéines CENP-A et CENP-B: 13 se sont avérés positifs, ce qui permet de conclure à la présence d'Ac anti-CENP-A. Il semble, en revanche, que la présence isolée d'Ac anti-CENP-C, sans Ac anti-CENP-A ni anti-CENP-B, soit rarement associée au marquage caractéristique des ACA en IFI sur HEP-2 [28, 29]. Une autre explication pourrait être un manque de sensibilité de certaines techniques « moléculaires » utilisées pour rechercher les Ac anti-CENP-A et/ou CENP-B. Ce pourrait être le cas pour six sérums dont le titre en Ac anti-centromère sur HEP-2 ne dépassait pas 320, alors qu'en général le titre de ces anticorps est très élevé, supérieur ou égal à 1 000. De plus, la majorité des sérums donnant ce type de discordance et qui ont été réanalysés au LLIP ont donné des résultats positifs avec au moins l'un des tests ELISA monospécifiques. Enfin, on ne peut exclure que des Ac de spécificités différentes de celles des ACA puissent donner des aspects de fluorescence similaires. En faveur de cette hypothèse, deux sérums donnaient un aspect évocateur d'ACA mais un peu atypique.

Comment expliquer les discordances inverses (type B)? Première possibilité: d'autres anticorps antinucléaires accompagnent les ACA, et masquent leurs aspects de fluorescence. Ainsi pour neuf sérums qui donnaient un marquage nucléaire homogène de titre élevé (supérieur ou égal à 640), sans aspect reconnaissable d'ACA, la recherche d'Ac anti-CENP-B était positive, et cinq d'entre eux donnaient également des résultats positifs en utilisant le mélange CENP-A/B. Deuxième possibilité: il s'agit de résultats faussement positifs qui pourraient être liés à une adsorption non spécifique d'immunoglobulines sur le support réactionnel, ou à la présence d'anticorps donnant des réactions croisées avec CENP-B ou CENP-A.

Les discordances de résultats ne sont malheureusement pas rares en sérologie auto-immune. Le *tableau III* illustre bien cette notion: seulement 4 des 23 sérums testés ont donné des résultats entièrement cohérents avec les cinq techniques utilisées! Les causes de ces discordances sont nombreuses et bien connues: nature des antigènes utilisés dans les techniques « moléculaires » (protéines purifiées à partir de diverses sources, protéines recombinantes produites dans des systèmes différents, peptides de synthèse), dénaturation ou modification de la structure tridimensionnelle des antigènes lors de leur fixation sur la phase solide, avec pour conséquence l'exposition ou le masquage de certains épitopes normalement accessibles dans la cellule HEP-2, différences de spécificité et d'affinité des conjugués... Il est donc essentiel (et encore plus dans la perspective de l'accréditation) de valider biologiquement les techniques que l'on utilise à l'aide de préparations de référence et de sérums bien documentés sur le plan clinique.

5. Conclusion

Cette étude montre que les discordances de résultats entre immunofluorescence indirecte et techniques utilisant des antigènes purifiés pour la recherche des ACA ne sont pas exceptionnelles. Elle illustre une fois de plus la fréquence des discordances de résultats entre différentes techniques recherchant les mêmes anticorps, même lorsqu'elles utilisent le même antigène recombinant. Dans cette période dominée par le spectre de l'accréditation, il n'est pas inutile de rappeler la nécessité de valider techniquement et biologiquement les techniques que nous utilisons. D'un point de vue clinique, il s'avère que les sérums donnant des résultats discordants correspondent rarement à des sclérodermies. Enfin, cette étude donne l'occasion de rappeler que la spécificité des ACA pour les sclérodermies est loin d'être absolue.

Références

- [1] Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, et al. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc Natl Acad USA* 1980;77:1627-31.
- [2] Earnshaw W, Bordwell B, Marino C, et al. Three human chromosomal auto antigens are recognized by sera from patients with anticentromere antibodies. *J Clin Invest* 1986;77:426-30.
- [3] Bischoff FR, Maier G, Tilz G, et al. A 47-kDa human nuclear protein recognized by antikinetochore autoimmunesera is homologous with the protein encoded by RCC1, a gene implicated in onset of chromosome condensation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8617-21.
- [4] Rattner JB, Rao A, Fritzler MJ, et al. CENP-F is a ca.400 kDa kinetochore protein that exhibits a cell-cycle dependent localization. *Cell Motil Cytoskeleton* 1993;26:214-26.
- [5] Earnshaw WC, Machlin PS, Bordwell BL, et al. Analysis of anticentromere autoantibodies using cloned autoantigen CENP-B. *Immunology* 1987;84:4979-83.
- [6] Earnshaw WC, Sullivan KF, Machlin PS, et al. Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. *J Cell Biol* 1987;104:817-29.
- [7] Vasquez-Abad D, Wallace S, Senecal JL, et al. Anticentromere autoantibodies: evaluation of an ELISA using recombinant fusion protein CENP-B as antigen. *Arthritis Rheum* 1994;37:68-77.
- [8] Chan HL, Lee Ys, Hong HS, et al. Anticentromere antibodies (ACA): clinical distribution and disease specificity. *Clin Exp Dermatol* 1994;19:298-302.
- [9] Spencer-Green G, Alter D, Welch HG. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies. *Am J Med* 1997;103:242-8.
- [10] Koenig M, Dieudé M, Senecal JL. Predictive value of antinuclear autoantibodies: the lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2008;7:588-93.
- [11] Miyawaki S, Asanuma H, Nishiyama S, et al. Clinical and serological heterogeneity in patients with anticentromere antibodies. *J Rheumatol* 2005;32:1488-94.
- [12] Roberts-Thomson P. Specificity of anti-centromere antibodies for scleroderma. *Rheumatol Int* 2007;28:197-8.
- [13] Zandman-Goddard G, Gilburd B, Shovman O, et al. The homogeneous multiplexed system-a new method for autoantibody profile in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2005;12:107-11.
- [14] Respalda N, Wichmann I, Ocaña C, et al. Anti-centromere antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2006;35:290-4.
- [15] Hanly JG, Thompson K, McCurdy G, et al. Measurement of autoantibodies using multiplex methodology in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods* 2010;352:147-52.
- [16] Caramaschi P, Biasi D, Carletto A, et al. Sjögren's syndrome with anticentromere antibodies. *Rev Rhum Engl Ed* 1997;64:785-8.

6^e Colloque Geai 2010

- [17] Katano K, Kawano M, Koni I, et al. Clinical and laboratory features of anticentromere antibody positive primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 2001;28:2238-44.
- [18] Hsu TC, Chang CH, Lin MC, et al. Anti-CENP-H antibodies in patients with Sjogren's syndrome. *Rheumatol Int* 2006;26:298-303.
- [19] Ramos-Casals M, Nardi N, Brito-Zerón P, et al. Atypical autoantibodies in patients with primary Sjögren syndrome: clinical characteristics and follow-up of 82 cases. *Semin Arthritis Rheum* 2006;35:312-21.
- [20] Lee SL, Tsay GJ, Tsai RT. Anticentromere antibodies in subjects with no apparent connective tissue disease. *Ann Rheum Dis* 1993;52:586-9.
- [21] Bernstein RM, Callender ME, Neuberger JM, et al. Anticentromere antibody in primary biliary cirrhosis. *Ann Rheum Dis* 1982;41:612-4.
- [22] Agmon-Levin N, Shapira Y, Selmi C, et al. A comprehensive evaluation of serum autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *J Autoimm* 2010;34(1):55-8. Epub 2009 Nov 7.
- [23] Nakamura M, Kondo H, Mori T, et al. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007;45:118-27.
- [24] Gao L, Tian X, Liu B, et al. The value of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Med* 2008;8:9-15.
- [25] Briasoulis E, Kamposioras K, Tzovaras V, et al. CENP-B specific anti-centromere autoantibodies heralding small-cell lung cancer. A case study and review of the literature. *Lung Cancer* 2008;60:302-6.
- [26] Gulez N, Karaca NE, Aksu G, et al. Increased percentages of autoantibodies in immunoglobulin A-deficient children do not correlate with clinical manifestations. *Autoimmunity* 2009;42:74-9.
- [27] Hayashi N, Koshiba M, Nishimura K, et al. Prevalence of disease-specific antinuclear antibodies in general population: estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. *Mod Rheumatol* 2008;18:153-60.
- [28] Pillemer SR, Casciola-Rosen L, Baum BJ, et al. Centromere protein C is a target of autoantibodies in Sjögren's syndrome and is uniformly associated with antibodies to Ro and La. *J Rheumatol* 2004;31:1121-5.
- [29] Gelber AC, Pillemer SR, Baum BJ, et al. Distinct recognition of antibodies to centromere proteins in primary Sjögren's syndrome compared with limited scleroderma. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1028-35.
- [30] Atalay C, Atalay G, Yilmaz KB, et al. The role of anti-CENP-B and anti-SS-B antibodies in breast cancer. *Neoplasma* 2005;52:32-5.

Anticorps antinucléaires et cancer

René-Louis Humbel^{a,*}

1. Introduction

Les processus malins sont souvent accompagnés de l'apparition d'autoanticorps dirigés contre des protéines nucléaires et, en particulier, des molécules impliquées dans la prolifération cellulaire et la mitose. En immunofluorescence, ces anticorps ne sont mis en évidence que par l'utilisation comme substrat de cultures de cellules HEP-2. Ces dernières sont des cellules tumorales provenant d'un cancer laryngé humain et dont la culture permet d'obtenir des cellules à tous les stades de la prolifération cellulaire et de la mitose.

L'immunofluorescence sur cellules HEP-2 permet ainsi la détection d'anticorps qui ne sont pas reconnus sur les coupes de tissus. On a pu ainsi identifier dans le sérum des malades cancéreux différents anticorps antinucléaires totalement différents de ceux que l'on observe dans les connectivites. Ces anticorps présentent une réactivité importante avec des constituants cellulaires participant à la croissance et la prolifération cellulaire, à la constitution des chromosomes mitotiques, à leur séparation et qui jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'appareil mitotique.

De très nombreuses protéines participent au cycle cellulaire. Beaucoup d'entre elles ont pu être identifiées et leur rôle dans la mitose, en particulier, est de mieux en mieux connu. Le déroulement du cycle de division cellulaire est extrêmement régulé et contrôlé. De nombreuses molécules, activées séquentiellement et en interconnexions les unes avec les autres, participent au bon déroulement de chaque étape. Les kinésines sont des moteurs moléculaires intervenant comme des éléments essentiels aux mouvements et au trafic intracellulaire des chromosomes et du fuseau mitotique. Plusieurs d'entre elles sont la cible des anticorps retrouvés dans le sérum des malades atteints d'un cancer. Plusieurs de ces molécules sont fortement surexprimées dans les cellules cancéreuses et elles constituent la cible de diverses thérapies antitumorales.

L'objet de cette présentation est de décrire en détail les aspects de fluorescence particuliers obtenus avec les différents anticorps antinucléaires observés dans les néoplasies.

^a Laboratoire luxembourgeois d'immunopathologie (LLIP)
37, rue Romain Fandel
L-4149 Esch-sur-Alzette – Luxembourg

* Correspondance
rlhumbel@llip.lu

2. Anticorps anti-cellules prolifératives

Ces anticorps marquent uniquement le noyau des cellules en phase S ou G2. Le prototype est représenté par les anticorps dits anti-PCNA (pour *proliferating cell nuclear antigen*) identifiés en 1978 dans le sérum d'un patient lupique (*figure 1*). Ils ne sont donc pas associés à une néoplasie et ils sont présents ici à titre comparatif avec les autres types d'anticorps anti-cellules prolifératives dénommés pseudo-PCNA. Ceux-ci marquent essentiellement les noyaux des cellules en phase G2 (éventuellement en fin de phase S) et le marquage des noyaux est différent.

Figure 1 – Anticorps-anti-PCNA.

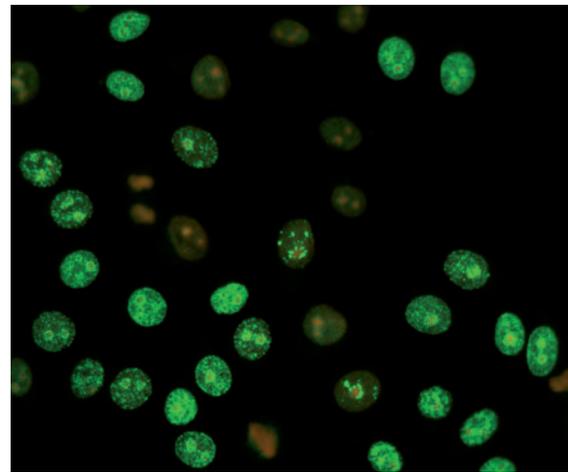
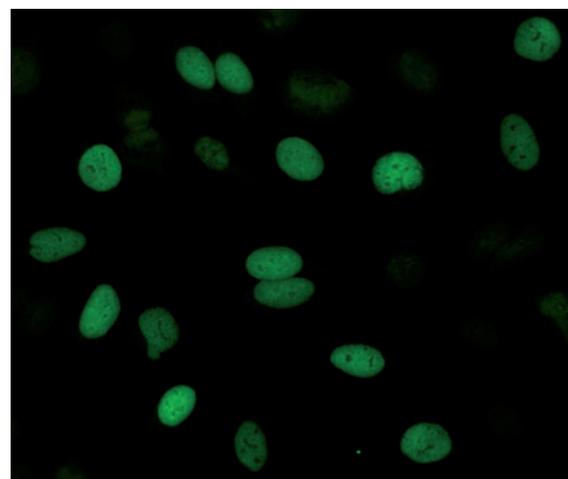


Figure 2 – Anticorps anti-pseudo-PCNA1 (type anti-striatine 3).



2.1. Les anticorps anti-pseudo-PCNA de type 1 (figure 2)

Ils sont caractérisés par le marquage homogène, ou très finement granulaire dense, des noyaux en phase G2. Ces anticorps ont reçu l'appellation d'anti-G2SNA et l'antigène cible a été récemment identifié à la striatine 3 (voir sur le site du GEAI). Ces anticorps ont été observés dans quelques cas de cancer du sein, du côlon, mais également chez des sujets ne présentant aucune néoplasie au moment de l'examen.

2.2. Les anticorps anti-pseudo-PCNA de type 2 (figure 3)

Ils marquent les nucléoles des cellules en phase G2 et accessoirement les noyaux. Le premier cas décrit concerne un patient « Mev » atteint d'un cancer pulmonaire d'où leur appellation d'anticorps anti-Mev. Des études récentes ont montré que ces anticorps étaient identiques aux anticorps antinucléolaires anti-Nop52 décrits précédemment. Nous avons pu observer ces anticorps dans quelques cas de cancer du pancréas et du côlon.

Figure 3 – Anticorps anti-pseudo-PCNA2 (type anti-Nop52).

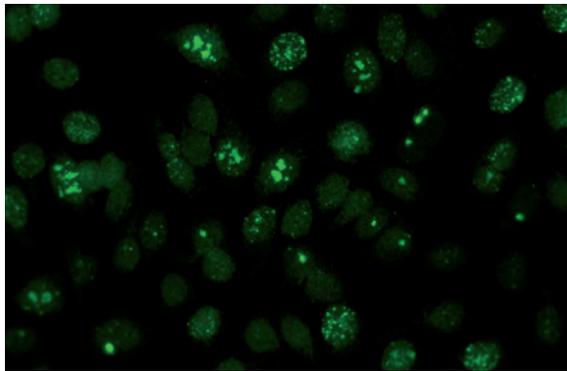
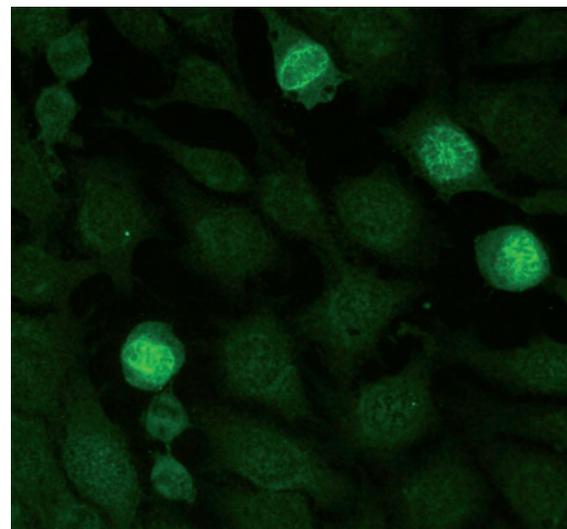


Figure 4 – Anticorps anti-périchromosomiques (type anti-périchromine).



3. Anticorps anti-cellules mitotiques

Ces anticorps peuvent être classés en deux grands groupes. Le premier groupe est constitué des anticorps qui réagissent avec les chromosomes mitotiques, le second comprend les anticorps reconnaissant des constituants du fuseau mitotique. Il existe un groupe particulier d'anticorps qui réagissent avec le chromosome mitotique des cellules en prophase/métaphase mais qui réagissent avec le fuseau mitotique en fin de mitose.

3.1. Anticorps anti-chromosomes mitotiques

Ces anticorps se reconnaissent en immunofluorescence par un marquage très intense des chromosomes des cellules mitotiques en l'absence de tout marquage des cellules interphasiques.

Différents types peuvent être distingués.

Figure 5 – Anticorps anti-Ki67.

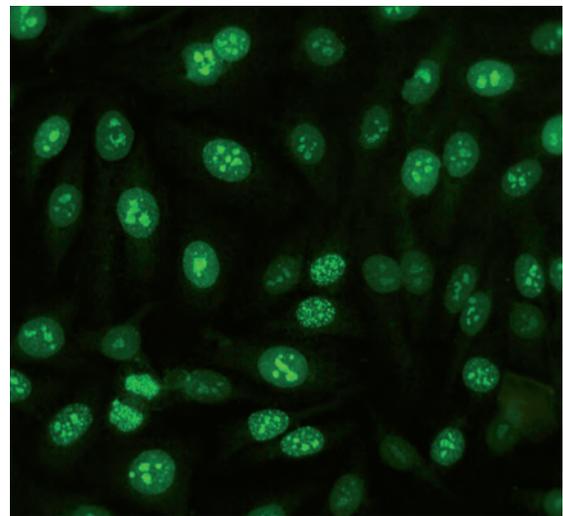
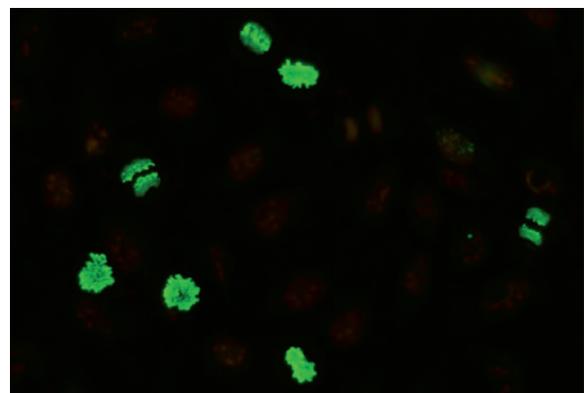


Figure 6 – Anticorps anti-chromosome mitotique (type anti-condensine).



3.1.1. Anticorps anti-périchromosomiques (figure 4)

Ils marquent la surface du chromosome mitotique. Une des cibles antigéniques possibles est la périchromine.

3.1.2. Anticorps anti-Ki67 (figure 5)

Ceux-ci marquent les nucléoles des cellules prolifératives et la périphérie des chromosomes mitotiques. La protéine Ki67 (pour Kiehl, le nom de la ville et 67 pour l'année de sa découverte en 1967) est exclusivement exprimée dans les cellules prolifératives et les cellules mitotiques. Elle est surexprimée dans les cancers du côlon et les anti-Ki67 ont été observés dans les cancers digestifs.

Des anticorps marquant exclusivement le corps du chromosome mitotique ont également pu être observés.

3.1.3. Anticorps anti-condensine

Ils réagissent intensément avec les chromosomes condensés présents durant la prophase et la métaphase (figure 6). L'antigène cible est la condensine II qui est requise pour l'organisation structurale des chromosomes. Ces anticorps ont été observés dans le sérum de patients porteurs d'une tumeur digestive.

3.1.4. Anticorps anti-topo-isomérase

Ils marquent la périphérie des nucléoles et celle des chromosomes mitotiques (figure 7). L'antigène cible est la topo-isomérase II α dont l'expression est particulièrement abondante dans les chromosomes mitotiques. Elle apparaît dans le noyau et en particulier le nucléole dès la fin de la phase S puis sur le chromosome, dont le centromère, lors de la condensation chromosomique. La topo-isomérase II α est fortement surexprimée dans les cancers du sein et le lymphome. Plusieurs drogues anticancéreuses ciblent la topo-isomérase II α .

3.2. Anticorps anti-centromère en mitose

Le centromère est constitué du kinétochore, un assemblage complexe de protéines réparties dans des régions distinctes. Les anticorps anti-centromère « classiques » réagissent essentiellement avec les protéines CENP-A et CENP-B présents dans la couche interne du kinétochore. Sur la face externe du kinétochore du chromosome mitotique se localisent des protéines supplémentaires dont les protéines CENP-F et CENP-E.

3.2.1. La protéine CENP-F

Elle est reconnue par le sérum de nombreux cancéreux, sans spécificité pour le type de cancer. Ces anticorps que j'ai décrits pour la première fois en 1987 ont été appelés anti-MSA3 (*mitotic spindle apparatus 3*) pour les différencier des anti-NUMA1 et -NUMA2.

Les anticorps anti-CENP-F marquent le noyau des cellules en phase G2 puis le centromère en prophase et partiellement en métaphase. Le marquage disparaît en télophase (figure 8).

3.2.2. La protéine Bub1

On trouve également sur le kinétochore du chromosome mitotique un complexe protéique qui joue un rôle essentiel dans la transition métaphase-anaphase. Un des éléments clés de ce complexe (appelé MCC pour *mitotic*

Figure 7 – Anticorps anti-topo-isomérase II α .

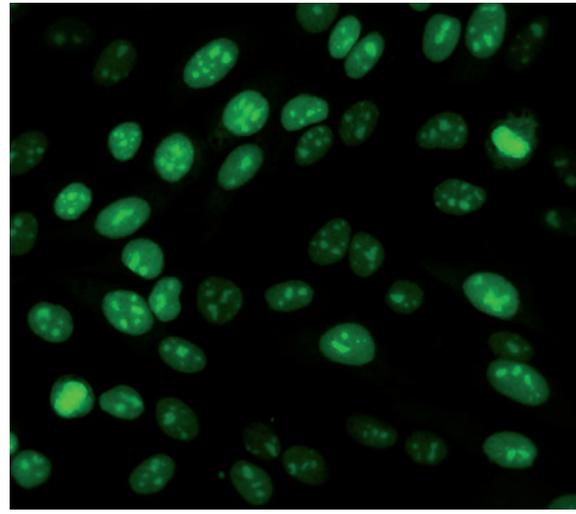


Figure 8 – Anticorps anti-MSA3 (centromère F).

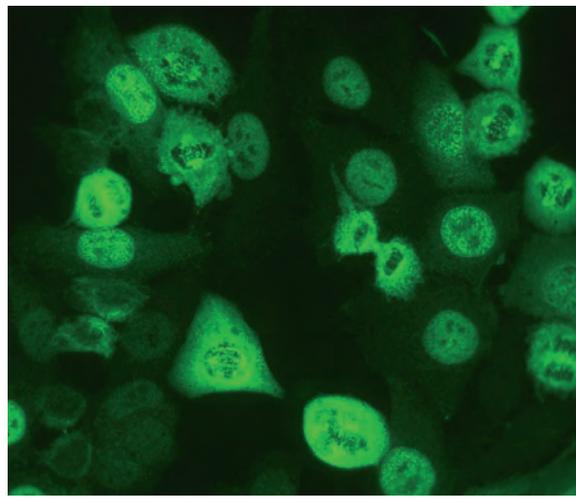


Figure 9 – Anticorps anti-Bub1.

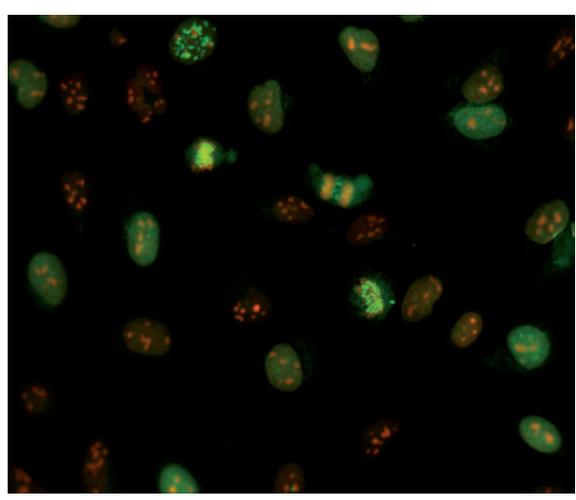


Figure 10 A
Anticorps anti-NUMA1.

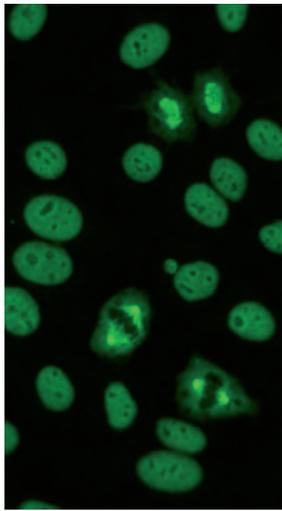
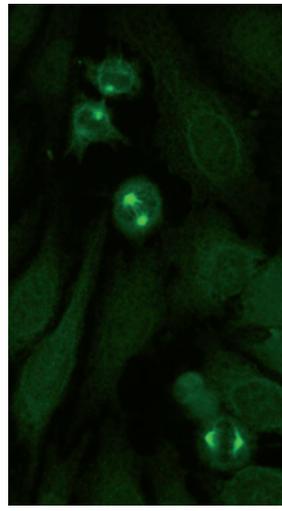


Figure 10 B
Anticorps anti-NUMA2.



checkpoint complex) est la protéine Bub1, une protéine kinase. Celle-ci est exprimée transitoirement sur les chromosomes en prométaphase et métaphase mais disparaît dès l'entrée en anaphase. Nous avons pu observer le sérum d'une patiente avec un cancer gastrique dont l'aspect en immunofluorescence semble correspondre à la localisation de la protéine Bub1 (*figure 9*). Il est à remarquer que la protéine Bub1 est surexprimée dans le cancer gastrique.

4. Anticorps anti-fuseau mitotique

Il existe différents types d'anticorps anti-fuseau mitotique. Les plus connus sont les anticorps anti-centrosome (ou anti-centriole) et les anticorps anti-NUMA (*nuclear mitotic apparatus*).

4.1. Les anticorps anti-centrosome/centriole

Ils marquent le centriole en périphérie de la cellule interphasique. Il se dédouble en phase G2 puis les deux se divisent et se déplacent sur les deux pôles du fuseau mitotique. Des anticorps anti-centrosome ont été rapportés dans des cas de dégénérescence cérébelleuse paranéoplasique. Ces anticorps marquent aussi le cytoplasme des cellules de Purkinje du cervelet, mais ne sont pas anti-Yo.

4.2. Les anticorps anti-NUMA1

Ils sont connus depuis 20 ans mais aucune association significative avec les néoplasies n'a été observée. NUMA est une protéine, la centrophiline, assurant l'assemblage du pôle du fuseau mitotique. Elle est associée au noyau des cellules interphasiques et aux pôles du fuseau de la prophase à la cytodierèse (*figure 10*).

4.3. Les anticorps appelés anti-NUMA2

Ils ne marquent que les pôles du fuseau mitotique. Deux

cibles antigéniques ont été découvertes. La première est la kinésine 5 (ou KSP pour *kinesin spindle protein* ou encore BIMC) qui est un acteur essentiel pour le fonctionnement du fuseau mitotique. Elle est fortement surexprimée dans les cellules cancéreuses et est une cible privilégiée pour les médicaments antitumoraux. La seconde molécule pouvant être reconnue par les anti-NUMA2 est l'aurora kinase A, une protéine impliquée dans la maturation du centrosome et la mise en place du fuseau mitotique. Elle assure la phosphorylation de la protéine Eg5. Elle est localisée sur les pôles du fuseau de la prophase à la télophase. L'aurora kinase A est aussi fortement surexprimée dans de nombreuses cellules tumorales.

4.4. Anticorps anti-corps intermédiaire (*midbody*)

L'étape finale de la division cellulaire est la cytokinèse ou cytodierèse qui conduit à l'individualisation des deux cellules filles. Il se forme après la télophase un sillon de division qui au fur et à mesure de l'avancée de l'étape devient un anneau contractile puis un corps résiduel. De très nombreuses protéines participent à cette ultime phase de la mitose. Deux kinésines, la MKLP1 (*mitotic kinesin-like protein 1* ou kinésine 6) et la kinésine KIF4 sont reconnues par certains autoanticorps. Les anti-MKLP1

Figure 11 – Anticorps anti-Kif4.

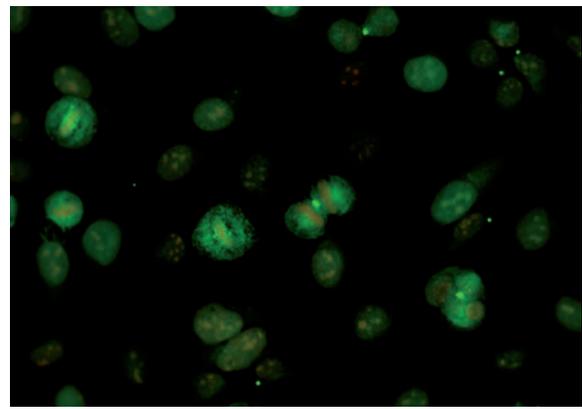
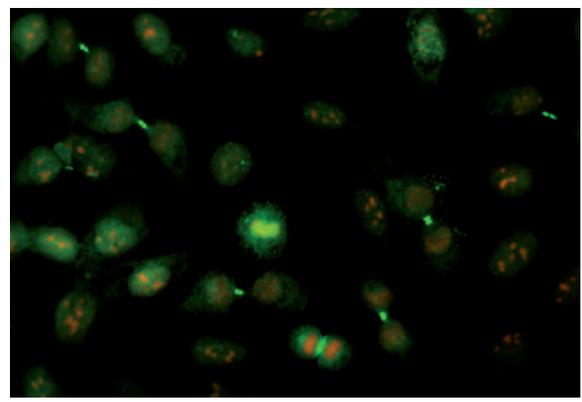


Figure 12 – Anticorps anti-MKLP1.



marquent en phase G2 un gros spot péricellulaire, le corps intermédiaire et l'anneau de séparation (*figure 11*). Dans notre expérience, ces anticorps sont associés à des cancers digestifs (pancréas et côlon). La kinésine KIF4 apparaît sur le corps intermédiaire à partir de la fin de la télophase et demeure sur l'anneau contractile jusqu'à la séparation des deux cellules filles (*figure 12*).

5. Anticorps anti-protéines chromosomiques passagères

Les protéines chromosomiques passagères appelées aussi tout simplement « protéines passagères » sont des constituants associés au centromère dans les cellules mitotiques et qui transitent sur le corps intermédiaire du fuseau mitotique en fin de mitose. Deux constituants sont reconnus par ces autoanticorps. Il s'agit de protéines localisées sur la plaque externe du kinétochore qui représente les sites de liaison de la tubuline au chromosome. Il s'agit de la protéine centromérique CENP-E et du complexe de l'aurora kinase B.

5.1. La protéine CENP-E

C'est la kinésine 7, un moteur protéique essentiel à la liaison chromosome-fuseau mitotique. Elle est surexprimée dans les tumeurs du pancréas et du poumon. Un inhibiteur spécifique de la CENP-E, le fluorène, est utilisé pour le traitement du cancer du pancréas. Les anticorps anti-CENP-E se reconnaissent facilement grâce à leur marquage caractéristique des centromères dans les cellules en prophase et métaphase et de celui du corps intermédiaire dans les cellules en télophase et cytodierèse (*figure 13*).

5.2. L'aurora kinase B

Elle fait partie d'un complexe contenant plusieurs protéines: l'aurora kinase B elle-même qui est la sous-unité catalytique, l'INCENP (*inner centromeric protein*) qui assure la liaison du complexe au centromère et au fuseau mitotique, la protéine TD60 (telodisc 60), la survivine et la boréoline. Les autoanticorps que nous avons décrits en 1985 sous l'appellation d'anti-MSA2 ciblent le complexe de l'aurora kinase B. Le marquage sur les cellules HEp-2 débute sur les noyaux en phase G2 puis s'étend aux chromosomes en prophase et en début de métaphase. A partir de l'anaphase la fluorescence se déplace sur le sillon de séparation puis sur l'anneau contractile en cytodierèse (*figure 14*). Les anti-MSA2 ont été décrits dans quelques cas de sclérodémie. Nous avons également observé quelques cas de néoplasies avec anti-MSA2. Des anticorps contre la survivine ont été rapportés chez des patients avec un cancer

Figure 13 – Anticorps anti-protéine centromérique E.

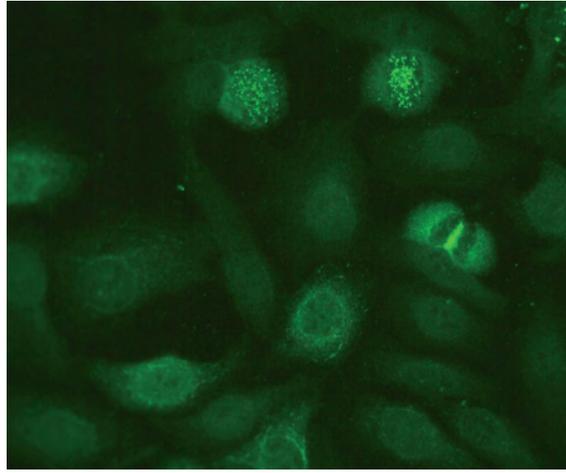
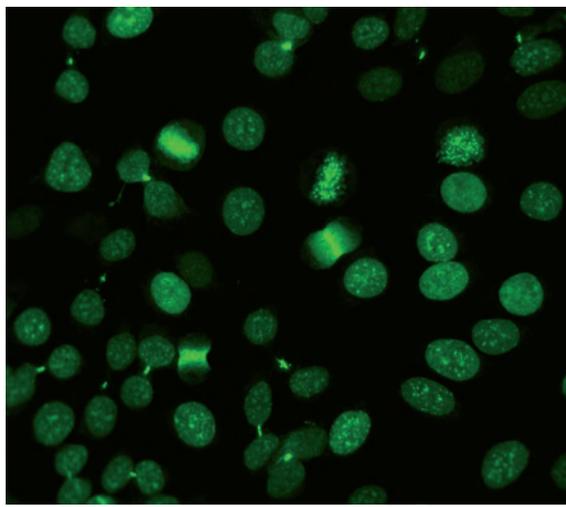


Figure 14 – Anticorps anti-MSA2 (complexe de l'aurora kinase B).



des voies aérodigestives supérieures. Des anticorps anti-INCENP ont pour leur part été décrits dans un syndrome de Graham Little-Piccardi-Lassueur, une maladie rare de la peau comportant une alopecie cicatricielle. La protéine TD60 a pu être identifiée grâce aux anticorps d'un patient (JH) qui sont identiques aux anti-MSA2. Nous ne disposons malheureusement d'aucune indication clinique sur ce patient. Toutes ces spécificités fournissent un aspect d'anti-MSA2 en fluorescence sur les cellules HEp-2.

PR séronégatives : mythe ou réalité ? Et si c'était, pour partie, la faute du biologiste ?

Sylvain Dubucquoi^{a,*}, Marie Joncquel^a, Peggy Philippe^b, René-Marc Flipo^b

1. Introduction

Des avancées thérapeutiques spectaculaires ont été réalisées ces dernières années dans le domaine des maladies auto-immunes. Avec l'utilisation des molécules biologiquement actives, les cliniciens ont compris qu'ils devaient traiter tôt pour espérer une efficacité optimale. Avec cette dimension de prise en charge précoce, le clinicien peut néanmoins perdre certains de ses repères : on lui demande désormais de poser un diagnostic avant que la sémiologie, qu'elle soit clinique ou liée à l'imagerie médicale, ne soit évocatrice. Légitimement s'exprime alors le besoin de nouveaux paramètres qui puissent guider le médecin dans la prise en charge d'une pathologie, que ceux-ci s'intègrent dans la phase diagnostique, d'évaluation pronostique ou d'efficacité thérapeutique (la « théranostique »).

Dans ce domaine de réflexion, la polyarthrite rhumatoïde (PR) fait un peu office de « terrain expérimental » pour l'évaluation des nouvelles biothérapies mais aussi de celle des marqueurs biologiques que l'on associe à cette pathologie : les facteurs rhumatoïdes (FR) et les Ac reconnaissant des motifs protéiques citrullinés. Ces questions d'évaluation sont importantes, elles visent à apporter un cadre précis, voire opposable, à la prise en charge potentiellement coûteuse de cette pathologie. Nous nous intéresserons au domaine biologique de la PR pour apprécier dans quelle mesure les biologistes, professionnels de santé, sont promoteurs des adaptations nécessaires à apporter aux dosages biologiques, en réponse aux attentes des cliniciens.

2. La problématique de la PR

Les douleurs articulaires sont un motif de consultation médicale fréquent. Il semble que si un grand nombre des

consultants présentent une pathologie peu évolutive, près de 30 % pourraient évoluer vers une maladie plus grave, la polyarthrite rhumatoïde (PR) [1]. Cette maladie à composante inflammatoire et auto-immune touche les articulations périphériques de façon symétrique et débute typiquement entre 30 et 50 ans. C'est la plus fréquente des arthropathies inflammatoires chroniques. C'en est aussi la plus grave, par son caractère définitivement destructeur des articulations. Sa prévalence est estimée à 0,3 % de la population générale, touchant, dans 6 cas sur 10, des femmes.

L'étiologie de cette pathologie est mal comprise, la physiopathologie faisant intervenir des facteurs génétiques et environnementaux, parmi lesquels le mieux identifié reste l'intoxication tabagique [2]. Un événement initial, peut-être d'origine infectieuse ou auto-immune, conduirait à une inflammation de la membrane synoviale articulaire (formant le « pannus synovial »). L'intervention de différents acteurs immunitaires conduit à la destruction articulaire et parfois aux complications systémiques (vascularites, fibrose pulmonaire...). Avant les années 2000, 10 à 30 % des patients présentaient un handicap fonctionnel sévère dans les 10 ans qui suivaient l'apparition de la maladie. Le retentissement de ce handicap était majeur tant sur le plan familial que professionnel.

Le diagnostic de la PR est avant tout clinique, évoqué devant une atteinte polyarticulaire, symétrique, à prédominance distale, respectant généralement le squelette axial et les articulations interphalangiennes distales. Ce sont souvent les articulations des poignets, des avant-mains et des chevilles qui sont les premières touchées. Elles sont douloureuses, enraidies, chaudes et gonflées. Les douleurs réveillent les patients la nuit, et s'estompent progressivement avec l'exercice (définissant le « dérouillage matinal »). La PR débute généralement de façon insidieuse, avec les symptômes articulaires qui apparaissent sur plusieurs semaines, voire mois, s'accompagnant d'une altération modérée de l'état général. Plus rarement, les patients se présentent avec une atteinte monoarticulaire ou inversement une atteinte multiviscérale (pleurésie, par exemple).

Les données acquises depuis maintenant plus de dix ans ont montré qu'une prise en charge thérapeutique rapide peut contrôler le processus érosif (destructeur) de la maladie. L'établissement du diagnostic devient en quelque sorte une « urgence » relative (en termes de mois) et le qualificatif « précoce » doit désormais y être associé. Le diagnostic doit donc être porté avant que la maladie ne s'installe dans toutes ses composantes clinique et paraclinique (imagerie, biologie), c'est-à-dire avant que les critères de classification de l'American College of Rheumatology (ACR) ne soient rassemblés [3]. Idéalement on demanderait au

a Laboratoire d'immunologie

Fédération de biologie pathologie
Centre hospitalier régional universitaire de Lille
Bd du Professeur Jules-Leclercq
59037 Lille cedex

b Service de rhumatologie

Centre hospitalier régional universitaire de Lille
Hôpital Roger-Salengro
59037 Lille cedex

* Correspondance

sylvain.dubucquoi@chru-lille.fr

© 2010 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

clinicien de porter le diagnostic de PR au stade d'«arthrite indifférenciée» alors que les signes sont encore frustes (atteinte monoarticulaire...), les radiographies osseuses souvent muettes et les diagnostics différentiels nombreux (*tableau I*), c'est-à-dire dans les huit mois suivant les premières manifestations articulaires. C'est à ce prix que l'on peut garantir l'efficacité des traitements de fond.

Une question devient alors cruciale pour nous biologistes, celle d'apprécier dans quelle mesure les paramètres que nous mesurons peuvent aider le médecin dans sa prise en charge diagnostique, son évaluation pronostique et finalement son choix thérapeutique.

3. Biologie de la PR

3.1. Quelle place pour les FR ?

Dans l'esprit de tous, le diagnostic de la PR est associé au dosage des FR. Il faut toutefois rappeler l'importance de l'exploration du syndrome inflammatoire qui, si elle ne constitue qu'un faible apport diagnostique (*il est rencontré dans de nombreuses pathologies avec atteintes articulaires*), apporte une composante pronostique intéressante dans le contexte de la PR.

Les facteurs rhumatoïdes (FR) sont des autoanticorps capables de se lier au fragment cristallisable (Fc) des immunoglobulines G (IgG). Ils peuvent être de différentes classes (IgM, IgG, IgA) et leur présence traduit généralement un processus inflammatoire. Transitoires et à taux faibles, ces autoanticorps constituent un procédé physiologique d'élimination de complexes immuns circulants; leur fréquence augmente aussi chez le sujet âgé. En revanche, à titres élevés, persistants, et avec la capacité d'interagir avec des IgG animales (stigmate de polyclonalité), ils traduisent un processus inflammatoire chronique et probablement un dérèglement du système immunitaire. On perçoit immédiatement que ce marqueur biologique est peu spécifique de la PR. C'est une première limite à sa prescription.

À la lecture de la littérature, le choix des méthodes de dosage des FR semble simple. Les méthodes automatisées (néphélométrie, turbidimétrie) ou les tests immunoenzymatiques (ELISA) offrent les meilleures performances de sensibilité par rapport aux méthodes d'agglutination (latex : IgM anti-IgG humaines; Waaler-Rose : IgM anti-IgG de lapin). En pratique courante, pour ce qui concerne notre pays, les habitudes semblent toutefois figées aux dosages du «latex et Waaler Rose (WR)». Cette combinaison, associant un test présumé sensible (latex) et un test présumé spécifique (WR), est supposée apporter et sensibilité et spécificité à la démarche de diagnostic biologique de la PR. Avec un peu de réflexion, on se rend vite compte que cette association restreint la sensibilité de la combinaison à celle du WR (*le moins sensible des deux!*), au profit de sa spécificité. En revanche, si la combinaison «ou» (latex ou WR positif) étend les performances de sensibilité à celle du «latex», elle y restreint aussi la spécificité (*le «latex» est le moins spécifique des deux tests*) [5]. Dans les deux cas, cette combinaison n'apporte donc rien au malade... Elle permet surtout la facturation de deux tests remboursés par la Sécurité sociale, là où néphélométrie ou l'ELISA (*intrinsèquement plus chers*) conduisent au rem-

Tableau I – Diagnostics différentiels de la PR (extrait de [4]).

Catégories	Exemples
Connectivites	Lupus érythémateux systémique Vascularites Polymyosites Syndrome primaire de Sjögren
Maladies systémiques	Maladie de Still Sarcoïdose Endocardites infectieuses Rhumatisme articulaire post-streptococcique
Spondylarthropathies	Arthrites psoriasiques Arthrites réactives
Arthrites infectieuses	Virales (parvovirus) Bactériennes (gonocoque)
Arthrites microcristallines	Goutte Chondrocalcinose
Arthrites par dépôts	Hémochromatose
Endocrinopathies	Pathologies thyroïdiennes
Maladies dégénératives	Arthrose
Arthrites malignes ou paranéoplasiques	Cancer pulmonaire, myélome multiple

boursement d'un seul test (B 40). C'est une aberration de la Nomenclature des actes de biologie médicale (NABM), mais elle préside aux choix de nombreux biologistes, privés comme publics.

S'il fallait se convaincre d'abandonner les dosages des «latex WR», il faut lire la conclusion du contrôle national de qualité, proposé par l'AFSSAPS en 1998, et surtout l'article qui a découlé de cette consultation [6]. En effet, si le rapport de l'AFSSAPS insiste sur le manque de standardisation des méthodes d'agglutination, l'article en illustre par le détail toute la portée. Il montre que près de 80 % des laboratoires français utilisaient (en 1998, mais en 2010 ?) les techniques d'agglutination pour le dosage du FR et principalement le WR. Si on focalise l'analyse des résultats aux seuls laboratoires utilisant les réactifs d'un fournisseur particulièrement implanté, on observe que pour une valeur cible de 250 UI/mL (10 fois la valeur seuil du test), 50 % des laboratoires rendent une valeur comprise entre 33 et 220 (!) UI/mL. La dispersion est telle que les laboratoires restants (50 % !) sont incapables de rendre une valeur approchant ces bornes (33-220 UI/mL), et produisent des résultats inférieurs ou (plus rarement) supérieurs.

L'analyse de cette consultation a probablement guidé la conclusion du comité d'experts de la Haute Autorité de Santé (HAS) qui, dès 2006, préconisait clairement l'abandon des méthodes de dosages par agglutination des FR, au profit des méthodes ELISA ou de néphélométrie [7].

Si on revient maintenant à notre problématique de prise en charge précoce de la PR, et à la place privilégiée de la biologie dans cette démarche, plusieurs études rapportent les performances des différentes méthodes de dosage des FR (*tableau II*). On apprécie que la sensibilité de la combinaison «latex WR» est faible, ne dépistant qu'un

tiers des maladies rhumatoïdes évoluant depuis moins de 1 an [8, 9], là où néphélométrie et ELISA en dépiste deux sur trois [10-13]. Il semble donc que si les WR trouvaient un intérêt par la spécificité que la combinaison apportait à la recherche des FR, les mauvaises performances de sensibilité en font des méthodes qui n'ont plus leur place dans le diagnostic précoce de la PR, et plus encore depuis que de nouvelles générations de trousse diagnostiques, basées sur la mise en évidence d'Ac anti-protéines citrullinées, sont arrivées sur le marché. En France donc, si plus de 30 % des PR débutantes n'ont pas de FR, la raison en est liée aux choix des réactifs basés pour l'essentiel sur des arguments économiques : faible coût des réactifs et double remboursement par la Sécurité sociale.

3.2. Le dosage des anticorps anti-épitopes citrullinés a-t-il réellement bouleversé la prise en charge du diagnostic biologique de la PR ?

La mauvaise spécificité des FR a, depuis longtemps, conduit à la recherche de marqueurs biologiques plus spécifiques de la PR. Jusqu'aux toutes premières années 2000, certains ont pu utiliser des tests basés sur l'immunofluorescence (Ac anti-kératine voire facteurs anti-périnucléaires [14, 15]). Il faut reconnaître que ces méthodes n'ont connu qu'une diffusion limitée du fait de leur faible sensibilité et leur manque de standardisation [12, 16]. Ils ont néanmoins conduit à l'identification d'un antigène, cible de la réactivité des sérums de patients souffrant de PR : la (pro-)filagrine citrullinée. D'autres travaux ont depuis montré qu'il pouvait exister différents substrats moléculaires (la vimentine [17], la fibrine [18] ou d'autres encore [19]) susceptibles d'être transformés *in vivo* par processus de « désimination » encore appelé citrullination.

Parallèlement à une meilleure compréhension des processus physiopathologiques, l'identification d'antigènes, cibles de la réactivité immunitaire associée à la PR, a permis certains progrès dans le domaine du diagnostic biologique. À partir de 2003, sont apparues sur le marché international, des trousse permettant de rechercher des Ac spécifiques dirigés contre différents épitopes citrullinés au sein d'un test, dit de deuxième génération, anti-cyclic citrullinated peptide 2 (CCP2) [20]. Selon les données de la littérature, la sensibilité moyenne des trousse dosant les Ac anti-CCP2

est proche de 70 % et la spécificité supérieure à 95 % [21]. Selon la même étude, les chiffres de sensibilité chuteraient toutefois en dessous de 50 % dans le cadre du diagnostic à la phase d'arthrite indifférenciée [21]. En revanche, 20 à 30 % des patients qui n'ont pas de FR présenteraient des Ac anti-CCP2 [22]. Inversement, on retrouve des FR chez plus d'un tiers des patients qui n'ont pas d'Ac anti-CCP2 [22]. Il apparaît donc que la sensibilité des Ac anti-CCP n'est pas meilleure que celle des FR. Le dosage des FR resterait utile au diagnostic de la PR, notamment pour les formes débutantes, soit en combinaison d'emblée, soit peut-être en seconde intention, en l'absence d'Ac anti-CCP2, nous y reviendrons plus loin.

De 2003 à 2005, l'existence d'une seule source antigénique permettait d'espérer une relative standardisation des résultats inter-laboratoires. Depuis, quelques réserves doivent être formulées : le marché du dosage des Ac anti-protéines et peptides citrullinés s'est effectivement étoffé [19]. La diversification des antigènes, trousse, méthodes, automates, et même « générations », élargit le choix mais pose naturellement la question de l'évaluation des performances des différents tests. Les résultats publiés montrent clairement de larges différences en terme de sensibilité et de spécificité [23, 24]. Pour obtenir une spécificité de 95 %, la sensibilité chute parfois de façon dramatique [25]. Les performances de ces dosages sont pourtant essentielles au vu de l'exploitation des résultats qu'en font les cliniciens.

Quel choix formuler alors ? Celui-ci est évidemment dépendant des essais de réactifs que chacun pourra conduire en son laboratoire et de sa participation aux programmes internationaux de contrôles de qualité externes. Ici, pour n'orienter en quelconque façon un choix, on évoquera dorénavant les ACPA (*anti-citrullinated protein antibodies*) dans la suite du texte.

3.3. Quelle valeur accorder aux résultats quantitatifs des dosages des FR et des ACPA ?

Nous avons déjà évoqué le fait qu'une inflammation importante associée aux premiers symptômes articulaires constituait un marqueur de l'agressivité de la PR. De même, les titres les plus élevés de FR ont-ils été associés au risque de développer une PR plus érosive, surtout lorsqu'ils sont observés dans les premiers mois d'évolution [26, 27]. On peut préciser qu'il ne semble pas utile de répéter les dosages, à partir du moment où on les a déjà titrés une fois. On rappellera également les performances dont sont capables les laboratoires qui dosent les FR [6]. On retiendra que la seule présence des FR, plus que leur titre, traduirait en elle-même un risque érosif plus important [28, 29].

L'identification d'allèles HLA exprimant l'épitope partagé (Q)-K/R-R-A-A (HLADRB1*0401, 0404, 0101...) surtout à l'état homozygote (« double dose ») a également pu être associée à une évolution plus péjorative de la PR [26]. Cette identification qui requiert une approche allélique de haute technicité, de même que le coût des analyses (*BHN 800*) ont beaucoup restreint sa diffusion. Plus encore, les données de la littérature montrent une forte association entre présence des groupes HLA à risque et celle d'ACPA [30]. Cette association rendrait donc caduque l'approche

Tableau II – Sensibilité et spécificité des différentes méthodes dosant les FR.

	Sensibilité (%)		Spécificité (%)
	PR précoces ^a	PR avérées ^b	
ELISA	65	79	84-94
Néphélométrie/turbidimétrie	50-66	82	87-95
Test au latex	32-55	70	80
Test de Waaler-Rose		60	90-95

^a Patients souffrant de PR depuis moins d'un an [10-13].
^b Depuis plus de 2 ans [8, 9].
^c C'est la sensibilité de la combinaison « latex et Waaler-Rose » qui est rapportée ici. La sensibilité du test au latex seul approche celle des méthodes automatisées ou ELISA.

génomique au profit des tests ELISA dosant ces anticorps.

L'analyse de la littérature, réalisée par les experts réunis par la HAS, accorde d'ailleurs à la présence des ACPA une dimension pronostique, en tant qu'indicateur de progression d'érosions osseuses, quand ces marqueurs sont présents de façon précoce [7]. Il est important de s'arrêter un instant sur cette interprétation qui impose deux commentaires. D'abord, le rapport de la HAS insiste sur la détection **précoce** des anticorps en tant que marqueur pronostique, c'est-à-dire dans les 6 à 12 premiers mois d'évolution, lors de la phase diagnostique. On peut alors apprécier que, si la sensibilité de ce marqueur reste faible (environ 50 %, 6 mois après le début des symptômes), sa présence, à cette date, apporterait une information sur l'agressivité de la maladie (« plus érosive »). Il faut donc bien comprendre que, la prévalence des ACPA augmentant avec l'âge de la PR (jusqu'à 80 % après 2 ans d'évolution), leur présence constatée à cette date perd sa composante pronostique. Il faut en effet se rappeler que parmi les patients souffrant de PR, environ un tiers (« seulement ») présentera une évolution particulièrement péjorative (et non pas l'ensemble de patients qui présentent des ACPA!).

D'autre part, il s'agit bien de la **présence**, et non des titres, d'ACPA qui est considérée comme marqueur pronostique de la PR. Il n'a pas encore été établi que les patients présentant les titres les plus élevés présentaient les PR plus agressives. Cette notion est d'ailleurs utile car il faut rappeler que certains fournisseurs de microplaques ELISA, par souci d'économie, proposent l'utilisation de leur coffret sans véritable courbe de calibration (en six points). C'est une approche semi-quantitative basée sur une valeur seuil et un seul point de gamme. Pour les coffrets proposant de larges gammes de mesure, il reste à montrer l'intérêt réel de titrer précisément le taux de ces anticorps.

De la même façon, quelques études évoquent l'intérêt de juger de la décroissance des titres des FR et des ACPA pour apprécier l'efficacité des traitements, notamment des biothérapies (*Ac monoclonaux anti-TNF α ou anti-CD20 par exemple*) [31-35]. On peut effectivement imaginer une relation entre le contrôle de la réponse inflammatoire ou des cellules productrices d'Ac et les titres des marqueurs biologiques de la PR. Il faut toutefois rester prudent quant à la généralisation de ces résultats, surtout au vu des performances dont sont capables les trousse de dosages et les laboratoires qui les utilisent. Devant l'importance que le clinicien accorde aux résultats biologiques quantitatifs (c'est-à-dire « chiffrés »), on ne peut encore une fois que regretter le manque de standardisation des différentes méthodes, que ce soit pour les dosages des FR ou ceux des ACPA [23, 25]. Pour percevoir toute la portée de cette notion, il faut se souvenir que le clinicien ne choisit pas le laboratoire qui suivra le patient, et qu'il aura nécessairement à comparer des résultats provenant de différentes sources (ne serait-ce que pour différents patients). Concernant les ACPA, les résultats des contrôles de qualité externes internationaux laissent augurer des mêmes conclusions que pour les FR. Avec des valeurs s'échelonnant dans un rapport de 1 (valeur seuil) à 10 pour l'analyse d'un même sérum, il est clair que le clinicien ne doit pas se fier aux résultats quantitatifs. On commence à percevoir que l'appréciation

pronostique à partir de valeurs chiffrées de marqueurs biologiques est une utopie que l'on n'approche qu'au travers des publications médicales [36]. La transposition de tels résultats dans la pratique quotidienne justifierait, encore une fois, un effort de standardisation des trousse de dosage et que les laboratoires qui les utilisent ponctuent leurs résultats d'un intervalle de confiance à 95 %, estimé sur la base des contrôles de qualité qu'ils mettent en œuvre dans différentes gammes de mesure.

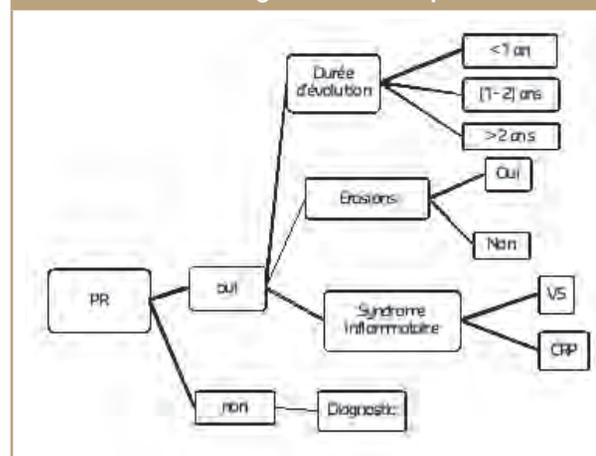
4. Prévalence des PR séronégatives dans le Centre hospitalier universitaire de Lille

On vient d'entrevoir que la notion de PR séronégative est pour beaucoup dépendante des stratégies et choix que le biologiste a fait pour la mise en œuvre des tests de laboratoire c'est-à-dire des méthodes qu'il utilise pour le dosage des FR, ACPA... Pour estimer cette prévalence dans notre recrutement, nous avons analysé les résultats des dosages des FR et des Ac anti-CCP2 à partir de l'ensemble des prescriptions qui nous ont été adressées par le Service de rhumatologie du CHU de Lille sur la période du 1^{er} septembre 2008 au 1^{er} septembre 2009, sachant que nous utilisons en routine le coffret ELISA A. Menarini (ZEN-IT) pour le dosage des FR, et l'ImmunoCAP System (Phadia) pour le dosage des Ac anti-CCP2.

Des études préliminaires menées dans notre laboratoire ayant montré la supériorité des tests ELISA sur les tests d'agglutination, nous n'avons pas réintroduit le « latex/WR » dans notre démarche [5]. En revanche, afin de juger de l'apport potentiel des Ac anti-MCV qui ne s'inscrivent pas dans notre routine, nous avons acheté les coffrets de réactifs et réalisé les dosages pour les 361 prescriptions correspondantes de cette période. Une collaboration a enfin été engagée avec les rhumatologues du Service de rhumatologie du CHU de Lille pour le recueil des données cliniques (*figure 1*).

Sur les 361 dossiers analysés, 4,7 % (17) n'avaient pas de diagnostic au moment de la consultation du dossier ;

Figure 1 – Stratégie de recueil des renseignements cliniques.



2,8 % (10) laissaient suspecter une PR, mais un doute persistait de sorte que les résultats des dosages des FR et des ACPA n'ont pas été introduits dans la mesure ultérieure des performances de ces tests. Près de 59 % des patients dont nous avons analysé le sérum présentaient une pathologie rhumatismale autre que la PR. Enfin, 33,8 % des patients présentaient une PR. La synthèse des données est proposée dans le **tableau III**.

Tableau III – Analyse de la population issue du recrutement du Service de rhumatologie du CHRU de Lille sur une durée d'un an.

361 demandes de dosages de FR et d'Ac anti-CCP ont été adressées entre le 01/09/08 et le 01/09/09. À l'issue de cette collecte :									
17 diagnostics indéfinis	2 ont des FR Aucun patient n'a d'Ac anti-CCP ou anti-MCV								
10 « suspicions » de PR ou « doutes diagnostiques »	1 seul patient a des érosions 1 seul patient a des FR, des Ac anti-CCP et des Ac anti-MCV (il n'a pas d'érosions !) 1 patient a des FR sans Ac anti-CCP ni anti-MCV (il présente des érosions)								
212 diagnostics autres que PR	26 patients ont des FR - 25 patients sans Ac anti-CCP ou anti-MCV - 1 patient avec Ac anti-MCV 1 patient a des Ac anti-CCP et des Ac anti-MCV (sans FR) 5 patients ont des Ac anti-MCV (sans FR ni Ac anti-CCP)								
122 diagnostics de PR	3 patients dont la durée d'évolution de la maladie n'a pu être définie à la lecture du courrier médical 104 patients dont la PR a une durée supérieure à 2 ans 15 patients dont la durée de la PR est < 2 ans (11 de durée < 1 an)								
	<table border="1"> <tr> <td>37 patients n'ont pas de FR</td> <td>30 PR de plus de 2 ans d'évolution</td> </tr> <tr> <td>4 patients avec Ac anti-CCP et anti-MCV</td> <td>1 de moins d'un an d'évolution</td> </tr> <tr> <td>4 patients avec Ac anti-CCP seuls</td> <td>Aucun de moins d'un an d'évolution</td> </tr> <tr> <td>2 patients avec Ac anti-MCV seuls</td> <td>Aucun de moins d'un an d'évolution</td> </tr> </table>	37 patients n'ont pas de FR	30 PR de plus de 2 ans d'évolution	4 patients avec Ac anti-CCP et anti-MCV	1 de moins d'un an d'évolution	4 patients avec Ac anti-CCP seuls	Aucun de moins d'un an d'évolution	2 patients avec Ac anti-MCV seuls	Aucun de moins d'un an d'évolution
37 patients n'ont pas de FR	30 PR de plus de 2 ans d'évolution								
4 patients avec Ac anti-CCP et anti-MCV	1 de moins d'un an d'évolution								
4 patients avec Ac anti-CCP seuls	Aucun de moins d'un an d'évolution								
2 patients avec Ac anti-MCV seuls	Aucun de moins d'un an d'évolution								
	<table border="1"> <tr> <td>39 patients n'ont pas d'Ac anti-CCP</td> <td>5 de moins d'un an d'évolution</td> </tr> <tr> <td>2 patients ont des FR et des Ac anti-MCV</td> <td>1 de moins d'un an d'évolution</td> </tr> <tr> <td>8 patients ont des FR isolés</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>2 patients ont des Ac anti-MCV isolés</td> <td>-</td> </tr> </table>	39 patients n'ont pas d'Ac anti-CCP	5 de moins d'un an d'évolution	2 patients ont des FR et des Ac anti-MCV	1 de moins d'un an d'évolution	8 patients ont des FR isolés	-	2 patients ont des Ac anti-MCV isolés	-
39 patients n'ont pas d'Ac anti-CCP	5 de moins d'un an d'évolution								
2 patients ont des FR et des Ac anti-MCV	1 de moins d'un an d'évolution								
8 patients ont des FR isolés	-								
2 patients ont des Ac anti-MCV isolés	-								
	<table border="1"> <tr> <td>49 patients n'ont pas d'Ac anti-MCV</td> <td>5 de moins d'un an d'évolution</td> </tr> <tr> <td>10 patients ont des FR ou des Ac anti-CCP</td> <td>1 de moins d'un an d'évolution</td> </tr> <tr> <td>8 patients ont des FR isolés</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>4 patients ont des Ac anti-CCP isolés</td> <td>-</td> </tr> </table>	49 patients n'ont pas d'Ac anti-MCV	5 de moins d'un an d'évolution	10 patients ont des FR ou des Ac anti-CCP	1 de moins d'un an d'évolution	8 patients ont des FR isolés	-	4 patients ont des Ac anti-CCP isolés	-
49 patients n'ont pas d'Ac anti-MCV	5 de moins d'un an d'évolution								
10 patients ont des FR ou des Ac anti-CCP	1 de moins d'un an d'évolution								
8 patients ont des FR isolés	-								
4 patients ont des Ac anti-CCP isolés	-								
	<table border="1"> <tr> <td>27 (22 %) patients n'ont aucun marqueur (FR, Ac anti-CCP ou anti-MCV)</td> <td>4 de moins de 2 ans d'évolution 11 d'entre eux présentent des érosions.</td> </tr> </table>	27 (22 %) patients n'ont aucun marqueur (FR, Ac anti-CCP ou anti-MCV)	4 de moins de 2 ans d'évolution 11 d'entre eux présentent des érosions.						
27 (22 %) patients n'ont aucun marqueur (FR, Ac anti-CCP ou anti-MCV)	4 de moins de 2 ans d'évolution 11 d'entre eux présentent des érosions.								

Pour l'évaluation des performances des tests (**tableau IV**), seuls les patients dont le diagnostic était bien établi ont donc été intégrés (122 PR et 212 non PR). On apprécie que la sensibilité des FR et celle des Ac anti-CCP (aux seuils des fournisseurs) sont comparables dans cette population, proches de 70 %. Au seuil du fournisseur, celle des Ac anti-MCV est inférieure de près de 10 % à celle des deux autres tests. La spécificité des FR est en revanche inférieure de plus de 10 % à celles des Ac anti-CCP et anti-MCV.

À la lecture de ces données, beaucoup de questions se font jour : les performances des tests sont-elles comparables ? Faut-il préférer un test sensible à un test spécifique ? L'inverse ? Faut-il multiplier les tests ?

Les notions de performances des tests biologiques sont largement utilisées par les biologistes en pratique quotidienne, à travers les données de sensibilité et spécificité. Toutefois, elles ne permettent pas d'apprécier correctement les performances d'un test **en pratique clinique**, c'est-à-dire par le clinicien. Rappelons que la sensibilité reflète la probabilité d'un test d'être positif dans une population malade ; la spécificité, celle d'avoir un test négatif dans une population qui ne l'est pas. On connaît donc le statut de l'individu (« malade ou pas ») pour évaluer ces performances !

Les valeurs prédictives positives et négatives renseignent plus le clinicien sur la probabilité d'être malade (*ou exempt de la maladie*) quand le test est positif (*ou négatif*), mais leurs calculs font intervenir la prévalence de la maladie dans le recrutement, estimation qu'il n'est pas simple de mesurer en pratique courante. Plus encore, ces données sont difficilement transposables d'une population à l'autre si la prévalence de la maladie change.

Les rapports de vraisemblance offrent une alternative intéressante. Pour en apprécier toute la portée, le lecteur se reportera à l'excellent article de H. Delacour sur la mesure de ces paramètres et de la probabilité post-test qui en découle [37]. Ces rapports sont de plus en plus utilisés dans la littérature [38].

Prenons un exemple simple. Face à un malade, un clinicien peut estimer la probabilité que celui-ci soit atteint de la pathologie (*la PR dans le cas qui nous intéresse*) avant toute prescription biologique. Cette probabilité (appelée « pré-test ») varie évidemment de 0 à 100 %. Pour une probabilité de 100 %, le clinicien n'a pas besoin de l'aide de la biologie. En dessous (cas les plus fréquents), il peut estimer légitime de s'aider d'une prescription appropriée : les dosages des FR, des Ac anti-CCP ou anti-MCV pour ce qui nous intéresse toujours.

Avec les rapports de vraisemblance (*likelihood ratio*, LR), on peut mesurer l'aide (appelée « *probabilité post-test* ») apportée par les différents dosages selon que leurs résultats seront positifs ou négatifs. Cette aide est évidemment intimement liée aux performances intrinsèques (sensibilité et spécificité) de chacun des tests mis en œuvre. Idéalement, l'intérêt d'un paramètre biologique se mesure au fait qu'un clinicien indécis (*probabilité pré-test < 0,5*) sera convaincu que le sujet est malade (ou non) grâce au résultat des dosages mis en œuvre par le laboratoire.

Ainsi, avec le rapport de vraisemblance positif (LR+), le clinicien peut estimer la probabilité (*post-test*) que le patient

a la pathologie quand le résultat du dosage est positif. Le test est jugé intéressant quand il fait passer d'une faible probabilité pré-test (< 0,5) à une forte probabilité post-test (> 0,9).

Avec le rapport de vraisemblance négatif (LR-) le clinicien peut estimer la probabilité (*post-test*) que le patient ait (« *quand même* ») la pathologie alors que le dosage est négatif. Pour des LR- < 0,1, cette probabilité post-test est généralement la meilleure (c'est-à-dire que pour de tels rapports, le clinicien a peu de chance de conclure à tort à l'absence de maladie).

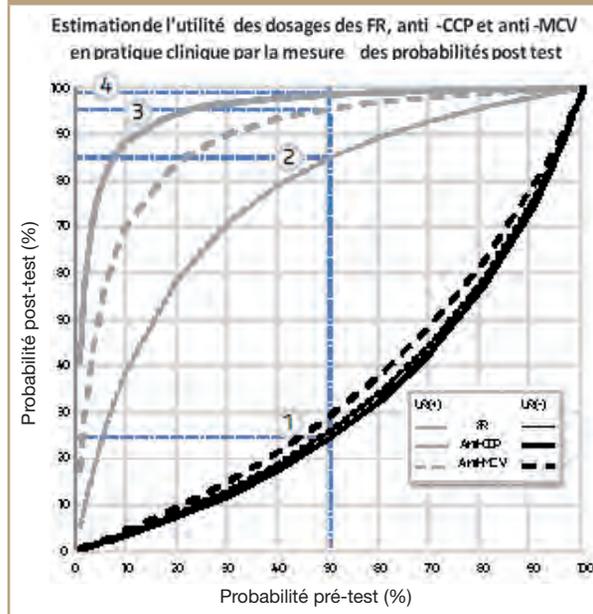
La **figure 2** montre l'évolution des probabilités pré- et post-tests pour les dosages de FR, d'Ac anti-CCP et d'Ac anti-MCV, quand ceux-ci sont négatifs (traits noirs) ou positifs (traits grisés) à partir de notre cohorte d'étude et pour les seuils proposés par les fournisseurs. On perçoit immédiatement que les probabilités post-tests évoluent de façon globalement superposable quand les différents dosages (FR, Ac anti-CCP, Ac anti-MCV) sont négatifs. Imaginons toujours une probabilité pré-test établie par le clinicien à 50 % (le malade a une « chance statistique » sur deux d'avoir la PR), la probabilité post-test d'avoir cette pathologie reste proche de 25 % si les résultats des dosages de FR ou d'Ac anti-CCP sont négatifs, et de 30 % si ceux des Ac anti-MCV sont négatifs eux aussi.

En revanche, les probabilités post-tests sont singulièrement différentes quand les résultats des différents dosages sont positifs. Toujours avec une probabilité pré-test de 50 %, associée à un résultat positif pour les FR, la probabilité post-test d'avoir la PR est de 85 %. Elle s'approche en revanche de 100 % quand les résultats des Ac anti-CCP (98,5 %) ou anti-MCV (95,5 %) sont positifs. On perçoit d'ailleurs que si le sujet ne présente aucun symptôme clinique (*probabilité pré-test proche de zéro*), la probabilité (post-test) d'avoir « quand même » la PR est de 40 % quand le résultat des Ac anti-CCP est positif; moins de 20 % avec les Ac anti-MCV, et moins de 5 % quand le dosage des FR a donné un résultat positif!

Plus encore il est possible de combiner les tests : les rapports de vraisemblance se multiplient alors [37]. Ainsi, avec une probabilité pré-test de 50 %, un individu suspect de PR mais avec un résultat d'Ac anti-CCP négatif, a encore 25 % de risque d'avoir la maladie, on l'a vu. Ce risque tombe à 10 % si le résultat des FR est aussi négatif (FR et anti-CCP négatifs; résultats non montrés).

Plus encore, avec cette démarche, on perçoit que le dosage des FR n'est peut-être pas utile en première intention. En effet, face à une suspicion clinique de PR, le seul résultat positif des Ac anti-CCP suffit à porter un diagnostic de

Figure 2 – Evolution des probabilités post-tests en fonction des résultats des dosages



Les résultats négatifs sont indiqués en traits noirs et les résultats positifs en traits grisés pour les FR (pointillés courts), les Ac anti-CCP (traits pleins) et les Ac anti-MCV (pointillés longs). Un exemple est pris avec une probabilité pré-test à 50 % : avant tout dosage, le clinicien estime que le patient a une « chance statistique » sur deux d'avoir une PR. Avec les tests évalués dans notre cohorte, le risque (probabilité post-test) d'avoir une PR reste de près de 25 % quand les résultats des FR (25,9 %), Ac anti-CCP (24,2 %) ou Ac anti-MCV (29,1 %) sont négatifs (①). La probabilité post-test d'avoir une PR en cas de résultat positif est de 85 % pour les FR (②), 95,5 % pour les Ac anti-MCV (③) et 98,5 % pour les Ac anti-CCP (④). Le calcul des probabilités pré- et post-tests est détaillé dans la référence [37].

certitude (probabilité post-test de plus de 90 %). Ce n'est qu'en cas de résultat négatif des Ac anti-CCP que le dosage des FR pourrait trouver une place rationnelle.

Dans cette étude, si les performances des dosages des Ac anti-MCV sont globalement comparables à celles des Ac anti-CCP2, elles leur restent inférieures. On a vu qu'un test biologique est utile quand il permet de générer une probabilité post-test de 90 % [37]. Si notre laboratoire dosait les Ac anti-MCV, cela se traduirait concrètement pour le clinicien par la nécessité de rassembler plus d'arguments (cliniques ou radiologiques) pour associer les symptômes observés chez le patient avec le diagnostic de PR en cas de résultat positif pour les Ac anti-MCV (probabilité pré-test = 30 % → probabilité post-test = 90 %) qu'en cas de résultat positif pour les Ac anti-CCP (probabilité

Tableau IV – Mesure des performances des coffrets de dosage des FR et ACPA à partir de notre cohorte.

	ASC	Seuil	Sensibilité (intervalle de confiance 95 %)	Spécificité (intervalle de confiance 95 %)	LR+	LR-
FR	0,83	6	69,7 (60,7 - 77,7)	87,74 (82,5 - 91,8)	5,68	0,35
Ac anti-CCP	0,86	7	68,6 (59,5 - 76,7)	98,99 (96,4 - 99,8)	67,91	0,32
Ac anti-MCV	0,84	20	59,8 (50,6 - 68,6)	97,17 (93,9 - 98,9)	21,14	0,41

ASC : aire sous la courbe ROC ; LR : likelihood ratio ou « rapport de vraisemblance » (+ : positif / - : négatif).

pré-test = 10 % → probabilité post-test = 90 %). On peut aussi imaginer des conséquences en termes de délai... Ces résultats vont dans le sens de la récente publication de van der Linden [39]. Dans notre cohorte, le dosage des Ac anti-MCV n'apporte rien en termes de gain par rapport au dosage des FR et des Ac anti-CCP. Seuls deux des malades souffrant de PR (sur 122) présentent des Ac anti-MCV sans FR ou Ac anti-CCP. Parmi les 39 patients qui ne présentent pas d'Ac anti-CCP, aucun ne présente de façon isolée des Ac anti-MCV. En revanche, 22 des patients (sur 39) qui n'ont pas d'Ac anti-MCV ont des FR ou des Ac anti-CCP. Parmi ces 22 patients, huit n'ont que des FR et quatre des Ac anti-CCP.

Dans cette cohorte, on observe aussi que 22 % (27/122) des malades n'ont aucun marqueur biologique de la PR. Ces chiffres semblent indépendants de la durée d'évolution car seuls quatre d'entre eux présentent une maladie qui évolue depuis moins de deux ans. Quarante pour cent de ces malades (11/27) présentent pourtant des érosions radiologiques, on ne peut donc pas dire que les PR séro-négatives sont moins sévères. Pour un malade sur cinq, le clinicien ne sera donc pas aidé par la biologie puisque

tous les marqueurs sériques actuels sont pris en défaut. Ces données laissent la place pour la recherche de marqueurs complémentaires, sachant qu'à l'heure actuelle aucun n'a fait la preuve de son intérêt.

5. Conclusion

Les biologistes doivent comprendre que le diagnostic de la PR a évolué. « Latex et WR » sont d'un autre siècle, époque où le diagnostic reposait sur la mise en évidence d'érosions radiologiques et où on se désespérait de voir s'aggraver le handicap chez ses malades parce que les traitements manquaient d'efficacité. Aujourd'hui, pour une prise en charge optimale de la PR, le diagnostic doit se faire rapidement grâce aux tests plus performants que sont les dosages des ACPA et des FR par ELISA. Le biologiste doit en mesurer quotidiennement les performances par la réalisation de contrôles de qualité, qui apportent en outre des informations importantes sur la précision des méthodes, et des résultats quantitatifs. C'est à ce prix que le clinicien pourra apprécier toute la portée des résultats biologiques qu'on lui rend.

Références

- [1] Quinn MA, Green MJ, Marzo-Ortega H, et al. Prognostic factors in a large cohort of patients with early undifferentiated inflammatory arthritis after application of a structured management protocol. *Arthritis Rheum* 2003;48(11):3039-45.
- [2] van der Helm-van Mil AHM, Verpoort K N, le Cessie S, et al. The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2007;56(2):425-32.
- [3] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31(3):315-24.
- [4] Majithia V, Geraci SA. Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am J Med* 2007;120:936-9.
- [5] Dubucquoi S. Diagnostic biologique de la polyarthrite rhumatoïde : anticorps anti-protéines et peptides citrullinés : la saga continue. *Rev Fr Labo* 2006;384bis:47-51.
- [6] Albarede S, Guyard A, Pham BN, et al. Contrôle national de qualité en auto-immunité : facteurs rhumatoïdes : Dossier auto-immunité. *Spectra Biologie* 1999;18(106):43-7.
- [7] <http://www.has-sante.fr>, Recommandations professionnelles : Polyarthrite rhumatoïde. Diagnostic et prise en charge initiale. 2007.
- [8] Ulvestad E, Kaneström A, Madland TM, et al. Clinical utility of diagnostic tests for rheumatoid factor. *Scand J Rheumatol* 2001;30(2):87-91.
- [9] Vasiliauskienė L, Wiik A, Høier-Madsen M. Prevalence and clinical significance of antikeratin antibodies and other serological markers in Lithuanian patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001;60:459-66.
- [10] Cordonnier C, Meyer O, Palazzo E, et al. Diagnostic value of anti-RA33 antibody, antikeratin antibody, antiperinuclear factor and antinuclear antibody in early rheumatoid arthritis: comparison with rheumatoid factor. *Br J Rheumatol* 1996;35(7):620-4.
- [11] Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, et al. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2000;2:236-43.
- [12] Saraux A, Berthelot JM, Chalès G, et al. Value of laboratory tests in early prediction of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;47(2):155-65.
- [13] Saraux A, Valls I, Voisin V, et al. How useful are tests for rheumatoid factors, antiperinuclear factors, antikeratin antibody, and the HLA DR4 antigen for the diagnosis of rheumatoid arthritis? *Rev Rhum Engl Ed* 1995;62(1):16-20.
- [14] Nienhuis RL Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis: the antiperinuclear factor (Apf).. *Ned Tijdschr Geneesk* 1965;109:1173-4.
- [15] Mallya RK, Young BJJ, Pepys MB, et al. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis: frequency and correlation with other features of the disease. *Clin Exp Immunol* 1983;51:17-20.
- [16] Vincent C, de Keyser F, Masson-Bessière C, et al. Anti-perinuclear factor compared with the so called «antikeratin» antibodies and antibodies to human epidermis filaggrin, in the diagnosis of arthritides. *Ann Rheum Dis* 1999;58:42-8.
- [17] Dejaco C, Klotz W, Larcher H, et al. Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R119.
- [18] Nielen MMJ, van der Horst AR, van Schaardenburg D, et al. Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1199-1204.
- [19] Humbel RL, Olsson NO. Le point sur les autoanticorps anti-protéines et anti-peptides citrullinés. *Biotribune* 2005;17:34-36.
- [20] van Venrooij WJ, Vossenaar ER, Zendman AJ. Anti-CCP antibodies: the new rheumatoid factor in the serology of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2004;3(Suppl 1):S17-9.
- [21] Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2006;65:845-51.
- [22] Matsui T, Shimada K, Ozawa N, et al. Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies for very early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33(12):2390-7.
- [23] Coenen D, Verschueren P, Westhovens R, et al. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 2007;53(3):498-504.
- [24] Vander Cruyssen B, Cantaert T, Nogueira L, et al. Diagnostic value of anti-human citrullinated fibrinogen ELISA and comparison with four other anti-citrullinated protein assays. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R122.
- [25] Bizzaro N. Antibodies to citrullinated peptides: a significant step forward in the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(2):150-7.
- [26] Goronzy JJ, Matteson EL, Fulbright JW, et al. Prognostic markers of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(1):43-54.

- [27] Vander Cruyssen B, Peene I, Cantaert T, et al. Anti-citrullinated protein/peptide antibodies (ACPA) in rheumatoid arthritis: specificity and relation with rheumatoid factor. *Autoimmun Rev* 2005;4:468-74.
- [28] Möttönen T, Paimela L, Leirisalo-Repo M, et al. Only high disease activity and positive rheumatoid factor indicate poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis treated with «sawtooth» strategy. *Ann Rheum Dis* 1998;57:533-9.
- [29] Kaltenhäuser S, Wagner U, Schuster E, et al. Immunogenetic markers and seropositivity predict radiological progression in early rheumatoid arthritis independent of disease activity. *J Rheumatol* 2001;28(4):735-44.
- [30] van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, et al. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54(4):1117-21.
- [31] Alessandri C, Bombardieri M, Papa N, et al. Decrease of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor following anti-TNFalpha therapy (infliximab) in rheumatoid arthritis is associated with clinical improvement. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1218-21.
- [32] Aotsuka S, Okawa-Takatsuji M, Nagatani K, et al. A retrospective study of the fluctuation in serum levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23(4):475-81.
- [33] Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Dell'Acqua D, et al. Adalimumab clinical efficacy is associated with rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody titer reduction: a one-year prospective study. *Arthritis Res Ther* 2006;8(1):R3.
- [34] Braun-Moscovici Y, Markovits D, Zinder O, et al. Anti-cyclic citrullinated protein antibodies as a predictor of response to anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33(3):497-500.
- [35] Chen HA, Lin KC, Chen CH, et al. The effect of etanercept on anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:35-9.
- [36] Mathsson L, Mullaizehi M, Wick MC, et al. Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum* 2008;58(1):36-45.
- [37] Delacour H, François N, Servonnet A, et al. Les rapports de vraisemblance: un outil de choix pour l'interprétation des tests biologiques. *Immunoanal Biol Spec* 2009;24(2):92-9.
- [38] Bossuyt X. Clinical performance characteristics of a laboratory test. A practical approach in the autoimmune laboratory. *Autoimmun Rev* 2009;8:543-8.
- [39] van der Linden MPM, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, et al. Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60(8):2232-41.

L'accréditation en auto-immunité

Françoise Fortenfant^{a,*}, Marie-France Taillefer^b

1. Introduction

La démarche d'accréditation va, à terme, s'imposer pour chaque laboratoire. Certains aspects de cette démarche, comme l'organisation de son système de management de la qualité, les exigences liées au pré- et au post-analytique ne présentent pas de particularités pour un laboratoire d'auto-immunité. Cependant, la validation des méthodes analytiques va confronter le biologiste à plusieurs difficultés spécifiques à l'auto-immunité [1-2]. La démarche d'accréditation n'impose pas de résoudre des problèmes insurmontables, mais de s'interroger sur sa pratique, et de mettre tout en œuvre pour répondre de façon adaptée aux questions posées. Le but ultime est d'être en mesure, à l'issue de cette démarche, de donner aux prescripteurs tous les éléments nécessaires à la bonne interprétation des résultats fournis. L'objet non exhaustif du présent article est d'identifier les principales difficultés rencontrées lors de la démarche d'accréditation d'un laboratoire d'auto-immunité et de suggérer des solutions ou les surmonter. Le lecteur pourra retrouver la définition des termes techniques utilisés ici dans la référence [1].

2. La spécificité du mesurande

L'activité mesurée lors d'un immunodosage est le résultat d'une réaction immunologique antigène-anticorps qui n'est pas nécessairement reliée à une activité biologique. La force de cette interaction non covalente est le reflet de l'affinité et de l'avidité de l'anticorps dosé. De nombreux paramètres sont susceptibles de l'influencer (nature et présentation de l'antigène, milieu réactionnel, nature de l'antisérum...).

Par ailleurs, les autoanticorps dosés dans le cadre d'une maladie auto-immune sont le plus souvent des anticorps polyclonaux. Au cours de l'évolution de la maladie, leur spécificité fine pour leur cible va évoluer conduisant à une variation d'affinité et d'avidité. Par conséquent, le biologiste

se trouve face à une difficulté pour évaluer la sensibilité d'une technique, car les résultats seront différents, selon que les échantillons utilisés seront prélevés au début de la maladie, en phase de poussée ou en rémission. De plus, la variabilité des techniques et des réactifs utilisés pour chaque type de technique pourra avoir des conséquences sur la reconnaissance antigène-anticorps. Cela impose des limites aux comparaisons inter-techniques.

3. La définition des populations

La sensibilité est un paramètre important à évaluer lors de la validation de techniques, notamment pour les techniques d'immunofluorescence indirecte, utilisées largement pour le dépistage en auto-immunité. Il faut définir s'il s'agit de la sensibilité analytique ou clinique. La sensibilité clinique va être très difficile à évaluer, notamment dans les maladies de système. Si l'on prend l'exemple de la recherche d'anticorps antinucléaires sur cellules HEP-2, il faudrait évaluer pour chaque type d'autoanticorps dépistable la sensibilité vis-à-vis des pathologies cibles (et ce en fonction du stade évolutif). Cela semble impossible à réaliser dans chaque laboratoire.

Cependant, les cellules HEP-2 sont reconnues de manière internationale comme étant le substrat de référence pour la recherche d'anticorps antinucléaires. Il existe même des recommandations internationales sur leur traitement technique. On peut donc considérer qu'il revient simplement au biologiste de valider la capacité des lames HEP-2 qu'il utilise à détecter les différents autoanticorps utiles au diagnostic.

La notion de sensibilité clinique sera évidemment plus facile à établir pour les substrats ne permettant de caractériser qu'un (ou un nombre très limité) d'autoanticorps, associé à un nombre lui aussi très limité de pathologies, ce qui est le plus souvent le cas pour les anticorps spécifiques d'organes.

4. La grande variabilité des techniques

Il existe une grande variabilité de techniques à la disposition du biologiste pour caractériser ou quantifier un autoanticorps. Cette variabilité se retrouve à différents niveaux :

- la recherche des autoanticorps peut se faire selon différents principes techniques qui influenceront la présentation de l'antigène : ELISA, immunodot, immunofluorescence indirecte, fluorimétrie en flux, immunoblot, chemiluminescence ;

- si deux kits font appel à la même technique (ELISA par exemple), de nombreux paramètres vont être susceptibles

a Laboratoire d'immunologie

Centre hospitalier universitaire – Hôpital Rangueil

1, av Jean Poulhès

31059 Toulouse cedex 9

b Laboratoire Biocentre

9, rue d'Hespel

59910 Bondues

* Correspondance

fortenfant.f@chu-toulouse.fr

© 2010 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

de varier, comme la nature de l'antigène fixé (recombinant ou purifié, origine...), la nature du conjugué, la nature des calibrateurs utilisés, la composition du milieu réactionnel et ils vont être critiques pour la qualité du test ;

- certaines techniques pourront être faites manuellement, source de variabilité inter-opérateur, ou à l'aide d'un automate. Il existe également de nombreux automates disponibles, dont les caractéristiques sont également variables (thermostatisation, qualité des lavages...).

5. Les techniques quantitatives

5.1. La standardisation

Le raccordement des matériaux de calibration doit être fait, dans l'idéal, par rapport à un matériel de référence. C'est exceptionnellement le cas en auto-immunité : anticorps anti-ADN et standard Wo/80 de l'OMS, anticorps anti-cardiolipides et anti-bêta2-gpl et standards de Sapporo, facteurs rhumatoïdes et standard 64/2 du NIBSC ou standard CLB 64/1 de l'OMS.

Dans les kits commerciaux, la traçabilité de ce raccordement doit être communiquée par le fournisseur. Quand il n'existe pas de standard international validé et reconnu, le fournisseur doit informer sur le matériel utilisé. Dans l'idéal ce matériel pourrait être utilisé dans le cadre d'essais intra-laboratoire ou mieux inter-laboratoires afin de vérifier la qualité de l'étalonnage in situ. En l'absence de matériel disponible, la traçabilité peut être vérifiée sur la base de références bibliographiques.

L'absence de standardisation va avoir plusieurs conséquences.

• **Pour les contrôles de qualité internes, elle implique l'absence de contrôles de qualité commerciaux avec des valeurs cibles et fourchettes validées sur différents systèmes analytiques [3].**

Les contrôles de qualité quantitatifs disponibles sont donc liés à une technique et proviennent du fournisseur de cette technique. Ce sont le plus souvent les « contrôles de kit ». Ces contrôles ne sont pas suffisants puisque, dans la plupart des cas, ils changent avec le lot de réactifs. Ils ne permettent donc pas de détecter une dérive dans la quantification des résultats d'un lot à l'autre de réactifs. Disposer de contrôles quantitatifs indépendants du kit est indispensable pour cela. Il en existe peu et ils proviennent du fournisseur de la technique. Le biologiste est donc contraint d'utiliser des contrôles de qualité quantitatifs « maisons » mais qui vont être à l'origine de nouvelles difficultés :

- il faut disposer d'une quantité suffisante d'échantillon pour assurer à la fois la validation du contrôle avec calcul de fourchette et de cible, et pour l'utilisation sur une durée suffisamment longue en tant que contrôle ;

- il faut pouvoir assurer la qualité de la conservation de l'échantillon tout au long de son utilisation ainsi que la stabilité de sa valeur quantitative, ce qui est parfois difficile, particulièrement pour des autoanticorps de classe IgM ou IgA.

• **Pour les contrôles de qualité externes, l'absence de standardisation crée des limites à l'exploitation des comparaisons inter-laboratoires**

Il n'y a pas de comparaisons inter-techniques possibles en matière de résultats quantitatifs puisque l'absence

de standardisation, et le plus souvent de technique de référence, rend impossible l'établissement d'une valeur « vraie ». La seule comparaison possible est celle au sein de groupes de pairs et cela restreint l'information au fournisseur utilisé.

• **Pour l'étalonnage au niveau du laboratoire d'analyse**, l'impossibilité de contrôler l'étalonnage interne, en l'absence de standard international (inexistant ou non disponible).

5.2. Les valeurs de référence

Le laboratoire est sensé établir ses propres valeurs de référence ou à défaut vérifier que celles annoncées par le fournisseur correspondent bien à la population explorée in situ. Pour cela le biologiste doit effectuer des dosages sur une population de sujets réputés sains. Il est cependant bien connu que des autoanticorps naturels peuvent être présents chez des sujets en dehors de toute pathologie diagnostiquée. Ce sont en général des autoanticorps polyréactifs de classe IgM, de faible affinité, mais ils peuvent également exister à des taux élevés. La difficulté sera de différencier ces anticorps naturels, d'anticorps « prédictifs » reflétant une pathologie en phase préclinique.

Il peut également être utile, pour déterminer la « zone grise », d'effectuer une comparaison avec les résultats obtenus sur une population atteinte de pathologies intervenant dans le diagnostic différentiel.

5.3. Caractéristiques techniques

La **fidélité** est facilement estimable par le calcul des coefficients de variation (CV), de répétabilité et de reproductibilité (+/- de comparaisons inter-laboratoires).

La **justesse** peut, elle, être évaluée par comparaison avec une méthode de référence lorsqu'elle existe, ce qui est rarement le cas en auto-immunité. A défaut, des comparaisons peuvent être réalisées avec des groupes de pairs (groupes d'utilisateurs de la même technique sur le même analyseur) et le calcul du z-score (nombre d'écarts types qui séparent le résultat du laboratoire de la moyenne du groupe de comparaison). Si ces données ne sont pas disponibles, la comparaison avec les valeurs des contrôles données par le fournisseur permettront une approche à minima de la justesse.

Dans la mesure où il n'y a pas de standard international, l'**exactitude** ne pourra être évaluée qu'indirectement par la comparaison avec les valeurs du fournisseur pour des matériaux de contrôle ou la comparaison avec des groupes de pairs.

La démarche de validation d'une méthode doit aboutir à une évaluation de l'**incertitude de mesure**. Une estimation de cette incertitude de mesure est indispensable au biologiste pour connaître le degré de confiance qu'il doit accorder à sa technique et pour pouvoir discuter l'interprétation des résultats avec les prescripteurs et les conseiller au mieux.

On peut approcher cette incertitude de mesure en estimant sa composante de fidélité (avec le contrôle de qualité interne) et sa composante de justesse (avec le contrôle de qualité externe), à l'aide de la formule ci-dessous :

$$ET = (CV)^2 + (B)^2$$

Le coefficient de variation (CV) du contrôle de qualité interne permet d'obtenir l'estimation de la fidélité. Il faut une trentaine de valeurs par niveau et par lot de contrôle.

Le calcul du biais B se fait en l'absence de technique de référence et de standardisation le plus souvent. Il faut donc partir d'un ensemble de résultats provenant d'un groupe de pairs, et calculer la moyenne des résultats d'un contrôle de qualité au sein de chaque laboratoire. La moyenne des moyennes (ou à défaut la valeur du fabricant) représentera la « valeur vraie ». Le biais représente la différence entre la moyenne du laboratoire et cette « valeur vraie ». On peut obtenir cette valeur en participant à un contrôle de qualité externe, mais il faut qu'il y ait suffisamment de participants utilisant la même technique.

5.4. Raccordement

Lors d'un changement de technique, le raccordement doit être tracé. C'est une difficulté majeure à laquelle le biologiste va se trouver confronté en auto-immunité. Lorsqu'il n'existe pas d'étalon international, la calibration des solutions étalons d'une trousse est effectuée avec les réactifs de cette trousse dans des conditions bien établies. Cela n'est évidemment pas transposable d'un kit à l'autre. Cependant, même s'il existe un standard international sur lequel divers fournisseurs vont s'étalonner, les résultats quantitatifs obtenus ne seront pas comparables le plus souvent. La principale raison est que la plupart des standards internationaux disponibles en auto-immunité ne sont constitués que d'un seul échantillon. On ne pourra donc constituer une gamme d'étalonnage qu'en procédant à des dilutions sériées de ce même standard. Une réaction antigène-anticorps, quand on dilue un échantillon, a en général une cinétique qui suit une courbe d'allure sigmoïde (elle peut prendre une autre allure en fonction de transformations mathématiques, ou, si l'on se place dans la partie linéaire de la courbe, se transformer en droite). Les paramètres de la courbe, en particulier son inclinaison, vont varier d'une trousse à l'autre, en fonction de différents facteurs : l'affinité de l'antisérum utilisé pour le standard international, l'affinité du standard pour la cible antigénique de la trousse. D'autres paramètres influent sur la réaction antigène-anticorps, comme la nature du milieu réactionnel, la qualité des lavages ou la standardisation des conditions techniques (température...). Ces facteurs semblent plus facilement standardisables et le biologiste est plus à même de déterminer, dans une comparaison, le meilleur système.

Par ailleurs, certains arguments de logique industrielle entrent également en ligne de compte : sur des structures très automatisées et notamment dans les techniques multiplexées de type Luminex®, le fournisseur recherche parfois une standardisation du rendu de résultat et peut donc être amené à appliquer un facteur de correction à l'étalonnage.

6. Les techniques qualitatives

La validation de techniques qualitatives impose moins de vérifications à faire au sein du laboratoire, mais elles sont cependant source de difficultés particulières.

6.1. Les anticorps rares

Pour rechercher ces autoanticorps rares, la technique la plus souvent utilisée est l'immunodot, pratique pour les recherches ponctuelles. L'évaluation des performances de ces tests pourrait être réalisée par des études statistiques de comparaisons de ses résultats avec l'aspect en immunofluorescence indirecte ou avec d'autres tests permettant l'identification de la cible quand ils existent. Un même laboratoire dispose rarement de deux types de tests permettant de caractériser une cible, il faudrait donc passer par le biais de comparaisons inter-laboratoires, qui permettraient de plus, de disposer d'un nombre plus important de ces échantillons rares. Ces méthodes ne pourront être validées que dans des centres importants avec accès aux données cliniques, pour explorer les cas discordants.

Par ailleurs, le plus souvent, il n'existe pas de matériel de contrôle commercial pour ces anticorps rares. Le biologiste a donc recours à des matériaux de contrôle « maisons » provenant d'échantillons issus du diagnostic. Là encore, la validation de ces matériaux « maisons », en l'absence de technique de référence, ne peut se faire que par échange inter-laboratoires.

Pour ces techniques, se pose également le problème de la validation de lot, qui nécessite également des matériaux de contrôles à passer systématiquement à chaque changement de lot, démarche rendue difficile économiquement du fait du faible débit d'utilisation de ce type de techniques qui impose donc des changements de lots fréquents. Dans ces circonstances, l'étude de la démarche qualité du fournisseur peut apporter une réponse tracée par un certificat d'analyse.

6.2. Estimation de l'incertitude de mesure [4]

Elle repose sur les techniques qualitatives sur l'analyse des facteurs susceptibles d'influencer le résultat de l'analyse. Il faut ensuite déterminer les principaux facteurs et décrire quelles sont les mesures préconisées pour en réduire l'influence. Si certains facteurs sont considérés comme négligeables, le choix doit être justifié de manière précise et argumentée.

Les techniques d'immunofluorescence indirecte où un titrage est effectué peuvent être considérées comme des techniques semi-quantitatives. Il est donc important d'essayer d'estimer l'incertitude de mesure et ce, d'autant plus que les résultats de cette technique seront utilisés pour suivre l'évolution de la maladie ou la réponse au traitement. Pour ce faire, après la démarche décrite ci-dessus pour l'aspect qualitatif de la technique, il conviendrait, dans l'idéal, d'ajouter un suivi de contrôle de qualité interne par le calcul du coefficient de variation sur le titre rendu. En pratique, cela présente de nombreuses difficultés :

- il est assez difficile d'utiliser, dans de petites séries, sur une lame, en plus du témoin négatif, plusieurs puits de titrage d'un témoin positif ;
- la question du niveau du témoin se pose : doit-on le choisir proche du seuil, de titre moyen ou élevé ? Doit-on en passer plusieurs ?

6.3. La robustesse

Ce paramètre pose souvent problème et donne lieu à diverses interprétations. Sa définition est l'aptitude d'une technique à donner le même résultat avec différents utilisateurs, pour différents lots de réactifs et dans différentes conditions opératoires.

En pratique, elle est le plus souvent évaluée par des essais inter-laboratoires. S'il existe des publications sur cet aspect de la technique, les références bibliographiques peuvent suffire. Si ce n'est pas le cas, ce paramètre risque d'être difficile à évaluer.

7. Conclusion

La validation de méthode dans le cadre de la démarche d'accréditation en auto-immunité est complexe mais passionnante. Elle nous amène à nous poser des questions sur notre pratique biologique quotidienne. Et même si toutes les questions soulevées n'obtiennent pas de réponse dans l'immédiat, elles ne peuvent qu'être source de progrès techniques, biologiques et d'amélioration de la qualité du service rendu aux prescripteurs et aux malades. Cependant, un travail important reste à faire avec les industriels afin d'améliorer la standardisation des méthodes.

Références

[1] COFRAC. Guide de validation de méthode. Document LAB GTA 04, Juin 2004.

[2] Vassault A, Grafmeyer D, de Graeve J, et al. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de technique. Ann Biol Clin 1999;57:685-95.

[3] COFRAC. Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale. Document LAB GTA 06, Juillet 2005.

[4] COFRAC. Guide d'évaluation des incertitudes de mesure des analyses de biologie médicale. Document LAB GTA 14, Novembre 2006.

Marqueurs sérologiques au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Catherine Johanet^{a,*}, Eric Ballot^a

1. Introduction

De nombreux anticorps (Ac) peuvent être mis en évidence au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Les mieux connus et les plus utilisés restent les Ac anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) de type pANCA atypiques (pANCAa) et les Ac anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). Leur dosage combiné apporte une aide au diagnostic différentiel entre maladie de Crohn (MC) et rectocolite hémorragique (RCH) et permet la caractérisation de certaines colites indifférenciées. Ce sujet a déjà été abordé lors des 2^e et 3^e Colloques du GEAI en 2002 et 2004 [1, 2], mais de nouveaux Ac ont été décrits ces dernières années essentiellement dans la MC : Ac anti-antigènes microbiens (Ac anti-*Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP), anti-porine OmpC d'*Escherichia coli*, anti-séquence I2 du *Pseudomonas fluorescens*, anti-flagelline CBir1...) et anti-glycanes. Ces marqueurs auraient un intérêt sur un plan pronostique puisqu'ils permettraient d'individualiser des sous-types de MC avec des profils évolutifs différents.

Après un bref rappel clinique, nous présenterons l'intérêt de ces différents marqueurs dans le diagnostic, le pronostic et la prise en charge thérapeutique des MICI en insistant sur les nouveaux Ac.

2. Aspects cliniques et mécanismes physiopathologiques

Les MICI (MC et RCH) sont des affections cryptogéniques ayant en commun une inflammation chronique de l'intestin, évoluant par poussées, avec un pic d'apparition chez l'adulte jeune. Environ 150 000 personnes sont atteintes de MICI dans notre pays.

Les mécanismes physiopathologiques multifactoriels de ces maladies sont complexes et mal élucidés. Il est admis que les MICI sont caractérisées par une dysrégulation de la réponse immunitaire muqueuse, dirigée contre des éléments du microbiote intestinal, chez des individus

génétiquement prédisposés [3]. Cette perte de tolérance concerne de nombreuses bactéries, notamment *Escherichia coli* et est à l'origine de réactions antigéniques croisées. L'inflammation est médiée par les cellules de l'immunité innée (stimulation anormale des cellules résidentes de la muqueuse intestinale) et adaptative, avec une réponse de type Th1 pour la MC et Th2 pour la RCH [3].

La RCH correspond à une inflammation chronique de la muqueuse du côlon avec atteinte rectale quasi constante. Au contraire, la MC peut toucher tous les segments du tube digestif. Les manifestations cliniques dépendent du siège et de l'étendue des lésions. Les poussées peuvent être émaillées de complications (occlusions, perforations, abcès, fistules...). Des manifestations extra-intestinales peuvent également s'observer [4] : arthrite, mais surtout cholangite sclérosante primitive pour la RCH ; arthrite, manifestations cutanées (érythème noueux), hépatobiliaires (calculs vésiculaires), rénales (fistule entérovésicale, calcul rénaux), oculaires pour la MC.

Le diagnostic repose principalement sur l'endoscopie qui permet d'effectuer des biopsies rectocoliques étagées multiples (lésions continues et superficielles pour la RCH, lésions discontinues, transmuraux pour la MC). La classification des MICI de Montréal en 2006 [5] est essentiellement basée sur des critères anatomiques et l'utilisation des Ac n'y est pas recommandée du fait de leurs sensibilités modérées. Cependant, l'utilisation de profil sérologique incluant les nouveaux Ac, prématurée aujourd'hui, est évoquée et pourrait apparaître dans les 5 à 10 prochaines années.

3. Les différents marqueurs

Si les pANCAa et les ASCA sont actuellement les seuls marqueurs couramment utilisés dans les MICI, de nombreux autres Ac ont été rapportés [6-21]. Le **tableau I** résume leurs techniques de détection et cibles antigéniques.

4. Intérêt des anticorps comme marqueurs diagnostiques des MICI et dans le diagnostic différentiel entre RCH et MC

La fréquence des différents Ac observée au cours des MICI reste modérée [6-21] (**tableau II**), ce qui limite leur intérêt dans le dépistage des MICI. De plus, ces Ac ont également été décrits dans d'autres pathologies : pANCAa dans les hépatopathies auto-immunes (cholangite sclérosante primitive, hépatite auto-immune) ; ASCA dans la

^a Unité d'immunologie

Hôpital Saint-Antoine
184, rue du Faubourg Saint-Antoine
75571 Paris cedex 12

* Correspondance

catherine.johanet@sat.aphp.fr

© 2010 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

maladie cœliaque, la maladie de Behçet, la spondylarthrite ankylosante, la cirrhose biliaire primitive ; anti-I2 dans la maladie cœliaque.

Dans le diagnostic différentiel entre MC et RCH, de nombreuses études rétrospectives ont mis en exergue les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives des dosages combinés ASCA/ANCA. En effet, deux profils peuvent être définis : l'un, pANCAa+/ASCA-, associé à la RCH (VPP : 82 à 100 %), et l'autre, pANCAa-/ASCA+, associé à la MC (VPP : 75 à 96 %) [6-8, 10, 12, 22].

Une étude prospective multicentrique a montré que la présence du profil pANCAa+/ASCA- chez des patients ayant une colite inclassée avait prédit le diagnostic de RCH après un an d'évolution dans 65 % des cas alors que le profil pANCAa-/ASCA+ avait prédit le diagnostic de MC dans 80 % des cas [23]. Les patients séronégatifs pANCAa-/ASCA- ont été suivis pendant dix ans et 85 % de ces patients séronégatifs conservent un diagnostic de colite indéterminée après dix ans d'évolution [23].

L'ajout des dosages d'anti-OmpC et d'anti-I2 n'apporte pas d'aide diagnostique complémentaire [24, 25]. Il en est de même de l'ajout des anti-glycanes (ACCA, ALCA) initialement proposé par Dotan et al. [7], des études récentes [18, 19] ne recommandent pas ces marqueurs dans le diagnostic différentiel entre RCH et MC.

En revanche, de nouvelles techniques de dosage d'ASCA utilisant un panel d'oligomannoses synthétiques (A Σ MA) montrent une hétérogénéité dans la réponse à ces différents mannoses et les dosages combinés ASCA/A Σ MA pourraient permettre d'augmenter la sensibilité [26].

5. Intérêt des anticorps comme marqueur pronostique des MICI : anticorps et phénotypes cliniques

5.1. RCH

Dans la RCH, la présence de pANCAa est associée à un risque accru de formes agressives voire de résistance au traitement, de recours à un geste chirurgical et de pouchite chronique post-anastomose iléo-anale [12, 27, 28].

5.2. MC

Dans la MC, de nombreux travaux ont recherché une association entre le phénotype de la maladie et la réponse immunitaire. La présence de pANCAa et plus particulièrement du profil pANCAa+/ASCA- semble être associée à un phénotype clinique purement colique, sans atteinte iléale et définit un sous-groupe de MC « RCH-like » [1, 23].

La présence d'ASCA est souvent corrélée à un âge précoce de survenue de la MC [6, 8, 12], à une atteinte du grêle [6, 13] et à une forme agressive de la maladie (atteintes grêliques perforantes ou sténosantes nécessitant le recours à la chirurgie) [6, 12].

Les Ac dirigés contre un antigène microbien (anti-OmpC, anti-I2, anti-CBir) sont également associés aux formes agressives de MC [6, 11, 13]. Les anti-OmpC sont plus particulièrement associés aux atteintes perforantes et les anti-I2, aux sténoses du grêle [13]. Dubinsky et al. [11] ont aussi montré, dans une cohorte d'enfants ayant un suivi moyen

Tableau I – Anticorps détectés au cours des MICI : techniques de détection et cibles antigéniques reconnues.

Anticorps	Cible antigénique	Détection
pANCAa	Nombreuses. La plus récente : bêta-tubuline	IFI sur polynucléaires humains fixés à l'éthanol. Fixation au formol et au méthanol dans certains cas
ASCA	Mannotétraose de <i>S. cerevisiae</i>	IFI ou ELISA
Anti-PEX	Glycoprotéines GP2 et CUZD1 localisées dans les sécrétions pancréatiques exocrines	IFI (pancréas humain ou primate)
Anti-OMPc	Porine C d' <i>Escherichia coli</i>	ELISA
Anti-I2	Séquence de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	ELISA
Anti-flagelline	CBir1, flagelline	ELISA
Anti-MAP	Protéines P35, P36, IS900GST	ELISA (protéines purifiées ou recombinantes)
ALCA	Laminaribioside : résidu de glucose	ELISA
ACCA	Chitobioside : résidu de N acétyl-glucosamine	ELISA
AMCA	Mannobioside : résidu de mannose et de glucose	ELISA
Anti-UBE4A	Sous unité C-terminale de UBE4A	ELISA

pANCAa : anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles de type pANCA atypique ; **ASCA** : anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* ; **anti-PEX** : anti-pancréas exocrine ; **anti-OMPc** : anti-outer membrane porin C ; **anti-MAP** : anti-*Mycobacterium avium paratuberculosis* ; **ALCA** : anti-laminaribioside carbohydate ; **ACCA** : anti-chitobioside carbohydate ; **AMCA** : anti-mannobioside carbohydate ; **anti-UBE4A** : anti-ubiquitine facteur E4A ; **CUZD1** : CUB/zona pellucida like domain-containing protein ; **IS900GST** : Insertion Element 900 de la glutathion S-transférase ; **IFI** : immunofluorescence indirecte.

Tableau II – Fréquence des différents anticorps au cours des MICI.

	Maladie de Crohn	RCH	Contrôles sains
pANCAa (IgG)	10 à 29 %	31 à 80 %	0 à 3 %
ASCA (IgA/IgG)	27 à 81 %	5 à 27 %	0 à 5 %
Anti-PEX (IgG)	30 à 37 %	2 à 8 %	0 à 2 %
Anti-OMPc (IgA/IgG)	22 % (enfant) à 56 % (adulte)	5 à 11 %	5 %
Anti-I2 (IgA)	26 % (enfant) à 59 %	10 %	4 à 10 %
Anti-flagelline (CBir1) (IgG)	53 à 56 %	4 à 6 %	8 %
Anti-MAP (IgG)	37 à 89 %	15 à 34 %	0 à 34 %
ALCA (IgG)	17 à 27 %	4 à 7 %	2 %
ACCA (IgA)	20 à 27 %	5 à 15 %	12 à 15 %
AMCA (IgG)	28 à 31 %	18 %	8 %
Anti-UBE4A (IgG)	46 %	7 %	3 %

pANCAa : anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles de type pANCA atypique ; **ASCA** : anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* ; **anti-PEX** : anti-pancréas exocrine ; **anti-OMPc** : anti-outer membrane porin C ; **anti-MAP** : anti-*Mycobacterium avium paratuberculosis* ; **ALCA** : anti-laminaribioside carbohydate ; **ACCA** : anti-chitobioside carbohydate ; **AMCA** : anti-mannobioside carbohydate ; **anti-UBE4A** : anti-ubiquitine facteur E4A.

de 18 mois, que la rapidité d'apparition des complications était fonction de l'ampleur de la réponse immunitaire (taux et nombre d'Ac). La fréquence des formes évolutives était 11 fois plus élevée lorsque quatre Ac étaient présents (ASCA, anti-OmpC, anti-I2, anti-CBir) et 5,5 fois plus élevée avec trois Ac, comparativement aux MC sans Ac. Par ailleurs, les anti-CBir semblent définir un phénotype particulier car ce sont les seuls Ac associés de façon indépendante à une forme agressive de MC (forme iléale, pénétrante et fibrosante) [14, 29]. Ces Ac semblent également liés à une MC à début très précoce (avant 7 ans) [30]. Parmi la population de MC ayant des pANCAa, la fréquence des anti-CBir est de 40 % vs 4 % dans les RCH pANCAa positives [29]. Cependant il a clairement été montré une association négative entre la présence d'anti-CBir et le phénotype « RCH-like » (fréquence des anti-CBir : 38,5 % pour le phénotype RCH-like vs 62 % pour les autres phénotypes) [14].

Les relations entre anti-MAP et le phénotype clinique de MC ont été peu étudiées. Nakase et al. [31] ont montré un taux d'Ac plus élevé dans les formes iléales que dans les formes limitées au colon. Notre propre étude (non publiée) n'a pas montré de relation entre la présence d'anti-MAP et le phénotype clinique, à l'exception d'une augmentation des manifestations extra-intestinales (arthrites principalement : 45 % dans les MC avec anti-MAP vs 13 % dans les MC sans anti-MAP).

Les résultats observés concernant les anti-glycanes sont controversés. Si plusieurs études les associent aux formes agressives de MC (formes iléales pénétrantes et sténosantes) [18, 32] ainsi qu'à un âge précoce de survenue de la maladie pour les ALCA [32], une étude récente ne retrouve aucune association entre anti-glycane et phénotype clinique [19].

6. Intérêt des anticorps dans la prise en charge thérapeutique des MICI

Quatre études ont testé l'hypothèse d'une association entre les marqueurs pANCAa/ASCA et la réponse à l'infliximab [33-36]. Les résultats obtenus sont contradictoires pour le profil pANCA+/ASCA- (2 études positives et 2 études négatives) mais concordants pour le profil pANCA-/ASCA+ : les ASCA ne sont pas un marqueur sérologique prédictif de la réponse au traitement par infliximab.

De même, la présence d'anti-OmpC ne serait pas prédictive de la réponse aux corticoïdes ou à l'infliximab [37]. Mais il existe peu d'études concernant ces marqueurs. Cependant, le profil d'anticorps antimicrobiens pourrait peut-être aider au choix de l'antibiothérapie. L'étude de Mow et al. [38] a montré que les MC avec anti-OmpC et anti-I2 répondent mieux au traitement budésone + antibiothérapie alors que les MC séronégatives pour ces Ac répondent mieux au traitement par budésone seul. La présence d'anti-I2 pourrait également prédire la réponse clinique à une chirurgie de diversion au cours de la MC. Spivak et al. [39], sur 27 patients, ont montré que 14/16 patients anti-I2+ ont eu une réponse clinique postopératoire favorable vs 2/11 patients anti-I2-.

7. Intérêt des anticorps comme marqueurs de susceptibilité génétique

Actuellement, la présence de pANCAa ne semble pas être un marqueur de susceptibilité génétique à la RCH. En revanche, plusieurs observations concernant les ASCA [6, 22], une observation concernant les anti-OmpC [40] et l'étude de Simondi et al. [41] concernant les ALCA seraient compatibles avec le rôle de ces Ac comme marqueurs de prédisposition génétique à la MC.

8. Conclusion

L'utilité clinique des marqueurs sérologiques dans les MICI reste limitée. La recherche combinée des pANCAa et des ASCA apporte une aide au diagnostic différentiel entre MC et RCH et permet la caractérisation de certaines colites indifférenciées. La recherche des Ac anti-antigènes microbiens se développe dans la MC. Si ces Ac ne présentent pas d'intérêt sur le plan du diagnostic et du suivi thérapeutique des patients, la plupart des études s'accorde pour les associer aux formes agressives de MC. De plus, la sévérité de la maladie serait proportionnelle au nombre d'Ac anti-antigènes microbiens présents. Une stratification faite sur l'amplitude de ces Ac pourrait ainsi isoler des formes à potentiel évolutif sévère pour lesquelles des traitements de première ligne plus agressifs pourraient être proposés. Ceci reste à démontrer par des études complémentaires sur de larges cohortes indépendantes tenant compte de la classification de Montréal [5].

Références

- [1] Escande A. Anticorps associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Rev Fr Lab* 2002;341bis:35-40.
- [2] Desplat-Jégo S. Pourquoi et comment détecter des anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) en 2004 ? *Rev Fr Lab* 2004;361bis:45-7.
- [3] Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006;12(30):4807-12.
- [4] Danese S, Semerano S, Papa A, et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005;11(46):7227-36.
- [5] Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749-53.

- [6] Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2006;52:171-81.

- [7] Dotan I, Fishman S, Dgani Y, et al. Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006;131:366-78.

- [8] Desplat-Jégo S, Johanet C, Escande A, et al. Update on anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies, anti-nuclear associated anti-neutrophil antibodies and antibodies to exocrine pancreas detected by indirect immunofluorescence as biomarkers in chronic inflammatory bowel diseases: results of a multicenter study. *World J Gastroenterol* 2007;13: 2312-8.

- [9] Solberg IC, Lygren I, Cvanarova M, et al. Predictive value of serologic markers in a population-based Norwegian cohort with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:406-14.

- [10] Mokrowiecka A., Daniel P., Slomka M., Majak P., Malecka-Panas E. Clinical utility of serological markers in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2009;56:162-6.
- [11] Dubinsky MC, Lin YC, Dutridge D, et al. Serum immune responses predict rapid disease progression among children with Crohn's disease: Immune responses predict disease progression. *Am J Gastroenterol* 2006;101(2):360-7.
- [12] Papp M, Norman GL, Altorjay I, et al. Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: gadget or magic? *World J Gastroenterol* 2007;13(14):2028-36.
- [13] Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin YC, et al. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:414-24.
- [14] Papadakis KA, Yang H, Ippoliti A, et al. Anti-flagellin (CBir1) phenotypic and genetic Crohn's disease associations. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(5):524-30.
- [15] Suenaga K, Yokoyama Y, Nishimori I, et al. Serum antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1999;44(6):1202-7.
- [16] Naser SA, Hulten K, Shafran I, et al. Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of *M avium* subsp *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 2000;77:497-504.
- [17] Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, et al. Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):1129-35.
- [18] Ferrante M, Henckaerts L, Joossens M, et al. New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut* 2007;56(10):1394-403.
- [19] Malickova K, Lakatos PL, Bortlik M, et al. Anticarbhydrate antibodies as markers of inflammatory bowel disease in a central European cohort. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22(2):144-50.
- [20] Sakiyama T, Fujita H, Tsubouchi H. Autoantibodies against ubiquitination factor E4A (UBE4A) are associated with severity of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(3):310-7.
- [21] Roggenbuck D, Hausdorf G, Martinez-Gamboa L, et al. Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. *Gut* 2009;58(12):1620-8.
- [22] Roblin X. Intérêt des marqueurs sérologiques au cours des maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin. *Hépatogastro* 2006;13:33-7.
- [23] Joossens S, Reinisch W, Vermeire S, et al. The value of serologic markers in indeterminate colitis: a prospective follow-up study. *Gastroenterology* 2002;122:1242-7.
- [24] Joossens S, Colombel JF, Landers C, et al. Anti-outer membrane of porin C and anti-I2 antibodies in indeterminate colitis. *Gut* 2006;55:1667-9.
- [25] Davis MK, Andres JM, Jolley CD, et al. Antibodies to *Escherichia coli* outer membrane porin C in the absence of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies are an unreliable marker of Crohn disease and ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;45(4):409-13.
- [26] Vandewalle-El Khoury P, Colombel JF, Joossens S, et al. Detection of antisynthetic mannoside antibodies (ASigmaMA) reveals heterogeneity in the ASCA response of Crohn's disease patients and contributes to differential diagnosis, stratification, and prediction. *Am J Gastroenterol* 2008;103(4):949-57.
- [27] Mokrowiecka A, Gasiorowska A, Malecka-Panas E. pANCA and ASCA in the diagnosis of different subtypes of inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2007;54(77):1443-8.
- [28] Fleshner PR, Vasiliauskas EA, Kam LY, et al. High level perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody (pANCA) in ulcerative colitis patients before colectomy predicts the development of chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. *Gut* 2001;49:671-7.
- [29] Targan SR, Landers CJ, Yang H, et al. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;128:2020-8.
- [30] Markowitz J, Kugathasan S, Dubinsky M, et al. Age of diagnosis influences serologic responses in children with Crohn's disease: a possible clue to etiology? *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(5):714-9.
- [31] Nakase H, Nishio A, Tamaki H, et al. Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Japanese patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(1):62-9.
- [32] Li X, Conklin L, Alex P. New serological biomarkers of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14(33):5115-24.
- [33] Taylor KD, Plevy SE, Yang H, et al. ANCA pattern and LTA haplotype relationship to clinical responses to anti-TNF antibody treatment in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001;120:1347-55.
- [34] Esters N, Vermeire S, Joossens S, et al. Serological markers for prediction of response to anti-tumor necrosis factor treatment in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97(6):1458-62.
- [35] Arnott IDR, McNeill G, Satsangi J. An analysis of factors influencing short-term and sustained response to infliximab treatment for Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1451-7.
- [36] Ferrante M, Vermeire S, Katsanos KH, et al. Predictors of early response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:123-8.
- [37] Papp M, Altorjay I, Norman GL, et al. Seroreactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with ileal involvement, noninflammatory disease behaviour and *NOD2/CARD15* genotype, but not with risk for surgery in a Hungarian cohort of IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(8):984-92.
- [38] Mow WS, Landers CJ, Steinhart AH, et al. High-level serum antibodies to bacterial antigens are associated with antibiotic-induced clinical remission in Crohn's disease: a pilot study. *Dig Dis Sci* 2004;49(7/8):1280-6.
- [39] Spivak J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, et al. Antibodies to I2 predict clinical response to fecal diversion in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(12):1122-30.
- [40] Mei L, Targan SR, Landers CJ, et al. Familial expression of anti-*Escherichia coli* outer membrane porin C in relatives of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006;130:1078-85.
- [41] Simondi D, Mengozzi G, Betteto S, et al. Antiglycan antibodies as serological markers in the differential diagnosis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(5):645-51.

Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles de spécificités autres qu'anti-protéinase 3 ou anti-myéloperoxydase : corrélations clinico-biologiques

Maxime Boyer^a, Alain Chevailler^{a,b,*}

1. Introduction

Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA pour *anti neutrophil cytoplasmic antibodies*) sont des autoanticorps dirigés contre des constituants antigéniques présents dans les granules des polynucléaires neutrophiles (PNN), principalement les granules primaires (azurophiles ou alpha) et dans les lysosomes des monocytes. Ce sont de bons marqueurs sérologiques pour le diagnostic des patients atteints de vascularites systémiques nécrosantes [1] telles que la granulomatose de Wegener et la polyangéite microscopique (MPA). La positivité des ANCA et l'identification de leur cible antigénique est une aide précieuse au diagnostic des vascularites [2], dont la classification adoptée par la conférence de consensus à Chapel Hill est toutefois toujours basée sur des critères cliniques et histologiques [3].

En 1982, Davies et coll. sont les premiers à décrire des glomérulonéphrites nécrosantes à ANCA [4]; à l'époque ces auteurs avaient évoqué une possible liaison à une arbovirose. Depuis, l'éventail des maladies associées aux ANCA et le panel d'antigènes contre lesquels ils sont dirigés se sont élargis. En 1984, Hall et coll. retrouvaient des ANCA chez quatre patients atteints d'une vascularite systémique dont trois avaient une glomérulonéphrite nécrosante focale [5]. En 1985, Van der Woude et coll. démontraient l'association des ANCA avec la granulomatose de Wegener et suggéraient qu'ils puissent être utilisés comme marqueurs de l'activité de la maladie [6]. Les ANCA ont ensuite été décrits au cours de la MPA et du syndrome de Churg et Strauss [7].

^a Laboratoire d'immunologie et d'allergologie

Centre hospitalier universitaire

4, rue Larrey

49033 Angers cedex 09

^b UMR_S 892

Université d'Angers – Angers

* Correspondance

AlChevailler@chu-angers.fr

2. Détection par immunofluorescence indirecte

Lors du premier congrès de Copenhague en 1988, la méthode de référence adoptée pour leur détection est l'immunofluorescence indirecte (IFI) sur PNN humains normaux fixés à l'éthanol [8]. Falk et Jennette [9] ont été les premiers à décrire l'aspect périnucléaire des ANCA (pANCA) chez des patients atteints de glomérulonéphrite nécrosante et micropolyangéite (MPA). Ils ont identifié la myéloperoxydase (MPO) comme principale cible antigénique de ces pANCA. Par ailleurs Lüdeman et al. [10] ont montré que les ANCA à fluorescence cytoplasmique (cANCA) retrouvés dans la maladie de Wegener sont dirigés principalement contre la protéinase 3 (PR3), identifiée initialement par Goldschmeding [11].

Dans certaines maladies, la relation étroite entre le taux d'ANCA et l'activité de celles-ci suggère leur rôle pathogène. Les ANCA activeraient les PNN et les monocytes dans les vaisseaux de petit calibre et les capillaires glomérulaires, ce qui aboutirait aux lésions anatomiques, avec infiltrat inflammatoire et nécrose qui caractérisent ces vascularites systémiques [12].

Depuis, un troisième type de fluorescence a été individualisé et appelé aANCA (atypical ANCA); dans ce cas la fluorescence est mixte, mélange des deux précédentes, cytoplasmique fine, à discret renforcement nucléaire [13].

Abréviations

AAN : anticorps antinucléaires

ANCA : antineutrophil cytoplasmic autoantibodies

ASCA : anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae*

BPI : bactericidal permeability increasing protein

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

h-lamp-2 : human lysosomal membrane protein 2

HEp-2 : human epithelioma 2

IFI : immunofluorescence indirecte

LPS : lipopolysaccharide

MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin

MPA : micropolyangéite

MPO : myéloperoxydase

PNN : polynucléaire neutrophile

PR3 : protéinase 3

3. Cibles autoantigéniques des ANCA

Il existe deux cibles antigéniques majeures des ANCA : la PR3 et la MPO [1]. Cependant il existe d'autres cibles antigéniques dites mineures, la lactoferrine, la cathepsine G, l'élastase, la BPI (*bactericidal permeability increasing protein*), l'azurocidine, les défensines, la h-lamp 2 (*human lysosomal membrane protein 2*), le lysozyme, la β -glucuronidase, et l' α -énolase mais seulement les quatre premières sont détectables par les techniques commercialisées et utilisées au laboratoire [1]. Ce type d'ANCA a principalement été décrit au cours des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) [14], de la mucoviscidose [15], ainsi que dans d'autres pathologies chroniques.

Principale cible antigénique des cANCA, la PR3, molécule de 29 kDa ayant les caractéristiques d'une protéase à sérine, avait été isolée précédemment par Kao comme une enzyme protéolytique clivant l'élastine, l'hémoglobine, la fibronectine, la laminine, la vitronectine, le collagène de type IV [16]. La PR-3 est une protéine monocaténaire de 228 acides aminés. C'est l'une des quatre protéases à sérine présentes dans les granules primaires des PNN, avec la cathepsine G, l'élastase et l'azurocidine. Elle est la cible antigénique préférentielle des ANCA dans la granulomatose de Wegener [17]. Cette protéine détruit les bactéries dans les phagosomes en collaboration avec l'élastase, la cathepsine G et les radicaux libres d'oxygène [16]. A la différence de l'élastase, de la myéloperoxydase et de la cathepsine G, la PR3 est aussi présente dans les granules secondaires et les vésicules [18].

Environ 50 % des pANCA retrouvés chez les patients atteints de vascularite systémique ou de glomérulonéphrite extra-capillaire à faible composant immunitaire (« pauci-immune » des Anglo-Saxons) sont spécifiques de la MPO. Cette enzyme avait été décrite en 1941 sous le nom de verdoperoxydase. Elle est contenue dans les granules azurophiles. Il s'agit d'un oxydant puissant qui permet la production d'acide hypochloreux. Cet acide est un puissant agent bactériolytique capable d'inactiver les inhibiteurs des protéases, et peut donc avoir un effet indirect dans la dégradation tissulaire observée dans les désordres inflammatoires [19]. Cette molécule se présente sous forme de deux dimères $\alpha\beta$ identiques associés chacun à une molécule d'hème. Les anticorps anti-MPO sont retrouvés dans 70 % des glomérulonéphrites extra-capillaires pauci-immunes, 60 % des syndromes de Churg et Strauss et 10 % des maladies de Wegener [1].

La BPI est une protéine cationique antimicrobienne de 57 kDa présente dans les granules primaires des PNN. Elle a une action cytotoxique contre les bactéries à Gram négatif [20, 21] en se liant à leurs lipopolysaccharides (LPS) et a des effets cytotoxiques et neutralisants sur les endotoxines libérées. Dans 50 % des cas, les anticorps anti-BPI ont un aspect cANCA. Il est de plus démontré que près de la moitié des anticorps anti-BPI sont négatifs en IFI [22]. Les ANCA dirigés contre la BPI sont retrouvés dans 45 % des vascularites ANCA-IFI positives mais PR3 et MPO négatives [23]. Parmi les pathologies associées, on retrouve principalement les maladies inflammatoires

chroniques intestinales [24]. Initialement désignés comme marqueurs de mucoviscidose, il est désormais clairement démontré que les ANCA dirigés contre la BPI sont, dans cette pathologie, des marqueurs de colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* [25].

La lactoferrine est une protéine présente dans le lait, la sueur, la salive et dans les granules secondaires des PNN, constituée d'une seule chaîne de 692 acides aminés et de 78 kDa. Les anticorps anti-lactoferrine ont été retrouvés dans de rares cas de connectivites, et, tout comme les anticorps anti-élastase et les anticorps anti-azurocidine, dans les vascularites iatrogènes (notamment à l'hydralazine) [26].

L'élastase et la cathepsine G sont avec la PR3, les deux autres protéases à sérine des granules primaires. Elles ont le même poids moléculaire de 29 kDa, et une forte homologie de séquence, notamment dans la région du site enzymatique [25].

L'azurocidine est une protéine cationique de 27 kDa présentant une homologie structurale avec la PR3, la cathepsine G et l'élastase. Contrairement à ces dernières molécules, elle n'a cependant pas d'activité enzymatique en raison de deux mutations touchant le site enzymatique (His \rightarrow Ser et Ser \rightarrow Gly). Les anticorps anti-azurocidine représentent 10 % des ANCA. Ils sont principalement retrouvés en association avec d'autres spécificités (MPO, lactoferrine), surtout dans les vascularites induites par l'hydralazine [27].

Les défensines sont de petits peptides à activité antibiotique qui sont les constituants majeurs des granules des PNN puisqu'ils représentent de 5 à 18 % des protéines. Ils sont très homologues puisque les trois quarts ne diffèrent que par leur dernier acide aminé. Une étude a retrouvé des anticorps anti-défensine dans 100 % des cas de sowda (noir en arabe, en raison de la couleur de la peau), forme particulière d'infection par un parasite, *Onchocerca volvulus* [28].

Des ANCA dirigés contre une protéine de 170/80-110 kDa des membranes des granules des polynucléaires, la h-lamp-2 (*human lysosomal membrane protein 2*), ont été décrits dans 90 % de glomérulonéphrites extra-capillaires idiopathiques. Une protéine glomérulaire de 130 kDa présente une antigénicité croisée avec la h-lamp 2 et pourrait expliquer la survenue des glomérulonéphrites [29]. Le même groupe, qui avait précédemment identifié la h-lamp-2 comme nouvelle cible des ANCA, a démontré une reconnaissance croisée entre celle-ci et la protéine FimH1, protéine fimbriale des bactéries à Gram négatif. L'immunisation de rats par FimH-1 génère des ANCA anti-h-lamp-2 et déclenche une vascularite rénale [30].

Les ANCA dirigés contre ces antigènes mineurs n'ont à ce jour pas le même poids diagnostique que les cANCA anti-PR3 ou les pANCA anti-MPO. Dans une étude récente [31], on les retrouve dans 80 % des sérums positifs en IFI pour les ANCA mais négatifs pour les spécificités MPO ou PR3. Ils sont souvent multispécifiques, témoins d'une inflammation ou d'une infection chronique.

Le but de cette revue, à propos de l'étude monocentrique d'une cohorte de patients, est de rechercher s'il existe une association clinique pertinente entre les ANCA de spécificités mineures et certaines pathologies.

Tableau I – Données épidémiologiques.

Patients	73	
Sexe	Féminin	40
	Masculin	33
Age moyen (années)	48,26	
Ecart-type (années)	29,69	
Âges extrêmes (années)	1 à 86	

4. Patients et méthodes

4.1. Population étudiée

Soixante-treize patients ont été recrutés de manière rétrospective de 2001 à 2009. Le nombre de femmes et d'hommes est respectivement de quarante et trente-trois avec une moyenne d'âge de 48,3 ans (*tableau I*). Les patients sont issus en majeure partie du centre hospitalier universitaire d'Angers mais aussi des centres hospitaliers voisins (Poitiers, Saint-Nazaire et la Roche-sur-Yon) (*tableau II*).

Dans ce travail, ont été inclus des patients pour lesquels la recherche d'ANCA par IFI était positive, quel que soit le type de fluorescence observé, et pour lesquels les tests en phase solide retrouvaient soit une monospécificité envers l'un des antigènes mineurs (lactoferrine, cathepsine G, élastase, BPI), soit une multispécificité antigénique incluant ou non aussi l'un des deux antigènes majeurs (PR3 et MPO).

4.2. Détection des ANCA

Pour le dépistage des ANCA, nous avons utilisé la méthode de référence à savoir l'IFI sur PNN humains fixés à l'aide de différents fixateurs (éthanol, formol et méthanol) ainsi que la recherche parallèle d'anticorps antinucléaires (AAN) sur cellules HEP-2 (Euroimmun distribué par Bio-Advance). En cas de positivité de l'IFI, la spécificité des ANCA est recherchée par des méthodes de type ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*):

- ANCA profil (Euroimmun distribué par Bio-Advance) qui permet la recherche simultanée de six spécificités antigéniques : PR3, MPO, lactoferrine, élastase, cathepsine G, et BPI;
- ELISA monospécifique recherchant les anticorps anti-PR3 (Euroimmun distribué par Bio-Advance);
- ELISA monospécifique recherchant les anticorps anti-MPO (Kallestad™ distribué par Bio-Rad): cette méthode a été utilisée jusqu'en 2008;
- EliA™ monospécifique, utilisant la fluorométrie, recherchant les anticorps anti-MPO (ImmunoCAP® Phadia), utilisée depuis 2008.

4.3. Signes cliniques et biologiques

Lors de l'inclusion des patients, des signes d'altération de l'état général (fièvre, anorexie et amaigrissement), d'atteinte rénale (créatinémie > 120 µmol/L, protéinurie, hématurie, hypertension artérielle), des signes

Tableau II – Répartition des patients en fonction de leur service d'hospitalisation.

Services	Nombre de patients	Services	Nombre de patients
Rhumatologie	3	Pédiatrie	9
Oncologie pédiatrique	3	Endocrinologie	4
Maladies infectieuses	4	Médecine interne	8
Dermatologie	2	Hépatogastroentérologie	6
Pneumologie	7	Neurologie	3
Néphrologie	7	CH voisins	17

Tableau III – Distribution des patients selon l'âge et le sexe.

Age (années)	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80 et plus
Total	11	7	6	6	3	4	10	16	10
Hommes	6	1	1	4	2	3	7	6	4
Femmes	5	6	5	2	1	1	3	10	6

Tableau IV – Aspects de fluorescence observés en fonction des spécificités antigéniques identifiées.

ELISA	IFI	Cytoplasmique	Périnucléaire	Atypique	Total
BPI		13	4	9	26
Cat G		3	1	4	8
EL		1	4	8	13
LF		1	3	5	9
EL + LF		0	0	1	1
BPI + Cat G + PR3		0	0	1	1
BPI + Cat G		1	0	0	1
BPI + Cat G + MPO		0	0	1	1
BPI + PR3		4	0	0	4
BPI + MPO		1	0	0	1
BPI + Cat G + LF		0	0	1	1
BPI + Cat G + EL + MPO + PR3		0	0	1	1
EL + MPO + PR3		0	1	0	1
LF + MPO		0	1	0	1
Cat G + MPO		0	1	0	1
Cat G + EL		1	0	0	1
EL + MPO		0	0	1	1
EL + PR3		1	0	0	1
Total		26	15	32	73

BPI : bactericidal permeability increasing protein ; Cat G : cathepsine G ; EL : élastase ; LF : lactoferrine ; MPO : myéloperoxydase ; PR3 : protéinase 3.

Tableau V – Répartition des pathologies en fonction du sexe, des spécificités antigéniques et de l'âge des patients.

Maladies	Nbr	H	F	BPI	EL	Cath G	LF	Mult. spé	Age (moyen)
Pulmonaires	12	5	7	5	2	1	1	3	68
Fibrose	5	0	5	2	2			1	78
Pneumopathie	5	4	1	3		1		1	69
Néoplasie	1	1	0				1		82
Mucoviscidose	1	0	1					1	1
Systémiques	11	3	8	5	0	3	3	0	44
SAPL	1	1	0				1		46
LES	2	0	2			1	1		25
Gougerot-Sjögren	2	0	2	2					62
Dermatomyosite	2	1	1	2					71
Behcet	1	0	1			1			29
Fièvre périodique	1	1	0	1					2
Connectivite	2	0	2			1	1		48
Intestinales	10	4	6	4	0	2	1	3	29
RCH	4	3	1	1		1		2	21
Crohn	3	0	3	2			1		59
MICI indéterminée	3	1	2	1		1		1	10
Vascularitiques	9	5	4	3	1	0	0	5	72
Wegener	2	1	1					2	77
MPA	3	2	1		1			2	78
Angéite cérébrale	1	1	0	1					52
Purpura rhumatoïde	1	0	1	1					65
Vascularite rénale	1	0	1					1	77
Vascularite non id	1	1	0	1					68
Infectieuses	8	6	2	3	3	0	0	2	53
Septicémie <i>S. aureus</i>	2	2	0		2				49
Infection <i>P. aeruginosa</i>	2	1	1	2					49
Abcès rénal	1	0	1					1	67
Endocardite	1	1	0					1	81
Infection HIV	1	1	0		1				35
Iléite bactérienne	1	1	0	1					46
Inflammatoires rhumatismales	8	1	7	1	3	1	2	1	28
Arth. chronique juvénile	4	0	4		2		2		2
Spond. ankylosante	1	0	1		1				44
Chondrocalcinose	1	0	1	1					77
Polyarthralgies	1	0	1					1	29
Arthrite	1	1	0			1			69
Hématologiques	5	4	1	1	1	1	1	1	28
Lymphome	1	1	0					1	65
Wiscott-Aldrich	1	1	0	1					1
PTI	1	0	1		1				10
Myélome	1	1	0				1		61
Neutropénie	1	1	0			1			3
Hépatiques	4	2	2	2	1	0	1	0	45
Hépatite	2	1	1	1	1				22
Cirrhose	1	1	0	1					63
Overlap syndrome	1	0	1				1		73
Rénales	3	2	1	1	1	0	0		61
IR aiguë	1	1	0	1					76
IR terminale	1	0	1		1				85
Maladie de Berger	1	1	0	1					23
Non classées	3	1	2	0	1	0	0	2	38
Purpura folliculaire	1	0	1		1				77
HT intracrânienne	1	0	1					1	37
Syndrome Marshall	1	1	0					1	1
	73	33	40	26	13	8	9	17	48,3

H : homme ; F : femme ; Nbr : nombre ; Cath G : cathepsine G ; EL : élastase ; LF : lactoferrine ; Mult.spé : multispécifiques ; SAPL : syndrome des anti-phospholipides ; LES : lupus érythémateux systémique ; RCH : rectocolite hémorragique ; MICI : maladie inflammatoire chronique intestinale ; IR : insuffisance rénale ; HT : hypertension.

extra-rénaux de vascularite systémique (pulmonaires, ORL, articulaires, musculaires, cutanés, neurologiques) ont été recherchés. Nous avons aussi noté si ces patients présentaient un syndrome inflammatoire, des anomalies du bilan hépatique, des anomalies de l'hémogramme. Enfin nous nous sommes intéressés aux paramètres immunologiques (dosages des IgG, IgA, IgM, du C3 et C4, des facteurs rhumatoïdes, AAN et ASCA [anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae*]).

5. Résultats

5.1. Données épidémiologiques

La distribution selon la tranche d'âge, tous sexes confondus (*tableau III*), dans la population étudiée montre une plus forte prévalence des ANCA non PR3 non MPO chez les patients de moins de dix ans et ceux de 60 ans et plus.

5.2. Cibles antigéniques et aspects de fluorescence observés

Cinquante-six sérums contiennent un ANCA monospécifique dirigé contre l'un des quatre antigènes mineurs (*tableau IV*). Dix-sept sont multispécifiques, associant à des degrés divers ces spécificités entre elles ou à l'un des deux antigènes majeurs, MPO ou PR3. Les ANCA dirigés contre la BPI sont largement majoritaires (49,3 %), qu'ils soient isolés (26) ou associés (10).

Pour 44 % des sérums (32/73), la fluorescence observée est atypique ; ce type de fluorescence est celui le plus souvent rencontré en cas d'ANCA monospécifiques dirigés contre la cathepsine G, l'élastase, la lactoferrine. En revanche, la moitié (13/26) des ANCA anti-BPI sont des cANCA.

5.3. Répartition des diagnostics

Les patients sont repartis en dix catégories en fonction de leur pathologie (*tableau V*). Les pathologies les plus fréquemment retrouvées sont les maladies pulmonaires (12), les maladies systémiques (11) autres que les rhumatismes inflammatoires (8) et les maladies digestives (10). Viennent ensuite les vascularites (9), et les pathologies infectieuses (8).

Deux patients ont une mucoviscidose : une jeune patiente de un an, au poumon non colonisé par *Pseudomonas aeruginosa*, donc classée dans le groupe des maladies pulmonaires, et une patiente de 23 ans, au poumon colonisé par *Pseudomonas aeruginosa*, donc classée dans le groupe des maladies infectieuses. Le deuxième patient qui a une infection à *Pseudomonas aeruginosa* est un homme de 73 ans qui a une bronchopneumopathie obstructive.

Les MICI se répartissent en 4 rectocolites ulcéro-hémorragiques, 3 maladies de Crohn, et 3 MICI indéterminées. A l'exception de deux patients externes pour lesquels l'information n'est pas connue (une maladie de Crohn et une MICI indéterminée), la recherche des ASCA est négative.

Les anticorps anti-BPI, qui sont les plus fréquents, sont majoritairement retrouvés dans chacune des catégories de pathologies mis à part pour les pathologies rhumatismales où se sont les anticorps anti-élastase qui ont été le plus souvent mis en évidence.

5.4. Étude des données cliniques

L'altération de l'état général est exprimée chez 53 % des patients (39/73). Il n'a pas toujours été possible de l'évaluer avec précision. En particulier, l'amaigrissement n'est pas toujours chiffré. Enfin, concernant les manifestations cliniques, les plus fréquentes sont articulaires (23 %), cutanées (22 %), et l'hypertension artérielle (25 %).

5.5. Étude des données biologiques

Concernant les paramètres biologiques (*tableau VI*), plus de 80 % des patients présentaient un syndrome inflammatoire lors du dépistage des ANCA, et près de 58 % des patients avaient une anémie. Il existait un retentissement hépatique dans 49 % des cas (34/69 renseignés) soit sous forme de cholestase isolée, soit sous forme de cholestase associée à une cytolyse.

Il est à noter que la recherche d'AAN, lorsque celle-ci avait été demandée pour les patients hospitalisés au CHU d'Angers, s'est révélée positive dans près de 78 % des cas (42/54 renseignés).

6. Discussion

Le caractère rétrospectif de cette étude est une limite dans la mesure où les dossiers ne possèdent pas toujours toutes les précisions souhaitées.

6.1. Analyse des données biologiques

Les patients présentent dans la majorité des cas une altération de l'état général (39/73 soit 53 %). Un syndrome inflammatoire et un syndrome anémique ont été respectivement mis en évidence chez plus de 80 % et 50 % des patients. Il existe un retentissement hépatique dans 49 % des cas (34 cas sur 69 renseignés), sous forme de cholestase isolée ou associée à une cytolyse. Quant aux manifestations cliniques, les plus fréquentes sont articulaires, cutanées, neurologiques et l'hypertension artérielle. Enfin il est à noter que la recherche d'AAN, lorsque celle-ci avait été demandée, s'est révélée positive dans près de 78 % des cas.

6.2. Analyse des résultats par spécificité des ANCA

6.2.1 Les anticorps anti-BPI

Ces anticorps ont été décrits chez des patients atteints de vascularite, de mucoviscidose ou infectés par *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi que chez des patients atteints de maladies inflammatoires du tube digestif. Il a aussi été rapporté que près de 50 % des anticorps anti-BPI ne sont pas détectés en IFI, et parmi les sérums positifs, près de la moitié montre une fluorescence de type cANCA [22].

Les ANCA anti-BPI sont les anticorps les plus souvent rencontrés dans notre étude (36 sur 73 patients soit 49 %). Ce sont dans la moitié des cas des cANCA. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature [32]. Ces anticorps ont été mis en évidence, pour les ANCA monospécifiques, principalement dans les maladies systémiques (45 %), les pathologies pulmonaires (42 %); les MICI (40 %), les maladies infectieuses (37 %) et les vascularites (33 %). Nous pouvons donc penser que les études à point de départ sérologique

Tableau VI – Données biologiques.

Paramètres	Patients	Pourcentage
CRP		
Augmentée	54	82
Non renseignée	7	10
VS		
Augmentée	34	81
Non renseignée	31	42
Hémoglobine		
Anémie	41	58
Non renseignée	2	3
Leucocytes		
Hyperleucocytose	24	34
Leucopénie	1	1
Non renseigné	2	3
Plaquettes		
Thrombocytose	17	24
Thrombopénie	5	7
Non renseigné	2	3

et non clinique, comme la nôtre, sous-estime la fréquence réelle des ANCA anti-BPI quand la stratégie de dépistage comporte classiquement une recherche par IFI en première intention. Seules des études prospectives à point de départ clinique, focalisées sur les pathologies d'intérêt, avec recherche systématique, quel que soit le résultat de l'IFI, d'ANCA anti-BPI par test en phase solide de type ELISA, pourront estimer la fréquence réelle de ces autoanticorps.

6.2.2. Les anticorps anti-cathepsine G

Ces anticorps peuvent être rencontrés chez des patients atteints de la maladie de Wegener, d'affection inflammatoire du tube digestif, de cholangite sclérosante [33], d'hépatite auto-immune, de cirrhose biliaire primitive et de cirrhose alcoolique. Ces autoanticorps produisent une fluorescence de type pANCA ou aANCA en IFI [34].

Dans notre étude ces autoanticorps ont été retrouvés dans 21 % des cas (15/73 patients) et montraient dans la majorité des cas une fluorescence atypique. Ces autoanticorps ont principalement été mis en évidence, pour les ANCA monospécifiques, dans les maladies systémiques (27 %) et intestinales (25 %).

6.2.3. Les anticorps anti-élastase

Ils ont été décrits au cours de vascularites, de connectivites et dans des cas de glomérulonéphrites induites par l'hydralazine, ainsi que lors de pathologies infectieuses dont notamment l'infection par le virus HIV. L'aspect de la fluorescence observée est généralement atypique [35]. Nous avons mis en évidence ce type d'anticorps chez 26 % de nos patients (19 sur 73 patients). L'aspect de fluorescence observée était préférentiellement atypique (11 sur 13). Ces anticorps ont été mis en évidence, pour les ANCA monospécifiques, chez des patients souffrant de rhumatismes inflammatoires (37,5 %), de pathologies infectieuses (37,5 % dont un patient infecté par le HIV) et de maladies pulmonaires (42 %). A noter que cette cohorte ne comporte pas de patients souffrant de vascularite iatrogène, comme décrit dans la littérature [25].

6.2.4. Les anticorps anti-lactoferrine

Des anticorps anti-lactoferrine ont été retrouvés dans des MICI, dans la polyarthrite rhumatoïde, dans de rares cas de

connectivites, et, tout comme les anticorps anti-élastase et les anticorps anti-azurocidine, dans les vascularites iatrogènes. Ces anticorps produisent généralement une fluorescence atypique [26].

Dans notre travail, ces autoanticorps ont été retrouvés chez 16 % des patients (12 sur 73 patients) avec un aspect de fluorescence le plus souvent atypique (7 sur 9). Ces anticorps ont été essentiellement retrouvés, pour les ANCA monospécifiques, chez des patients souffrant de connectivites (27 %) et de rhumatismes inflammatoires (25 %). Toutefois il est intéressant de noter qu'aucun patient n'avait une polyarthrite rhumatoïde comme cela avait été décrit dans la littérature [26]. A noter également que cette cohorte ne comporte pas de patients souffrant de vascularite iatrogène, comme décrit dans la littérature [25].

6.2.5. Les ANCA multispécifiques

Des ANCA multispécifiques ont été mis en évidence chez 23 % de nos patients (17 sur 73 patients). Dans 71 % des cas (12/17), deux spécificités ont été retrouvées mais il a parfois été mis en évidence trois (4) voire cinq spécificités (1). Plus en détail, dans ce groupe nous retrouvons cinq vascularites dont deux maladies de Wegener associant anticorps anti-PR3 et anticorps anti-BPI, deux MPA associant soit des anticorps anti-lactoferrine ou des anticorps anti-cathepsine G à des anticorps anti-MPO et une vascularite rénale. Les spécificités mises en évidence dans le cadre de ces pathologies ainsi que l'aspect de la fluorescence observée, à savoir l'aspect cANCA pour les deux patients souffrant de la maladie de Wegener et l'aspect pANCA concernant les patients ayant développé une MPA, sont tout à fait en accord avec ce qui est décrit dans la littérature. Nous retrouvons aussi trois patients souffrant de MICI dont deux de RCH et une d'une MICI non encore étiquetée. Chez ces patients, nous identifions comme principales cibles antigéniques la BPI, la cathepsine G et la lactoferrine. Il s'agit de cibles antigéniques régulièrement retrouvées dans les MICI [36]. De plus, ce groupe comprend aussi un patient atteint de mucoviscidose ayant développé des anticorps dirigés contre la BPI mais aussi contre la cathepsine G et la MPO, ainsi qu'un patient chez qui on a retrouvé, à la suite d'une endocardite, des anticorps anti-BPI, anti-cathepsine G et anti-lactoferrine. Ces résultats sont en accord avec les précédents travaux publiés qui retrouvent volontiers les ANCA multispécifiques dans les pathologies infectieuses chroniques. L'hypothèse est alors que la stimulation prolongée des PNN conduit à une libération chronique du contenu des granules dans un contexte cytokinique pro-inflammatoire favorisant une rupture de la tolérance [1].

6.3. Analyse globale des résultats

De manière presque identique à notre étude, Talor et coll. [31] ont rapporté une cohorte de 62 patients ayant des ANCA détectés par IFI et présentant une ou plusieurs des spécificités mineures sans anticorps anti-MPO ni anti-PR3. Il s'agissait d'une étude prospective monocentrique à point de départ clinique, ce qui peut expliquer l'inversion de l'ordre des fréquences observées puisque, dans cette étude, les anticorps anti-cathepsine G devançaient les anticorps anti-BPI (36 versus 22). Ces auteurs retrouvaient également

des ANCA multispécifiques avec une grande fréquence, puisque seuls 35 % de leurs sérums étaient monospécifiques. Les vascularites (maladie de Wegener, MPA ou autres vascularites) étaient en plus grand nombre dans cette étude (50 %). Néanmoins les ANCA dirigés contre les antigènes mineurs étaient préférentiellement retrouvés en dehors des vascularites : 22 des 36 sérums positifs pour les anticorps anti-cathepsine G, 12 sur 22 pour les anticorps anti-BPI, 6 sur 10 pour les anticorps anti-élastase et 10 sur 20 pour les anticorps anti-lactoferrine. Tout comme dans notre étude, pour les anticorps anti-élastase, Talor et coll. ne retrouvaient pas d'addiction à la cocaïne conduisant à une destruction nasale comme il a été rapporté [37].

Dans une étude multicentrique portant sur 102 patients [38] ayant le même statut sérologique (ANCA positifs en IFI, ni anti-PR3, ni anti-MPO), avec 79 diagnostics documentés, les anticorps dirigés contre les antigènes mineurs étaient présents dans 27,5 % des cas (28 sérums) avec aussi une plus grande fréquence des anticorps anti-BPI (13 anti-BPI, 6 anti-élastase, 5 anti-cathepsine G, 3 anti-lactoferrine et 1 association anti-BPI + anti-lactoferrine). Dans ce groupe, l'aspect de fluorescence majoritaire était de type cANCA (12), pour 9 aANCA et 7 pANCA. Ces ANCA étaient plus fréquemment retrouvés en dehors de vascularites, principalement en association avec des maladies inflammatoires intestinales ou des infections.

Nous avons donc identifié deux groupes d'âge avec une plus forte prévalence d'ANCA non PR3 non MPO : les patients de moins de dix ans et ceux de 60 ans et plus. Dans la majorité des cas (32 patients sur 73, soit 44 %) la fluorescence observée est atypique. D'autre part si l'on prend séparément les quatre cibles antigéniques mineures des ANCA (BPI, cathepsine G, élastase, lactoferrine), ce type de fluorescence est aussi prédominant dans chacune de ces catégories, mis à part pour les anticorps dirigés contre la BPI où c'est la fluorescence de type cytoplasmique qui est la plus fréquente (13 sur 26 soit 50 %). Concernant les spécificités antigéniques, près de la moitié de nos patients (36 sur 73 soit 49 %) présentaient des anticorps dirigés contre la BPI, fréquence qui est certainement sous-estimée. Ces anticorps sont retrouvés de façon majoritaire dans chacune des catégories de pathologies, mis à part pour les pathologies rhumatismales où se sont les anticorps anti-élastase qui sont le plus souvent mis en évidence. Cette association des anticorps anti-élastase avec les pathologies rhumatismales n'a pas été signalée à ce jour dans la littérature, et demande confirmation dans des études prospectives.

Il est probable que les ANCA dirigés contre ces cibles mineures ne soient que les simples marqueurs d'une activation chronique des PNN dont les constituants des granules seraient libérés en permanence dans un contexte cytokinique pro-inflammatoire favorisant une rupture de tolérance. Ainsi ces ANCA dirigés contre des antigènes mineurs ou de spécificité indéterminée se voient dans un éventail de plus en plus large de maladies, avec ou sans signe de vascularite. Le clinicien doit garder présent à l'esprit la possible survenue d'ANCA dans des pathologies infectieuses chroniques, comme l'endocardite, qui ne pourraient qu'être aggravées par un traitement immunosuppresseur délivré sur la seule positivité sérologique [39].

Références

- [1] Beauvillain C, Delneste Y, Renier G, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: how should the biologist manage them? *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 35 (1-2): 47-58.
- [2] Mohan N, Kerr GS. Diagnosis of vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; 15 (2): 203-23.
- [3] Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference *Arthritis Rheum.* 1994;37: 187-92.
- [4] Davies DJ, Moran JE, Niall JF, et al. Segmental necrotizing glomerulonephritis with anti-neutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br Med J* 1982; 285: 606.
- [5] Hall JB, Wadham BM, Wood CJ, et al. Vasculitis and glomerulonephritis: a subgroup with an antineutrophil cytoplasmic antibody. *Aust N Z J Med* 1984; 14 (3): 277-8.
- [6] Van der Woude FJ, Lobatto S, Permin H, et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; 325 (8426): 425-9.
- [7] Wathen CW, Harrison DJ. Circulating anti-neutrophil antibodies in systemic vasculitis. *Lancet* 1987; 1 (8540): 1037.
- [8] Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1989; 97 (Suppl 6): 12-3.
- [9] Falk RJ, Jennette J.-C. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;318 (25): 1651-7.
- [10] Lüdemann J, Utecht B, Gross WL. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J Exp Med* 1990; 171 (1): 357-62.
- [11] Goldschmieding R, van der Schoot CE, ten Bokkell Huinink D, et al. Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1577-87.
- [12] Bajema IM, Hagen EC, Ferrario F, et al., Immunopathological aspects of systemic vasculitis. *Springer Semin Immunopathol*, 2001; 23 (3): 253-65.
- [13] Savige JA, Paspaliaris B, Silvestrini R, et al. A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. *J Clin Pathol* 1998; 51: 568-75.
- [14] Stoffel MP, Csernok E, Herzberg C, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against bactericidal/permeability increasing protein (BPI): a new seromarker for inflammatory bowel disease and associated disorders. *Clin Exp Immunol* 1996; 104 (1): 54-9.
- [15] Mahadeva R, Dunn AC, Westerbeek RC, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) against bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and cystic fibrosis lung disease. *Clin Exp Immunol* 1999; 117 (3): 561-7.
- [16] Kao RC, Wehner NG, Skubitz KM, et al. Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J Clin Invest* 1988; 82: 1963-73.
- [17] van der Geld YM, Limburg PC, Kallenberg CGM. Proteinase 3, Wegener's autoantigen: from gene to antigen. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 177-90.
- [18] Wieslander J, Wiik A. ANCA antigens: proteinase 3. In: van Venrooij WJ, Maini RN, editors, *Manual of Biological Markers of Diseases*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1994, B7.1. p. 1-9.
- [19] Wieslander J, Wiik A. ANCA antigens: myeloperoxidase. In: van Venrooij WJ, Maini RN, editors, *Manual of Biological Markers of Diseases*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1994, B7.2. p. 1-9.
- [20] Weiss J, Olsson I. Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. *Blood* 1987; 69 (2): 652-9.
- [21] Weiss J, Elsbach P, Olsson I, et al. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem*, 1978; 253 (8): 2664-72.
- [22] Segelmark M, Westman K, Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18: 629-35.
- [23] Zhao MH, Jones SJ, Lockwood CM. Bactericidal/permeability increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1995; 99: 49-56.
- [24] Schultz H, Weiss J, Carroll SF, et al. The endotoxin-binding bactericidal/permeability-increasing protein (BPI): a target antigen of autoantibodies. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 505-12.
- [25] Zhao MH, Lockwood CM. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity other than PR3 and MPO (α-ANCA). In: Peter JB, Shoenfeld Y, editors, *Autoantibodies*. Amsterdam: Elsevier; 1996. p 68-73.
- [26] Corremans IE, Hagen EC, Daha MR, et al. Antilactoferrin antibodies in patients with arthritis are associated with vasculitis. *Arthritis Rheum* 1992; 35 (12): 1466-75.
- [27] Zhao MH, Lockwood CM. Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996; 103: 397-402.
- [28] Gallin MY, Jacobi AB, Büttner DW, et al. Human autoantibody to defensin: disease association with hyperactive onchocerciasis. *J Exp Med* 1995; 182: 41-7.
- [29] Kain R, Matsui K, Exner M, et al. A novel class of autoantigens of antineutrophil cytoplasmic antibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis: the lysosomal membrane glycoprotein h-lamp-2 in neutrophil granulocytes and a related membrane protein in glomerular endothelial cells. *J Exp Med* 1995 181: 585-97.
- [30] Kain R, Exner M, Brandes R, et al. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med* 2008; 14 (10): 1088-96.
- [31] Talor MV, Stone JH, Stebbing J, et al. Antibodies to selected minor target antigens in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Clin Exp Immunol* 2007; 150: 42-8.
- [32] Zhao MH, Jayne DR, Ardiles LG, et al. Autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein in patients with cystic fibrosis. *Q J Med* 1996; 89 (4): 259-65.
- [33] Halbwachs-Mecarelli L, Nusbaum P, Noël LH, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Immunol* 1992; 90 (1): 79-84.
- [34] Wiik A, Stummann L, Kjeldsen L, et al. The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens. *Clin Exp Immunol* 1995; 101 (Suppl 1): 15-7.
- [35] Nässberger L, Jonsson H, Sjöholm AG, et al. Circulating anti-elastase in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1989; 1: 509.
- [36] Roozendaal C, Kallenberg CGM. Are anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) clinically useful in inflammatory bowel disease (IBD)? *Clin Exp Immunol* 1999; 116 (2): 206-13.
- [37] Wiesner O, Russell KA, Lee AS, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with human neutrophil elastase as a diagnostic marker for cocaine-induced midline destructive lesions but not autoimmune vasculitis. *Arthritis Rheum* 2004; 50 (9): 2954-65.
- [38] Burban M, André C, Chrétien P, et al. Clinical significance of ANCA specificity other than proteinase 3 and myeloperoxidase. *Autoimmunity Rev* 2004; 3 (suppl 2): 45.
- [39] Subra JF, Michelet C, Laporte J, et al. The presence of cytoplasmic antineutrophil cytoplasmic antibodies (c-ANCA) in the course of subacute bacterial endocarditis with glomerular involvement, coincidence or association? *Clin. Nephrol* 1998;49:15-8.

Anticorps anti-enveloppe nucléaire

Eric Ballot^{a,*}, Catherine Johanet^a

1. Structure de l'enveloppe nucléaire

Chez les organismes eucaryotes, l'enveloppe nucléaire se décompose en cinq régions interconnectées (*figure 1*) [1] :

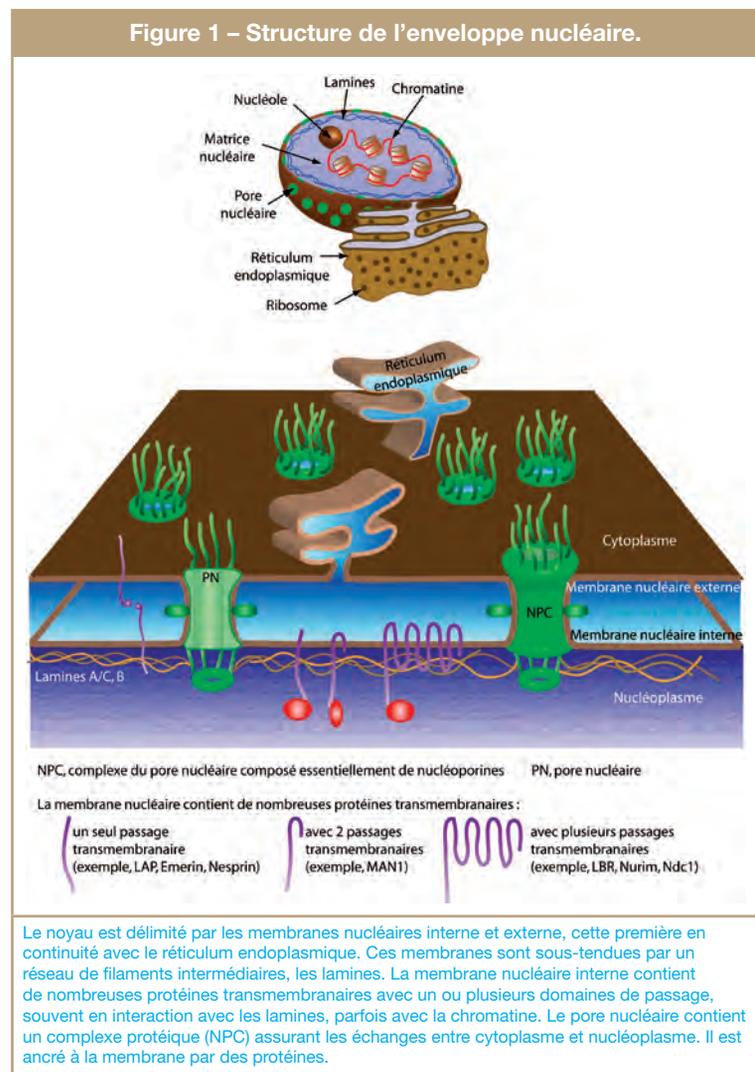
- la membrane nucléaire externe, bicouche lipidique en continuité avec la membrane du réticulum endoplasmique ;
- l'espace intermembranaire ;
- la bicouche lipidique de la membrane nucléaire interne ;
- la lamina nucléaire. Il s'agit d'un réseau protéique fibreux formant une couche de 10 à 20 nm d'épaisseur qui tapisse la membrane nucléaire interne de l'enveloppe nucléaire. Ce réseau est interrompu par les pores nucléaires ;
- les pores nucléaires qui assurent la continuité entre cytoplasme et nucléoplasme.

1.1. Les protéines de la lamina nucléaire

La lamina nucléaire est composée de lamines qui appartiennent à la famille des filaments intermédiaires avec un domaine central en hélice alpha superenroulée et deux extrémités N-terminale et C-terminale de longueur variable. Il existe quatre types de lamines, lamine A, lamine C, lamine B1 et lamine B2. Les lamines A (664 AA, 74 kDa chez l'homme) et C (572 AA, 65 kDa) sont identiques, sauf dans la partie C-terminale plus longue dans la lamine A. Les lamines A ou C s'arrangent sous forme d'homodimères. Il existe deux formes de lamine B, les lamines B1 (586 AA, 66 kDa) et B2 (600 AA, 67 kDa), partageant 58 % d'homologie, et environ 50 % d'homologie avec la lamine A. Les lamines jouent un rôle majeur dans le maintien de la morphologie du noyau en charpentant l'enveloppe nucléaire. Elles peuvent se lier à des protéines de la membrane nucléaire interne. Mais elles interagissent aussi avec la chromatine et assurent un rôle dans la réplication de l'ADN ou dans les cascades de signalisation cellulaire [1, 2].

1.2. Les protéines des membranes nucléaires interne et externe

De nombreuses protéines transmembranaires sont associées aux membranes nucléaires et sont loin d'être toutes caractérisées [1, 3, 4]. Selon l'outil technologique utilisé, de 150 à 560 protéines sont rapportées localisées à l'enveloppe nucléaire [1]. Certaines sont spécifiques à la



membrane nucléaire et les principales cibles d'autoanticorps seront détaillées par la suite. D'autres protéines, également associées au réticulum endoplasmique, ont été trouvées aussi concentrées dans les membranes nucléaires de certains tissus ou cellules cultivés dans des conditions précises. Il s'agit de protéines du métabolisme des lipides, de transporteurs d'ions ou de peptides, ou encore de protéines appartenant aux voies de signalisation cellulaire [1].

1.2.1. Protéines associées à la membrane nucléaire interne

Les protéines transmembranaires associées à la membrane interne sont les plus nombreuses. Certaines interagissent entre autres, mais pas uniquement, avec les lamines [1-4]. La liste suivante n'est pas exhaustive.

C'est le cas du **récepteur à la lamine B** (615 AA, 70 kDa) ou LBR (« *lamin B receptor* »), protéine à huit régions

^a Laboratoire d'immunologie
Hôpital Saint-Antoine
184, rue du Faubourg Saint-Antoine
75571 Paris cedex 12

* Correspondance
eric.ballot@sat.aphp.fr

transmembranaires, capable aussi de lier des protéines de l'hétérochromatine ou l'ADN. Il semble également posséder une fonction enzymatique analogue à la stérol C-14 réductase de la levure.

Les « *lamina associated polypeptides* » (LAP1 et LAP2), protéines à un seul passage transmembranaire, assurent le maintien de la structure nucléaire en s'attachant aux lamines. La protéine LAP2 dont il existe plusieurs isoformes, α , β , γ (respectivement 75 kDa, 50 kDa, 38 kDa) contrôle aussi la réplication de l'ADN, directement ou à travers des interactions avec d'autres protéines. La protéine LAP1 entre aussi en interaction avec une autre protéine de la membrane nucléaire, la torsine, dont une colocalisation à la membrane du réticulum endoplasmique est rapportée. La protéine **MAN1** (ou LEMD3) de 100 kDa possède dans sa séquence deux domaines de passage transmembranaire. Elle se lie à l'ADN et interagit avec des protéines nucléaires, mais aussi avec les lamines.

L'**émerine** (29 kDa) possède un seul domaine transmembranaire. Sa fonction est d'initier la formation d'un réseau d'actine nucléaire et de le stabiliser. Elle semble aussi interagir avec les lamines.

Il en est de même des **Nurim** (« *nuclear rim proteins* ») dont il existe deux isoformes (22 et 29 kDa). Leurs séquences possèdent cinq domaines transmembranaires, mais leurs fonctions restent encore obscures.

1.2.2. Protéines associées à la membrane nucléaire externe

Les protéines transmembranaires associées à la membrane nucléaire externe sont moins bien connues. On trouve les

protéines **Syne/Nesprin** (« *nuclear envelope spectrin repeat protein* ») [1]. Nesprin-1 et Nesprin-2 sont deux très grosses protéines (respectivement 8797 AA et 1011 kDa, 6 885 AA et 796 kDa). Leur fonction semble être le maintien de la morphologie nucléaire en connectant le noyau au cytosquelette, par interaction d'une part avec l'enveloppe nucléaire et d'autre part avec l'actine F du cytoplasme.

1.2.3. Protéines de la membrane nucléaire en regard du pore nucléaire

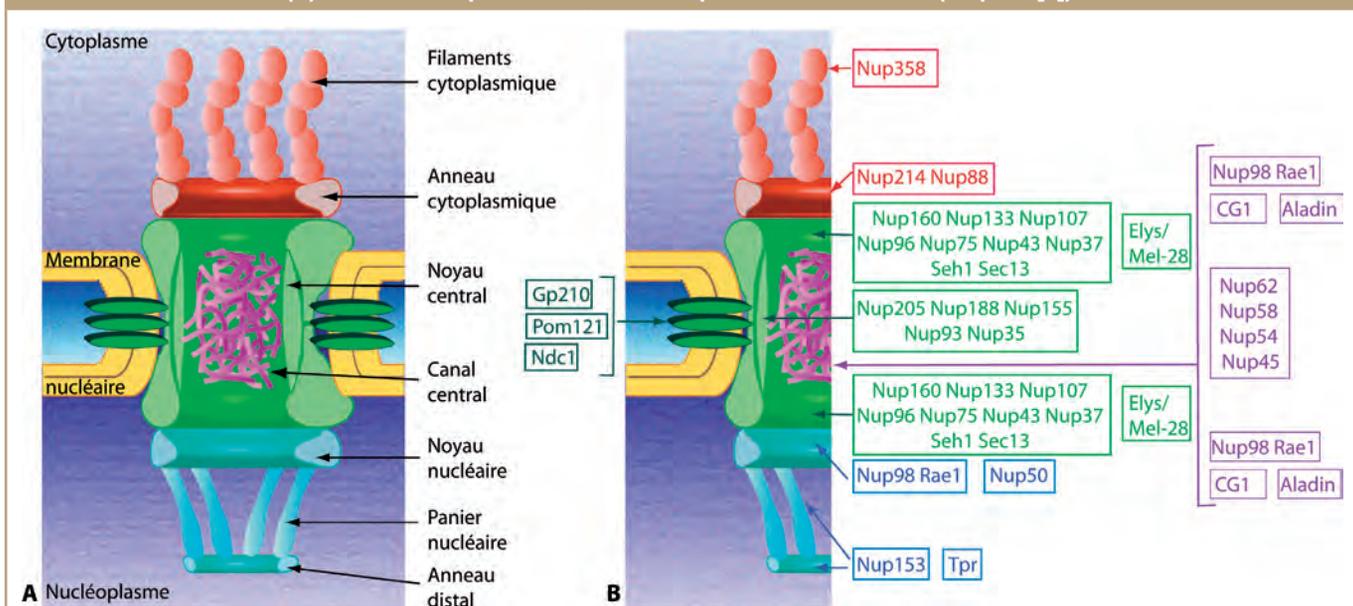
En regard du pore nucléaire, trois protéines transmembranaires ancrent le complexe du pore nucléaire. Il s'agit de la gp210, de la protéine POM121 et de la nucléoporine Ndc1 [5].

- La **gp210** (« *nuclear pore membrane glycoprotein* » de 210 kDa) possède un domaine transmembranaire et une douzaine de sites de N-glycosylation dont tous ne sont pas utilisés. Elle peut former des dimères, voire des oligomères. La majeure partie de sa séquence de 1 887 AA se situe dans la lumière de la citerne délimitée par les membranes nucléaires internes et externes, seule une cinquantaine d'AA sort dans le cytoplasme. Une isoforme de 105 kDa est décrite.

- La protéine **POMP121** (« *nuclear envelope pore membrane protein* ») ancre elle aussi le complexe du pore nucléaire à la membrane. Elle ne possède qu'un seul domaine transmembranaire, mais la majorité de la protéine de 1 229 AA est orientée vers le pore, alors qu'une quarantaine d'AA se localisent dans la citerne.

- La nucléoporine **Ndc1** de 522 AA et 76 kDa possède 2 sites potentiels de O-glycosylation et cinq domaines transmembranaires.

Figure 2 – (A) Représentation schématique du complexe de pore nucléaire (NPC)
(B) Localisation probable des nucléoporines dans le NPC (d'après [3]).



Le NPC permet des échanges sélectifs entre le nucléoplasme et le cytoplasme. Il s'organise en un noyau central creux portant de part et d'autre un anneau cytoplasmique et un anneau nucléaire d'où partent de chaque côté huit filaments. Du côté du nucléoplasme, les filaments adoptent une configuration en panier grâce à la présence d'un anneau protéique distal.

Le NPC est un édifice de plus de 3 000 protéines d'une trentaine de familles différentes, principalement des nucléoporines (Nup) qui s'arrangent en complexes. Les membres d'un même complexe sont indiqués dans le même cadre. Occupant le centre du canal, des Nup forment un gel tridimensionnel et assurent par des motifs FG répétés la fixation de protéines de transport. Des protéines intrinsèques de la membrane comme la gp210 ancrent le NPC.

1.3. Le complexe du pore nucléaire

Les pores nucléaires assurent la continuité entre cytoplasme et nucléoplasme. Ils sont occupés par un complexe macromoléculaire qui entoure la membrane nucléaire, appelé « *nuclear pore complex* » (NPC), d'environ 140 nm de diamètre et de poids moléculaire 60-125 10³ kDa chez les mammifères qui en possèdent 3 000 à 5 000 exemplaires par noyau. Ils sont les médiateurs sélectifs des échanges bidirectionnels entre ces deux compartiments cellulaires. Le transport nucléocytoplasmique de macromolécules de masse > 40 kDa dépend de la reconnaissance de ces molécules par des facteurs de transport qui eux-mêmes entrent en interaction avec le NPC qui assure la translocation d'un compartiment à l'autre [5, 6].

Chaque NPC est constitué de nucléoporines appartenant à une trentaine de familles différentes [6, 7]. Chaque nucléoporine est présente en huit, ou en multiple de huit exemplaires. Il y a ainsi entre 500 et 1 000 molécules de nucléoporine par NPC. Il existe en effet une symétrie orthogonale dans l'organisation des NPC. Chaque NPC comporte un noyau central creux intégré à la membrane nucléaire qui délimite un canal. Ce noyau central est entouré d'un anneau cytoplasmique et d'un anneau nucléaire. De chaque anneau, partent huit filaments. Les filaments sont libres du côté cytoplasmique, alors que du côté du nucléoplasme ils rejoignent un petit anneau protéique, l'ensemble formant le « panier nucléaire » [5, 7] (*figure 2*). On y trouve en particulier les protéines **Nup153** et **Tpr**.

La plupart des protéines du NPC sont assemblées en complexes multimoléculaires. Un modèle très approfondi de la structure du NPC a été établi chez la levure [8]. Le noyau central creux est formé de deux complexes protéiques principaux, un interne et un externe, répétés du côté cytoplasmique et du côté nucléocytoplasmique. Ces complexes du noyau central via des protéines de liaison, ancrent des nucléoporines contenant des domaines répétés FG (phénylalanine-glycine) et qui remplissent le canal central.

Ces domaines FG non repliés entrent en interaction avec les protéines réceptrices de transport, les karyophérines. Ces nucléoporines FG formeraient ainsi un gel tridimensionnel établissant un tamis sélectif pour le transport à travers les NPCs. La sélectivité du passage nucléocytoplasmique est cependant très complexe et discutée par ailleurs [9, 10]. Une nucléoporine **Nup62** de 522 AA semble un composé essentiel du canal du NPC. Elle possède deux sites de O-glycosylation, quinze régions répétées FXFG dans la partie N-terminale. La partie C-terminale serait impliquée dans des interactions protéine-protéine via la formation de domaines superenroulés et fixerait la Nup62 au NPC [11].

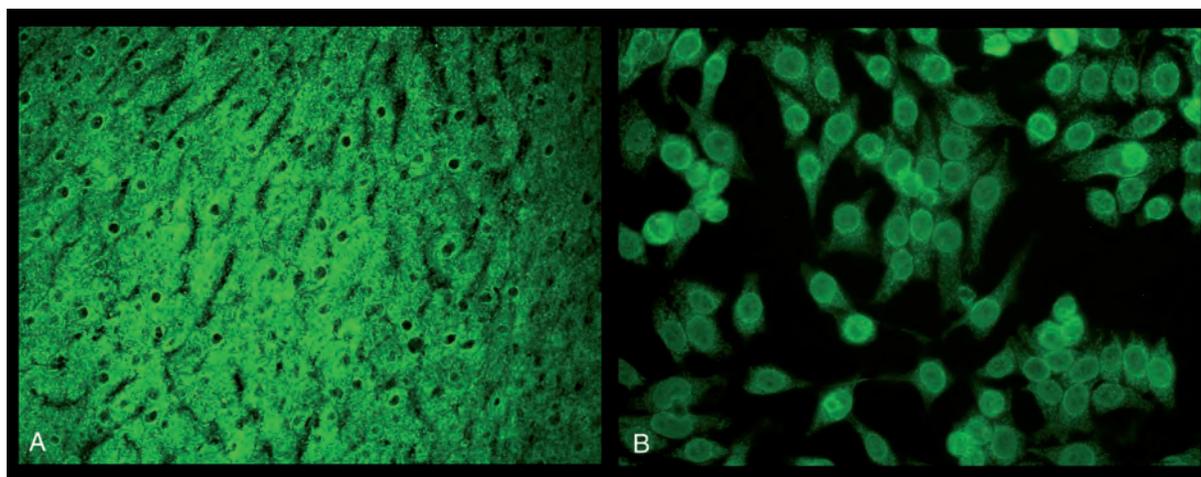
2. Les autoanticorps dirigés contre des protéines de l'enveloppe nucléaire

2.1. Technique de détection

En routine, les autoanticorps (Ac) contre des molécules de la membrane nucléaire ou du NPC donnent une fluorescence cerclée du noyau sur coupe de foie de rat et une fluorescence membranaire ou ponctiforme sur cellule HEP-2 (*figure 3*). Cette observation peut cependant être mise en défaut s'il coexiste des autoAc responsables d'une fluorescence homogène de ce noyau.

Des *immunoblots*, *dot-blots* ou ELISA sur des protéines purifiées ou recombinantes existent pour la détection de certains autoantigènes de la membrane et peuvent s'envisager pour d'autres. Cependant, le fractionnement des protéines nucléaires par l'utilisation de sels, d'agents chaotropes ou de détergents est une manipulation longue et à faible rendement, ce qui limite les études de routine sur les cibles des autoAc responsables d'une fluorescence membranaire. L'affinité de la Nup62 aux germes de blé peut être utilisée dans des purifications par chromatographie.

Figure 3 – Aspect de fluorescence indirecte donné par un sérum contenant des anticorps anti-membrane nucléaire et anti-mitochondrie.



Sur foie de rat, aspect cerclé du noyau, et granité du cytoplasme.

Sur cellules HEP-2, fluorescence membranaire des noyaux et granuleuse du cytoplasme.

En pratique, seuls des trousse diagnostiques pour la détection des autoAc anti-gp210 sont commercialisées en France.

Les cibles autoantigéniques décrites à ce jour et localisées dans le NPC sont les gp210, Nup62, Nup153, Nup358 et Tpr. Celles localisées à la membrane nucléaire sont les récepteurs à la lamine B, les protéines LAP1, LAP2 et MAN1. Il faut y ajouter les lamines A/C et les lamines B (figure 4).

2.2. AutoAc anti-gp210

Ils sont détectés dans 10 à 41 % des sérums de patients avec une cirrhose biliaire primitive (CBP) dont ils semblent très spécifiques (> 95 %), et dans de rares cas de cirrhose alcoolique, cirrhose cryptogénique, lupus érythémateux disséminé (LED), polyarthrite rhumatoïde, polymyosite, syndrome de Gougerot-Sjögren. Bien que les premières études n'établissent pas de corrélation entre la présence de ces Ac et le pronostic de la CBP, des données plus récentes suggèrent fortement l'association de ces Ac à une évolution défavorable et plus rapide de la maladie. Leur intérêt réside aussi dans le diagnostic sérologique des rares CBP (< 10 %) sans Ac anti-mitochondrie où ils sont présents dans 20 à 50 % des cas.

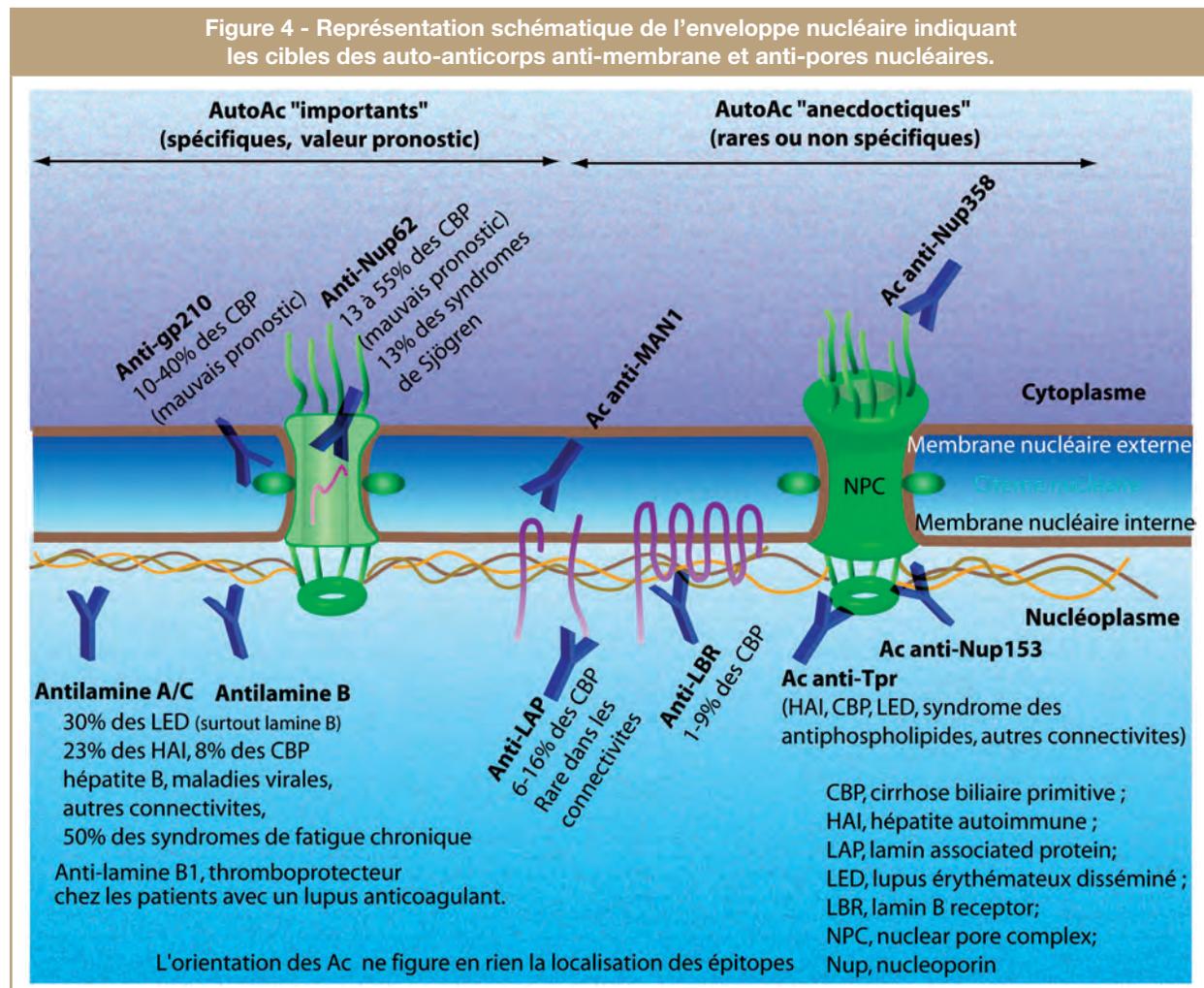
La majorité des Ac anti-gp210 reconnaît un épitope de 15 AA dans la partie C-terminale localisée dans le cytoplasme. Un autre épitope se situe dans la partie N-terminale glycosylée. Les Ac anti-gp210 sont recherchés par technique ELISA ou *dot-blot* sur protéines recombinantes ou peptides synthétiques couvrant la séquence antigénique [12-15].

2.3. AutoAc anti-Nup62

Ces Ac sont rapportés, selon les techniques utilisées pour purifier l'Ag, dans 13 à 55 % des sérums de patients atteints de CBP. Mais ils sont également trouvés, dans une étude, dans 13 % des sérums de malades avec un syndrome de Gougerot-Sjögren et détectés de façon anecdotique dans le LED et les connectivites mixtes. Les quelques études rétrospectives publiées corrént la présence de ces Ac anti-Nup62 avec un pronostic défavorable de la CBP. Les Ac anti-gp210 et anti-Nup62 seraient mutuellement exclusifs [12, 16, 17].

2.4. AutoAc anti-Nup358

Une publication rapporte l'existence d'un sérum de patient atteint d'une connectivite et réagissant avec une protéine du NPC de 180 kDa, identifiée ensuite comme étant la Nup358 [18].



2.5. AutoAc anti-Nup153

Ils n'ont pas été identifiés comme tels. Une équipe relate l'existence d'une séquence similaire entre les portions 57-76 de l'ADN polymérase du virus de l'hépatite B et 823-842 d'une protéine cible d'autoAc antinucléaires, protéine identifiée par la suite comme la Nup153. Cette séquence était reconnue par 41 % des sérums de malade avec une hépatite à virus B, 4 % avec une hépatite à virus C, 40 % avec une maladie de Wilson, 9 % avec un syndrome d'Alagille, 17 % avec déficit en alpha1-antitrypsine, 8 % avec un LED et 8 % avec une thyroïdite auto-immune [19].

2.6. AutoAc anti-Tpr

Ils sont considérés par une équipe comme les plus fréquents (70 %) des Ac anti-enveloppe nucléaire, et trouvés surtout dans les sérums de malades avec une maladie auto-immune du foie (41 %), mais aussi avec un LED, une neuropathie sensitive ou motrice, un syndrome des anti-phospholipides, une sclérodémie, un syndrome de Gougerot-Sjögren [20]. Une autre publication fait mention de 16 % de sérums avec Ac anti-Tpr dans diverses maladies rhumatismales [21].

2.7. AutoAc anti-lamine

Les autoAc anti-lamine peuvent réagir de façon croisée avec d'autres filaments intermédiaires comme la kératine et la vimentine. Ils sont présents à taux faible dans des sérums de sujets normaux. Ils ne sont pas spécifiques d'une pathologie, rencontrés dans environ 30 % des LED, 23 % des hépatites auto-immunes où ils sont volontiers associés à une forme active, 8 % des CBP et dans la moitié des sérums de patients avec un syndrome de fatigue chronique. Ils sont aussi trouvés dans d'autres connectivites (polyarthrite rhumatoïde, syndrome de Gougerot-Sjögren, syndrome de Raynaud), mais aussi gammopathies monoclonales et infections virales [14, 21].

La lamine B est l'antigène préférentiellement reconnu dans le LED, alors que les lamine A/C sont plutôt reconnues par les Ac des hépatites auto-immunes.

Les Ac anti-lamine B1, surtout à titres élevés, seraient volontiers associés à une thromboprotection chez les patients lupiques avec anticoagulant circulant [22].

2.8. AutoAc anti-récepteur de la lamine B

Ils sont très spécifiques de la CBP, mais rares (1 à 9 %). L'épitope serait situé dans la partie nucléocytoplasmique de liaison à la lamine B [12-14].

2.9. AutoAc anti-LAP

Peu de données sont fournies sur ces autoAc. Les Ac anti-LAP2 sont trouvés dans 6 à 16 % des CBP, mais aussi 3 % des syndromes de Gougerot-Sjögren [12, 14]. Ils sont aussi rapportés dans d'autres connectivites ou dans le syndrome des anti-phospholipides. Un auteur note la présence d'Ac anti-LAP1 et anti-LAP2 dans respectivement 9 % et 29 % des sérums de patients avec une maladie rhumatismale [21].

2.10. Autoc anti-MAN1

Là aussi, peu de données existent. La protéine MAN1 a été initialement décrite grâce à un sérum de malade atteint d'une connectivite mal définie [23].

3. Conclusion

La détection d'Ac antinucléaires d'aspect membranaire est d'importance. Si beaucoup d'autoantigènes de l'enveloppe nucléaire sont anecdotiques ou sans spécificité, il n'en demeure pas moins que la mise en évidence d'Ac anti-gp210 par technique ELISA ou *dot-blot* est spécifique de la CBP (> 95 %) et semble définir une classe particulière au mauvais pronostic. Spécifiques et peut-être même un peu plus sensibles, les Ac anti-Nup62 paraissent aussi caractériser des CBP de mauvais pronostic. L'intérêt de la détection de ces Ac anti-gp210 et anti-Nup62 réside aussi dans l'aide diagnostique qu'ils apportent dans les CBP sans Ac anti-mitochondrie.

En revanche, les Ac anti-lamine B1 seraient un facteur thromboprotecteur chez les patients avec un lupus anticoagulant.

Aucun laboratoire ne propose cependant la recherche en routine de ces Ac anti-Nup62 et anti-lamine B1. La difficulté de leur purification est aussi un frein à l'éclosion d'études clinicobiologiques de grande ampleur.

Références

- [1] Schirmer EC, Gerace L. The nuclear membrane proteome: extending the envelope. *Trends Biochem Sci* 2005;30(10):551-8.
- [2] Vlcek S, Foisner R. Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:298-304.
- [3] Dreger M, Bengtsson L, Schöneberg T, et al. Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(21):11943-8.
- [4] Schirmer EC, Gerace L. Organellar proteomics: the prizes and pitfalls of opening the nuclear envelope. *Genome Biol* 2002;3(4):reviews1008.1-4.
- [5] D'Angelo MA, Hetzer MW. Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol* 2008;18(10):456-66.
- [6] Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, et al. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* 2002;158:915-27.
- [7] Elad N, Maimon T, Frenkiel-Krispin D, et al. Structural analysis of the nuclear pore complex by integrated approaches. *Curr Opin Struct Biol* 2009;19:226-32.
- [8] Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, et al. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 2007;450(7170):695-701.
- [9] Lim RY, Huang NP, Köser J, et al. Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(25):9512-7.
- [10] Lim RY, Ullman KS, Fahrenkrog B. Biology and biophysics of the nuclear pore complex and its components. *Int Rev Cell Mol Biol* 2008;267:299-342.
- [11] Schwarz-Herion K, Maco B, Sauder U, et al. Domain topology of the p62 complex within the 3-D architecture of the nuclear pore complex. *J Mol Biol* 2007;370:796-806.
- [12] Miyachi K, Hankins RW, Matsushima H, et al. Profile and clinical significance of anti-nuclear envelope antibodies found in patients with primary biliary cirrhosis: a multicenter study. *J Autoimmun* 2003;20:247-54.
- [13] Muratori P, Muratori L, Ferrari R, et al. Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2003;98(2):431-7.
- [14] Neshet G, Margalit R, Ashkenazi YJ. Anti-nuclear envelope antibodies: clinical associations. *Semin Arthritis Rheum* 2001;30(5):313-20.

6^e Colloque Geai 2010

- [15] Worman HJ. Nuclear envelope protein autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007;37(Suppl 3):S406-11.
- [16] Wesierska-Gadek J, Klima A, Komina O, et al. Characterization of autoantibodies against components of the nuclear pore complexes: high frequency of anti-p62 nucleoporin antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109: 519-30.
- [17] Wesierska-Gadek J, Klima A, Ranftler C, et al. Characterization of the antibodies to p62 nucleoporin in primary biliary cirrhosis using human recombinant antigen. *J Cell Biochem* 2008;104:27-37.
- [18] Wilken N, Kossner U, Sénécal JL, et al. Nup180, a novel nuclear pore complex protein localizing to the cytoplasmic ring and associated fibrils. *J Cell Biol* 1993;123(6):1345-54.
- [19] Gregorio GV, Choudhuri K, Ma Y, et al. Mimicry between the hepatitis B virus DNA polymerase and the antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1999;162:1802-10.
- [20] Ou Y, Enarson P, Rattner JB, et al. The nuclear pore complex protein Tpr is a common autoantigen in sera that demonstrate nuclear envelope staining by indirect immunofluorescence. *Clin Exp Immunol* 2004;136:379-87.
- [21] Konstantinov K, Foisner R, Byrd D, et al. Integral membrane proteins associated with the nuclear lamina are novel autoimmune antigens of the nuclear envelope. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;74(1):89-99.
- [22] Dieudé M, Sénécal JL, Rauch J, et al. Association of autoantibodies to nuclear lamin B1 with thromboprotection in systemic lupus erythematosus: lack of evidence for a direct role of lamin B1 in apoptotic blebs. *Arthritis Rheum* 2002;46(10):2695-707.
- [23] Lin F, Blake DL, Callebaut I, et al. MAN, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem* 2000;275(7):4840-7.

Epidémiologie de la cirrhose biliaire primitive : évaluation de l'incidence de la maladie en France

Catherine Johanet^{a,*}, Farid Gaouar^b, Anne-Violaine Salle^c, Benjamin Diemert^c, Sofia Meurisse^c, Olivier Chazouillères^b, Fabrice Carrat^c, Raoul Poupon^b, Christophe Corpechot^b

L'étude prospective multicentrique effectuée en 2007 avait pour objectif d'évaluer l'incidence et la prévalence de la cirrhose biliaire primitive (CBP) en France métropolitaine. La méthodologie ainsi que des résultats partiels ont été présentés au 5^e Colloque du GEAI en 2008 [1].

Cette incidence a été déterminée sur la base d'un recensement national des cas incidents d'anticorps anti-mitochondries de type 2 (AAM2) puis validation du diagnostic auprès du médecin prescripteur et description des caractéristiques cliniques et épidémiologiques des patients. Certaines données sont encore aujourd'hui en cours d'exploitation.

Soixante-trois laboratoires ont participé à l'étude, 1 345 patients y ont été inclus, 1 149 médecins prescripteurs ont été contactés avec un taux de réponse de 67 % (n = 772 dont 725 réponses exploitables). Le nombre de nouveaux cas de CBP confirmés sur cet échantillon était de 275 (38 %) (femmes 90 %, âge moyen : 60 ans), 216 (30 %) patients présentaient une CBP déjà connue et 234 (32 %) patients avaient des AAM2 sans diagnostic de CBP établi.

En tenant compte du nombre total de patients recensés,

du taux d'exhaustivité et du pourcentage attendu de CBP séronégatives (10 %), le nombre total de nouveaux cas de CBP estimé en France pendant la durée de l'étude était de 541, soit une incidence, pour 100 000 habitants-années, de 0,9 pour la population générale et de 3,6 pour la population des femmes de plus de 45 ans.

La prévalence a été extrapolée à partir de l'incidence observée et de l'espérance de vie calculée à partir d'une cohorte de 378 patients français suivis de 1990 à 2005. Elle est estimée, pour 100 000 habitants, à 20,7 (IC 95 % : 19,8-21,6) pour la population générale et à 85,9 (IC 95 % : 82,2-89,7) pour les femmes de plus de 45 ans (soit 1 femme de plus de 45 ans atteinte sur 1 200). Ces résultats montrent que la CBP n'est pas une maladie rare chez la femme de plus de 45 ans. L'incidence et la prévalence des AAM2 sont plus élevées que celles de la maladie (incidence des AAM2 : 1,4/100 000 habitants-années pour la population générale et 5,9/100 000 habitants-années pour la population de femmes de plus de 45 ans ; prévalence : 34/100 000 habitants pour la population générale et 143/100 000 habitants pour les femmes de plus de 45 ans).

Les analyses actuellement en cours sont de deux ordres :

1. la recherche de clusters géographiques de patients puis l'analyse des rapports familiaux éventuels entre ces patients ainsi que l'identification des variables environnementales liées à ces clusters ;
2. la recherche du devenir des patients ayant des AAM2 positifs sans CBP déclarée en 2007.

a Unité d'immunologie

b Service d'hépatologie

Centre national de référence des maladies inflammatoires du foie et des voies biliaires

c Unité de Santé publique et INSERM U707

Université Paris 6 Pierre-et-Marie-Curie

Hôpital Saint-Antoine

184, rue du Faubourg Saint-Antoine

75571 Paris cedex 12

* Correspondance

catherine.johanet@sat.aphp.fr

Références

[1] Johanet C, Gaouar F, Salle AV, et al. Evaluation de l'incidence de la cirrhose biliaire primitive en 2007 en France. Rev Fr Lab 2008;404bis:25-8.

Suivi clinicobiologique des grossesses lupiques

Joëlle Goetz^{a,c,*}, Arnaud Theulin^b, Jean Sibilia^{b,c}

1. Introduction

La grossesse chez une femme lupique constitue une période à risque de complications maternelles, fœtales ou néonatales. Elle doit être parfaitement planifiée avec une surveillance multidisciplinaire médicale et obstétricale standardisée, effectuée dans un centre de référence qui a l'expérience de cette situation.

Il est recommandé de bien expliquer à la patiente et à son conjoint les risques materno-fœtaux d'une grossesse au cours d'un lupus. Le « feu vert » n'est donné que si le lupus est quiescent depuis au moins 6 mois, sans contre-indication ou thérapeutique iatrogène (cyclophosphamide, méthotrexate, mycophénolate mofétyl, ciclosporine) en cours.

2. Bilan préconceptionnel

Un bilan préconceptionnel doit être réalisé. Il vise à reconnaître et/ou rechercher :

- les contre-indications, définitives ou temporaires, à une grossesse (clairance de la créatinine < 50 ml/mn, HTA sévère, hypertension artérielle pulmonaire, valvulopathie mal tolérée, antécédents thrombotiques majeurs, corticodépendance > 0,5 mg/kg/jour, poussée lupique récente ou en cours);
- les facteurs de risques de survenue de complications maternelles et fœtales :
 - les complications maternelles sont essentiellement des poussées de la maladie avec des manifestations de

sévérité variable pouvant aller jusqu'à l'apparition d'une atteinte rénale ou neurologique centrale. Cependant, il faut être très attentif au risque de thrombose et d'autres manifestations thrombotiques liées à un syndrome des anti-phospholipides (SAPL), syndrome qui peut aussi favoriser la survenue d'une toxémie gravidique ;

- le risque fœtal est surtout celui d'une perte fœtale précoce (1^{er} trimestre) ou tardive liée à un SAPL. Il existe aussi des risques de prématurité et d'hypotrophie liés à une poussée de lupus maternel ou plus rarement une atteinte fœtale liée aux Ac anti-Ro/SS-A. Le lupus néonatal (LN) peut se manifester par un bloc auriculoventriculaire congénital (BAVC) irréversible, conséquence d'une myocardite induite par les anti-Ro/SS-A et/ou anti-La/SS-B. Une cytopénie et/ou des signes cutanés sont parfois aussi observés, mais contrairement au BAVC, ces manifestations sont réversibles.

3. Surveillance médicale

Une fois l'accord médical et obstétrical donné pour la grossesse, les paramètres de cette surveillance seront

- **cliniques** : poids, TA, signes cutanés et systémiques... ;
 - **biologiques** :
 - *biologie standard* : NFS, créatinine, glycémie à jeun, ALAT, CPK, LDH, uricémie (pré-éclampsie) et bandelette urinaire (protéinurie, hématurie),
 - *bilan d'activité du LES* : titrage du complément total, dosage des fractions C3 et C4,
 - *recherche d'autoanticorps* : Ac antinucléaires, Ac anti-ADN double brin, Ac anti-ENA (en particulier Ac anti-Ro/SS-A60 et anti-La/SS-B), Ac anti-phospholipides (anticoagulant circulant, Ac anti-cardiolipides IgG et IgM, Ac anti-β2-GPI IgG et IgM). L'utilité des Ac anti-TRIM21 (Ro/SS-A52, et en particulier anti-p200) en pratique courante reste à démontrer ;
 - **échographiques**, selon le protocole obstétrical habituel sauf en cas de risque de LN.
- Chez les femmes ayant des anti-Ro/SS-A et/ou anti-La/SS-B, la surveillance obstétricale sera renforcée avec une échographie cardiaque fœtale toutes les semaines ou toutes les deux semaines, la première entre la 13^e et la 16^e semaine d'aménorrhée (SA) jusqu'à la 26^e SA. Le risque de survenue d'un BAVC est faible (1 à 2 %) s'il n'y a pas d'antécédents de BAVC ; lorsqu'un enfant est atteint le risque de récurrence de BAVC est de 17 %.
- En pratique, dès le diagnostic de la grossesse, le bilan biologique comprendra un bilan standard associé à un bilan d'activité du LES et une recherche d'autoanticorps (cf. ci-dessus).

a Laboratoire central d'immunologie

Nouvel Hôpital Civil
1, place de l'hôpital
67091 Strasbourg cedex

b Service de rhumatologie

Hôpital de HautePierre
1, avenue Molière
67098 Strasbourg cedex

c Centre national de référence des maladies auto-immunes systémiques

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
1, place de l'hôpital
67091 Strasbourg cedex

* Correspondance

jean.sibilia@wanadoo.fr

© 2010 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

La surveillance clinique et biologique (bilan standard et d'activité du LES) sera ensuite mensuelle jusqu'à la 20^e SA, bimensuelle jusqu'à la 32^e SA, puis hebdomadaire jusqu'à l'accouchement. Les titrages d'anticorps antinucléaires et anti-ADN double brin seront réalisés toutes les 6 à 12 semaines, il n'y a pas lieu de surveiller les titres des APL.

La patiente sera surveillée dans le post-partum, période propice aux poussées, au moins 3 mois après l'accouchement.

4. Conclusion

En 2010, le pronostic des grossesses chez les femmes lupiques est excellent sous réserve d'un suivi clinicobiologique régulier jusqu'au 3^e mois après l'accouchement. Cependant

malgré les progrès récents dans la surveillance d'une grossesse lupique, le taux de prématurité reste élevé et ce d'autant plus qu'il existe un SAPL favorisant la survenue d'une pré-éclampsie et/ou d'une insuffisance placentaire.

Le point-cléf pour le bon pronostic d'une grossesse lupique est une planification et une standardisation organisées par une équipe expérimentée dans ce domaine.

Bibliographie

- Brucato A, Cimaz R, Caporali R, et al. Pregnancy outcomes in patients with autoimmune diseases and anti-Ro/SSA antibodies. Clin Rev Allergy Immunol (2010) on line.
- Lê Thi Huong D, Wechsler B, Piette JC, Grossesse et lupus systémique. Rev Med Interne 2008;29:725-30.

À propos de la diversité des profils immunologiques du syndrome des antiphospholipides

Marielle Sanmarco^{a,*}

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) est une maladie auto-immune caractérisée par l'association d'anomalies cliniques (accidents thrombotiques et/ou complications obstétricales) avec la présence d'anticorps anti-phospholipides. Les anticorps anti-phospholipides reconnus comme les marqueurs biologiques de ce

syndrome sont : les anticorps anti-cardiolipine (IgG et/ou IgM), les anticorps anti-B2GPI (IgG et/ou IgM) et le lupus anticoagulant. Les événements cliniques associés au SAPL sont fréquents en dehors de ce contexte, aussi les résultats de l'exploration biologique ont un impact important sur le diagnostic, d'autant plus que la positivité persistante d'un seul test est suffisante pour l'établir. D'après notre expérience et la littérature, la triple positivité des marqueurs biologiques représente le facteur de risque le plus élevé de développer un SAPL mais aussi de récurrence des événements cliniques. Mais ceci est une règle générale et, dans la pratique courante du laboratoire, nous sommes confrontés à une grande diversité dans les profils anticorps, les évolutions dans le temps et les associations cliniques. Au cours de cet exposé, seront présentés quelques cas cliniques afin d'illustrer ce propos et de proposer certaines recommandations pour valider la positivité d'un seul test.

a Laboratoire d'immunologie
Centre hospitalier universitaire – Hôpital de La Conception
147, bd Baille
13385 Marseille cedex 05

* Correspondance
msanmarco@mail.ap-hm.fr

© 2010 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.