

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale

N° 13

février 99

**AUTOIMMUNITÉ
ET
AUTOANTICORPS**





Cher Confrère,

Le Cahier de Formation de Biologie Médicale numéro 13, que nous vous proposons ci-après, traite d'Autoimmunité, des Facteurs Rhumatoïdes et des Anticorps anti-nucléaires, dans une perspective principalement centrée sur la pratique de ces examens.

Il est important que le biologiste de ville, quelle que soit la taille de son laboratoire, puisse effectuer dans d'excellentes conditions techniques de qualité ce type d'exploration dont la prescription augmente d'année en année.

C'est une des missions de la formation continue conventionnelle ; BIOFORMA s'attache tout particulièrement à demander à des spécialistes reconnus leur contribution, dans ces domaines où ils excellent, pour que soit mis à la disposition de tous l'information sérieuse et documentée, base de tout enseignement.

L'Autoimmunité est une discipline dans laquelle le dialogue Clinicien/Biologiste doit être très étroit et permanent tout au long de l'évolution du traitement du patient.

Nous espérons que ce Cahier vous apportera les connaissances indispensables à la qualité et à l'efficacité de ce dialogue.

Nous vous en souhaitons bonne réception et vous prions d'agréer, Cher Confrère, nos confraternelles et cordiales salutations.

**Adrien BEDOSSA
Président**

AUTOIMMUNITÉ

ET

CAHIER DE
Formation
version numérique

AUTOANTICORPS

Ouvrage réalisé sous la direction de :

Docteur Bach-Nga PHAM, Hôpital Beaujon, Clichy

Professeur Jean-Louis PREUD'HOMIVIE, CHU de Poitiers

Et

Sous l'égide de la Société Française d'Immunologie

Institut Pasteur, Paris

**Toute reproduction, même partielle, ne peut être faite
qu'après autorisation des auteurs**

LISTE DES AUTEURS

- Jean Louis PREUD'HOMME
Président de la sous-section 47-03, Immunologie,
du Conseil National des Universités
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Immunologie et Immunopathologie
CNRS ESA 6031 Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers
La Milètrie
BP 577
86021 POITIERS CEDEX

- Jacques CLOT
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Immunologie
Hôpital Saint-Éloi
34295 MONTPELLIER CEDEX 5

- Jean-Louis PASQUALI
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
Service d'Immunologie Clinique
Clinique Médicale A
Hôpital civil Centre Hospitalier Universitaire
BP 426
67091 STRASBOURG CEDEX

- Pierre YOUINOU
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Immunologie
Centre Hospitalier Universitaire
BP 824
29609 BREST CEDEX

- Alain SARAUX
Praticien Hospitalier Universitaire
Service de Rhumatologie et Médecine Interne
Centre Hospitalier Universitaire
BP 824
29609 BREST CEDEX

- Paul LE GOFF
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
Service de Rhumatologie et Médecine Interne
Centre Hospitalier Universitaire
BP 824
29609 BREST CEDEX

- Lucile MUSSET
Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Immunochimie
Hôpital Pitié-Salpêtrière
47-83 bd de l'Hôpital
75013 PARIS

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

]

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

]

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

]

Seule une impression pour une copie personnelle (étudiant, interne, biologiste de labm) est permise.



Les maladies autoimmunes affectent tous les tissus, tous les organes, et elles représentent une partie importante de la pathologie à laquelle sont confrontés non seulement l'interniste et le généraliste, mais aussi les spécialistes de toutes les disciplines médicales. La fréquence de certaines maladies autoimmunes augmente réellement depuis quelques décennies (et pas simplement à cause d'une meilleure approche diagnostique). Ceci a conduit à une multitude d'études aussi bien dans des modèles animaux de mieux en mieux compris qu'en pathologie humaine. Ces travaux ont considérablement augmenté les connaissances sur les mécanismes de l'induction des maladies autoimmunes et les mécanismes effecteurs de la destruction de l'organe ou du tissu cible et en ont révélé l'extrême complexité, sans pour autant encore bouleverser une thérapeutique largement empirique, parfois peu logique, non exempte de dangers.

La gravité de certaines maladies autoimmunes, la signification pronostique en terme de maladie chronique invalidante d'autres, la toxicité de certains traitements implique que le diagnostic soit porté sur des bases rigoureuses. Pathognomonique n'existe pas en autoimmunité et le diagnostic repose sur l'intégration par un clinicien compétent de nombreuses données cliniques et biologiques, sans attendre une certitude d'un résultat biologique souvent considéré à tort comme spécifique (il est, par exemple, établi depuis une vingtaine d'années que la présence d'un titre élevé d'anticorps anti-ADN natif ou d'anticorps anti-Sm s'observe, certes très rarement, en dehors du lupus dans d'autres maladies autoimmunes caractérisées) ou de l'arithmétique curieuse (et parfois manifestation erronée) de l'addition de critères individuellement plus ou moins spécifiques, fussent-ils définis par une association prestigieuse.

Le premier écueil est que la réactivité contre le soi n'est pas pathologique mais inhérente à la physiologie du système immunitaire. C'est ainsi que les anticorps dits naturels, car produits chez les sujets normaux en l'absence de stimulation, réagissent souvent avec des autoanticorps. Par exemple, tous les sérums normaux contiennent des facteurs rhumatoïdes (anticorps anti-IgG) qui jouent un rôle dans l'homéostasie du système immunitaire (et il a été suggéré que la délétion de gènes variables codant des facteurs rhumatoïdes pourrait être impliquée dans l'apparition de maladies autoimmunes) et les récepteurs d'antigènes d'un pourcentage notable de lymphocytes B circulants normaux ont la même spécificité anti-IgG, avec des implications dans la réponse normale contre des antigènes exogènes. Pourtant, dans certaines conditions, des facteurs rhumatoïdes sont pathogènes. De plus, par divers mécanismes, des stimulations antigéniques fortes et prolongées (comme au cours de certains processus infectieux) augmentent la production d'autoanticorps. Ce n'est donc en général pas la simple présence d'autoanticorps qui est pathologique, mais leurs caractéristiques en termes d'affinité, isotypie, concentration, etc.

Un autre problème est que l'éventail des approches diagnostiques biologiques en autoimmunité est largement représenté par les autoanticorps alors même que la majorité des lésions autoimmunes sont médiées par des lymphocytes T et éventuellement des cytokines. Il n'est pas contestable que certains autoanticorps sont la cause directe des lésions, avec des preuves expérimentales solides, mais ceci est loin d'être la règle et ce n'est pas parce qu'un autoanticorps est présent dans le sérum à une dilution de l'ordre du millionième qu'il est nécessairement pathogène. Il peut néanmoins avoir, alors, un intérêt diagnostique.

Le dernier écueil est l'imperfection des outils dont dispose le biologiste. Les choses ont certes beaucoup changé au cours des deux dernières décennies, avec l'apparition de techniques nouvelles telles que l'ELISA, la caractérisation fine de nombreux autoanticorps et les avancées du génie génétique qui ont permis l'élaboration de tests beaucoup plus spécifiques. Mais certaines techniques de base, immunofluorescence indirecte par exemple, ont peu évolué et conservent une grande valeur d'orientation. La principale évolution est peut-être ailleurs. Les examens immunologiques étaient autrefois surtout effectués par des laboratoires spécialisés utilisant des techniques artisanales. Cette époque, où nous fabriquions nous-mêmes nos antisérums, est révolue (ce qui ne dispense pas de l'obligation de contrôler la spécificité des réactifs commerciaux, avec parfois des constatations ahurissantes). La disponibilité de trousse commerciales a fait entrer ces examens dans les laboratoires généralistes et, ce qui est plus grave, dans ceux de spécialistes d'autres disciplines biologiques, qui revendiquent l'exécution d'explorations qui relèvent de l'immunologie tout en ayant une culture toute différente, phénomène facilité par une nomenclature incohérente et les pressions en faveur d'une automatisation forcenée de certains penseurs de ministères ou agences européennes. Pour des raisons de coût, et surtout pour pouvoir contrôler les différents paramètres, beaucoup d'immunologistes préfèrent des techniques artisanales à l'emploi de trousse ; et ce malgré la réglementation. Le GBEA valide sans examen l'utilisation des trousse et pas les techniques « maison ». Pourtant, en l'absence de toute évaluation scientifique préalable, la mise sur le marché des réactifs commerciaux n'apporte aucune garantie de qualité. Il est par exemple scandaleux que l'immense majorité des coffrets ELISA commerciaux soit dépourvue de puits contrôles sans antigène. Ils ne détectent pas les « faux positifs » dus à la liaison directe du sérum au puits, situation non exceptionnelle, notamment dans la recherche des anticorps anti-ADN (voir ci-dessous). Nous avons récemment comparé plusieurs trousse ELISA de caractérisation des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles avec la même batterie de sérums pathologiques bien caractérisés. Les résultats étaient sensiblement différents, pour des autoanticorps à forte signification diagnostique. Il faut noter que l'évaluation préalable des réactifs commerciaux ne résoudrait pas tous les problèmes en raison de leur variabilité et d'éventuels accidents de parcours tels qu'un séjour prolongé au soleil dans un avion ou un train bloqué par une grève. Autre exemple, les antigènes utilisés pour la détection de certains anticorps anti phospholipides donnent des résultats différents non seulement d'un fournisseur à l'autre, mais aussi d'un lot à l'autre chez le même fournisseur. Un changement de lot nous conduit à refaire tous les contrôles et à étudier une centaine de sérums normaux pour redéfinir les valeurs normales. Toutes ces observations soulignent l'importance des contrôles internes obligatoirement inclus dans chaque expérience.

Le présent cahier, largement dû à l'inépuisable énergie du Dr B.N. Pham, ne vise ni à l'exhaustivité ni à la description détaillée de techniques (il existe pour cela d'excellents manuels). Il espère donner quelques indications sur les principes des méthodes et l'interprétation des résultats. Pour les facteurs rhumatoïdes, il s'agit de la synthèse de l'expérience de deux groupes alors que, pour les anticorps anti-nucléaires, nous avons laissé s'exprimer des sensibilités différentes au risque de quelques redondances.

Professeur J.L. Preud'homme

AUTOIMMUNITÉ ET AUTOANTICORPS

LES FACTEURS RHUMATOÏDES : MÉTHODES DE DÉTECTION ET INTERPRÉTATION	11
I - INTRODUCTION	13
II - MODALITÉS DE PRÉLÈVEMENT	14
III - DÉTECTION ET DOSAGES DES FACTEURS RHUMATOÏDES	14
Principes généraux	14
Méthodes d'agglutination passive	14
Méthodes de précipitation ; turbidimétrie-néphélémétrie	16
Méthodes immunoenzymatiques.....	17
IV - INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	19
Remarques générales.....	19
Les facteurs rhumatoïdes physiologiques	19
Les facteurs rhumatoïdes en pathologie.....	20
V - RÔLE PATHOGÉNIQUE	22
VI - BIBLIOGRAPHIE	23
 LES ANTICORPS ANTI-NUCLEAIRES	 25
I - QUELLES SONT LES INDICATIONS DE LA RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES ?	 27
La situation du problème	27
La pratique médicale courante	28
Les indications de l'examen.....	29
II - COMMENT METTRE EN ÉVIDENCE LES ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES ?	 30
Le dépistage des anticorps anti-nucléaires	30
La recherche des anticorps anti-nucléaires contre les antigènes nucléaires insolubles.....	32
L'analyse des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles	33

III - COMMENT ORIENTER LE DIAGNOSTIC	34
Anticorps anti-ADN et anti-ARN.....	34
Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles.....	34
IV - BIBLIOGRAPHIE	36

LES ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES : MÉTHODES DE DÉTECTION ET INTERPRÉTATION	39
I - GÉNÉRALITÉS	41
II - STRUCTURES NUCLÉAIRES ET PRINCIPALES CIBLES RECONNUES	42
La membrane nucléaire.....	42
Les constituants de la chromatine.....	43
Les constituants du nucléole.....	46
Les ribonucléoprotéines.....	46
III - DÉPISTAGE ET IDENTIFICATION DES ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES	47
Dépistage des anticorps anti-nucléaires.....	47
Identification des anticorps anti-nucléaires.....	58
Anticorps anti-ADN.....	58
Anticorps anti-histones et anti-nucléosomes.....	63
Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles.....	64
Anticorps anti-protéines de la membrane nucléaire.....	69
IV - CONCLUSION	70
V - BIBLIOGRAPHIE	70

LES FACTEURS RHUMATOÏDES : MÉTHODES DE DÉTECTION ET INTERPRÉTATION

Jacques CLOT, Jean-Louis PASQUALI

CAHIER **BIOFORMA**
DE
Formation
version numérique

I - INTRODUCTION

II - MODALITÉS DE PRÉLÈVEMENT

III - DÉTECTION ET DOSAGES DES FACTEURS RHUMATOÏDES

III.1. Principes généraux

III.2. Méthodes d'agglutination passive

III.3. Méthodes de précipitation : turbidimétrie-néphélémétrie

III.4. Méthodes immunoenzymatiques

IV - INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

IV.1. Remarques générales

IV.2. Les facteurs rhumatoïdes physiologiques

IV.3. Les facteurs rhumatoïdes en pathologie

V - RÔLE PATHOGÉNIQUE

VI - BIBLIOGRAPHIE

LES FACTEURS RHUMATOÏDES : MÉTHODES DE DÉTECTION ET INTERPRÉTATION

I. INTRODUCTION

Les facteurs rhumatoïdes (FR) sont des autoanticorps, principalement de classe IgM, dirigés contre le fragment Fc des IgG humaines et/ou animales (figure 1). Généralement, une molécule d'IgM peut fixer jusqu'à cinq molécules d'IgG, avec une constante d'association généralement faible (10^{-4} à 10^{-5} M^{-1}).

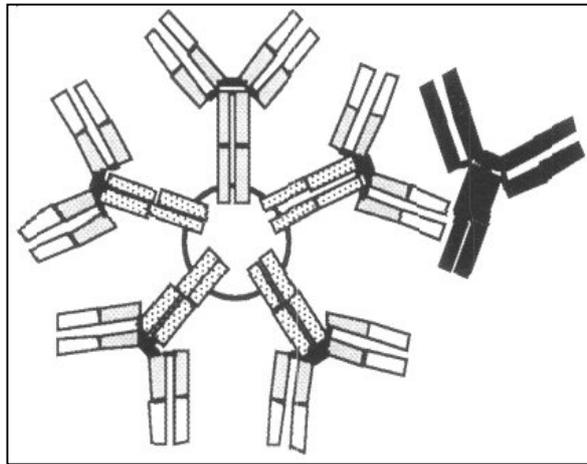


Figure 1: FR de classe IgM anti-IgG
(une seule molécule d'IgG
a été représentée volontairement).

L'IgM peut aussi bien reconnaître les IgG humaines (autologues ou non) que les IgG de lapin, qu'elles soient sous forme native ou dénaturée (IgG agrégées ou complexées à un antigène). Le site de fixation de l'autoanticorps se situe sur le domaine CH2 des IgG humaines (allotypes Gm5, Gm21) et sur les domaines CH2 et CH3 des IgG de lapin (isotype Ga). Il a été historiquement désigné FR, ses découvreurs pensant qu'il était caractéristique de la polyarthrite rhumatoïde (PR). Comme nous le verrons plus loin, cette notion est très discutable, mais le terme est resté.

La première technique décrite dans les années 40 par E. Waaler et H. M. Rose, basée sur le principe de l'hémagglutination passive, employait des globules rouges de mouton recouvertes d'IgG de lapin. Puis, un test utilisant des particules de latex recouvertes d'IgG humaines a été développé (test au latex de Singer et Plotz). L'automatisation des laboratoires a incité à mettre en place la recherche du FR par précipitation (néphélométrie ou tur-

bidimétrie) avec des IgG humaines agrégées ou fixées sur des particules de latex. Plus récemment, des méthodes immunoenzymatiques ont été proposées, malgré les difficiles problèmes de standardisation qu'elles posent.

Enfin, rappelons que plusieurs auteurs ont montré que les FR pouvaient parfois réagir avec d'autres antigènes non structurellement apparentés aux IgG, en particulier des antigènes nucléaires (1) ou la β 2 microglobuline (2). Si le mécanisme de cette multiréactivité commence à être mieux connu (3), ces autres antigènes ne sont pas utilisés en pratique dans la détection des FR.

■ II. MODALITÉS DE PRÉLÈVEMENT

Comme pour tout autoanticorps, la recherche et le dosage de FR nécessitent quelques millilitres de sérum. Le prélèvement doit donc être réalisé sur tube sec. Il n'y a aucune condition particulière d'acheminement du prélèvement.

Arrivé au laboratoire, le sérum doit être décanté classiquement et réparti en aliquotes de 500 μ L destinés au dosage immédiat et à la sérothèque (congélation à -20 ou -80°C, à ne décongeler qu'une seule fois).

■ III. DÉTECTION ET DOSAGES DES FACTEURS RHUMATOÏDES

III.1 - Principes généraux

L'antigène est constitué d'IgG humaines ou animales (lapin essentiellement). Celles-ci doivent être soit fixées sur un support visible (globules rouges ou particules de latex) ou sur une microplaque de titration, soit agrégées. La nomenclature des actes de biologie médicale faisant état de « recherche quantitative des FR », les tests sur lame, dit de dépistage, et ne permettant d'indiquer qu'une positivité ou une négativité, doivent être proscrits.

III.2 - Méthodes d'agglutination passive

Ce sont les premières techniques décrites et toujours largement employées en routine. Elles sont basées sur l'emploi d'IgG liées à un support visible, érythrocytes ou latex. Lorsque le support est constitué d'hématies, les IgG sont des anticorps spécifiques anti-globules rouges. Lorsque le support est fait de particules de latex, les IgG sont liées de façon non spécifique. Le FR présent dans le sérum du malade se fixe spécifiquement à plusieurs IgG elles-mêmes liées au support, provoquant une réaction d'agglutination. Étant donné le principe même de ce type de méthode, seuls les FR formés d'IgM (classe d'anti-corps ayant les plus fortes propriétés d'agglutination) sont détectés.

III.2.1- Réaction de Waaler-Rose

Principe

L'antigène est constitué d'hématies de mouton recouvertes d'IgG de lapin anti-hématies de mouton (figure 2). La présence d'anticorps naturels hétérosécificiques anti-hématies de mouton dans beaucoup de sérums humains nécessite leur absorption préalable avec des hématies de mouton.

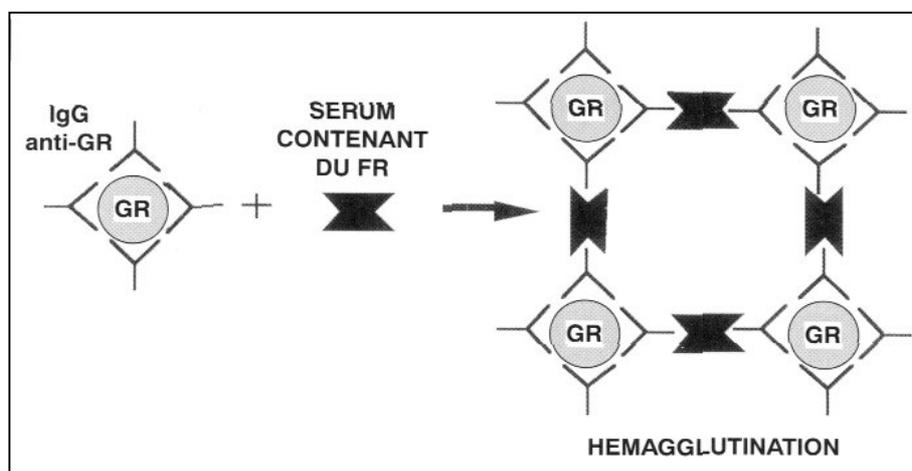


Figure 2 : Principe d'une réaction d'hémagglutination passive pour détecter le FR de classe IgM.

Matériel et réactifs

Les troupes commerciales comportent une suspension d'hématies de mouton sensibilisées par des IgG de lapin spécifiques. Les contrôles doivent être des hématies de mouton seules, des sérums témoins positif et négatif pour les FR.

Mode opératoire

Les sérums à étudier sont généralement dilués à partir du 1:20 selon une progression géométrique de raison 2 classique. Il faut prévoir un témoin-sérum pour s'assurer que celui-ci n'agglutine pas spontanément les hématies de mouton non sensibilisées. Si c'est le cas, il faut absorber les anticorps naturels hétérosécificiques au préalable. Des témoins FR positifs et négatifs, étalonnés en UI/mL selon le standard de l'OMS, doivent être inclus à chaque dosage. Ce type de technique peut être réalisé en tube ou, mieux, en microplaque à fond conique.

Lecture

L'hémagglutination est facilement visible à l'œil nu. Le titre du sérum en FR correspond à la plus forte dilution où l'on observe encore une hémagglutination.

Interprétation des résultats

Actuellement, le standard OMS de FR donne une valeur seuil de 15 UI/mL, au-dessus de laquelle un échantillon doit être considéré comme positif. Toutefois, comme pour tous les dosages d'autoanticorps, il est souhaitable que chaque laboratoire établisse ses propres normes en déterminant une valeur seuil à partir de multiples échantillons de sérums provenant de sujets en bonne santé.

III.2.2 - Réactions de Waaler-Rose modifiées

À cause des difficultés liées à l'emploi des globules rouges de mouton, des variantes de la réaction classique de Waaler-Rose ont été proposées.

Principe

Le principe global reste le même. Il s'agit toujours de disposer d'hématies recouvertes d'IgG spécifiques. Pour ce faire, plusieurs solutions existent : soit des hématies humaines de groupe O rhésus positif recouvertes par des IgG humaines anti-C/D, soit des hématies humaines de groupe O rhésus négatif recouvertes d'IgG de lapin anti-hématies humaines, soit des globules rouges de mouton formolés et tannés, recouverts d'IgG de lapin.

III.2.3 - Test au latex

Principe

Le test au latex de Singer utilise des billes recouvertes d'IgG humaines agrégées. Les sérums à étudier doivent être dilués classiquement. La réaction quantitative est effectuée en tubes. L'agglutination des particules de latex est facilement visible à l'œil nu. Le titre du sérum en FR correspond à la plus forte dilution où l'on observe encore une agglutination.

III.3 - Méthodes de précipitation : turbidimétrie - néphélémétrie

Principe

L'antigène est constitué soit de particules de polystyrène (latex) recouvertes d'IgG humaines et de gammaglobulines de mouton anti-gammaglobulines humaines, soit d'IgG humaines agrégées. Si le sérum à tester contient du FR, il se forme des complexes entre le FR et les IgG fixées au latex ou agrégées. Le faisceau de lumière qui vient frapper ces complexes est dispersé. L'intensité relative de lumière dispersée est proportionnelle à la concentration en FR dans le sérum après calibration avec un standard.

Matériels et réactifs

Les trousse commerciales comprennent généralement les particules de latex recouvertes d'IgG, et un standard constitué d'un pool de sérums fortement positifs, étalonné sur la préparation de référence de l'OMS. La concentration de ce standard est exprimé en UI/mL. En outre, les trousse contiennent des contrôles internes dont la concentration de FR en UI/mL est indiquée par le fabricant. Le matériel de mesure est soit un néphélémètre, soit un turbidimètre.

Mode opératoire

La courbe d'étalonnage est effectuée par dilutions automatiques du standard de FR. Habituellement, cette courbe peut être utilisée pendant une semaine à condition que les résultats trouvés pour les contrôles internes soient corrects. Les échantillons de sérums pathologiques à tester sont dilués automatiquement, en général, au 1:20 dans un diluant approprié au matériel de mesure. Si un échantillon montre une concentration très forte de FR, on peut être amené à faire une dilution complémentaire du sérum (au 1:100 par exemple).

Lecture

Les appareils de mesure indiquent habituellement le résultat de chaque échantillon, exprimé en UI/mL.

Interprétation des résultats

Actuellement, le standard OMS de FR donne une valeur seuil de 15 UI/mL, au-dessus de laquelle un échantillon doit être considéré comme positif. Toutefois, comme pour tous les dosages d'autoanticorps, il est souhaitable que chaque laboratoire établisse ses propres normes en déterminant une valeur seuil à partir de multiples échantillons de sérums provenant de sujets en bonne santé.

III.4. - Méthodes immunoenzymatiques

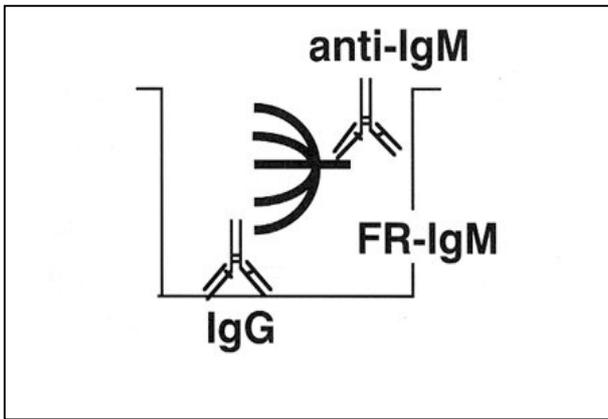
Principe

Des méthodes immunoenzymatiques (ELISA) sont proposées pour doser les FR de classe IgM, IgA et même IgG. Toutefois, des problèmes de standardisation existent souvent à cause de la nature même des FR. Idéalement, « l'antigène » fixé au fond de la plaque devrait être seulement des fragments Fc d'IgG, ce qui est rarement le cas. De plus, la détection de FR de classe IgA ou IgG peut être biaisée par la présence simultanée de FR de classe IgM dans un sérum. En effet, ce dernier peut se lier au fragment Fc de l'anticorps anti-IgG ou IgA (figure 3).

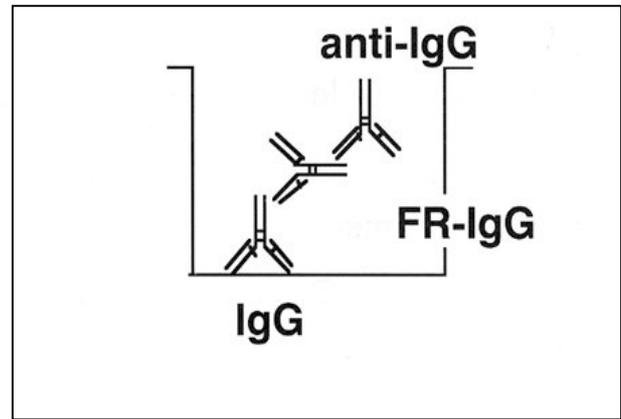
Si bien que l'anticorps destiné à révéler la classe des FR doit obligatoirement être un fragment F(ab')₂, donc totalement dépourvu de portion Fc. De plus, il faut dépolymériser les IgM du sérum pour diminuer leur fixation aux IgG.

Lorsqu'on souhaite doser uniquement les FR de classe IgM par ELISA, on peut employer un test qui combine les deux spécificités principales de l'autoanticorps, c'est-à-dire les IgG humaines et de lapin (fragments Fc de ces IgG fixés sur des microplaques). De même, l'emploi d'un anticorps monoclonal ne révélant que les IgM humaines peut augmenter la spécificité de la réaction.

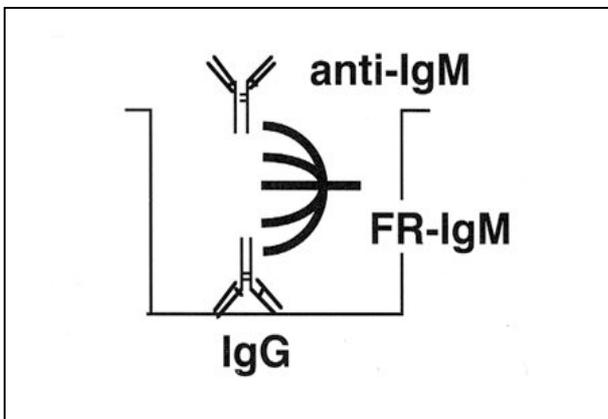
Même en utilisant des fragments Fc pour sensibiliser les plaques et des fragments F(ab')₂ pour révéler les FR de classe IgG ou IgA, l'interprétation de ces tests reste pour le moins délicate, sans parler d'autres tests franchement fantaisistes. Une alternative (non utilisable en routine) repose sur l'isolement des FR par chromatographie d'affinité, suivie de leur caractérisation immunochimique (4).



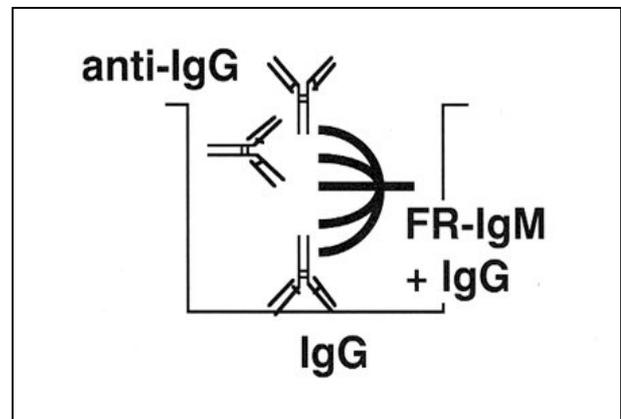
*A : Réaction théorique.
des IgG (antigène) sont fixées au fond
d'une microplaque. Le Fr de classe IgM
reconnait les IgG. Sa présence est révélée
par un anticorps anti-IgM.*



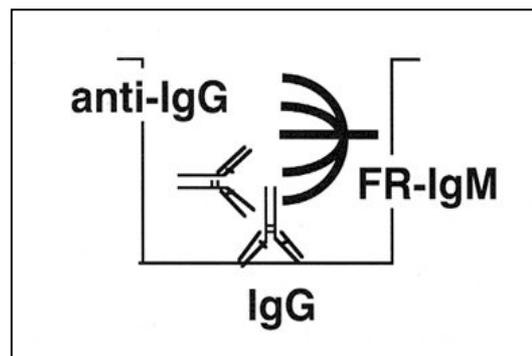
*B : Réaction théorique.
des IgG (antigène) sont fixées au fond
d'une microplaque. Le Fr de classe IgG
reconnait les IgG. Sa présence est révélée
par un anticorps anti-IgG.*



*C : Réaction faussement négative ou
faiblement positive.
Le Fr de classe IgM reconnaît les IgG du
fond de la microplaque, mais aussi
l'anticorps anti-IgM qui est un IgG..*



*D : Réaction faussement positive laissant
penser à la présence de FR classe IgG.
L'anticorps anti-IgG se fixe non pas à un
FR de classe IgG mais aux IgG déjà liées à
du FR de classe IgM.*



*E : Réaction faussement positive laissant penser à la
présence de FR classe IgG.
L'anticorps anti-IgG se fixe non pas à un FR de classe
IgG mais aux IgG fixées au fond de la microplaque.*

Matériel et réactifs

Les troupes commerciales répondant aux impératifs techniques indiqués ci-dessus doivent normalement comporter des microplaques dont les puits sont recouverts de fragments Fc d'IgG humaine et/ou animale. L'anticorps permettant de révéler la fixation de FR sur les IgG doit être un fragment F(ab')₂ couplé à une enzyme (phosphatase alcaline, peroxydase, etc.). L'étape de chromogénèse est réalisée en ajoutant le substrat approprié qui donne une coloration proportionnelle à la quantité de FR présent dans le sérum. La réaction enzymatique est bloquée par NaOH 1N.

Lecture

La lecture des densités optiques se fait à 405 nm avec un spectrophotomètre.

■ IV. INTERPRÉTATION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

IV.1 - Remarques générales

Comme pour tous les dosages d'autoanticorps, l'intérêt diagnostique du FR est basé sur :

- la sensibilité du test, c'est-à-dire le nombre de patients ayant un test positif par rapport au nombre total de patients étudiés (positifs et négatifs) ;
- la spécificité du test, c'est-à-dire le nombre de sujets normaux ayant un test négatif par rapport au nombre total de sujets normaux étudiés (négatifs et positifs) ;
- la valeur prédictive du test, c'est-à-dire le nombre de patients ayant un test positif par rapport au nombre total de cas positifs (patients positifs et sujets normaux positifs).

Les FR occupent une place particulière parmi les autoanticorps. En effet, le rôle physiologique de ces autoanticorps est actuellement très fortement suggéré, expliquant ainsi leur présence chez les sujets normaux, avec une fréquence d'autant plus grande que la technique de détection utilisée est très sensible.

IV.2 - Les facteurs rhumatoïdes physiologiques

Plusieurs observations plaident pour l'attribution d'un rôle physiologique à la production de facteurs rhumatoïdes chez l'homme et chez l'animal. Chez la souris, il a été particulièrement démontré que la synthèse de facteurs rhumatoïdes est très fréquente au décours d'une immunisation avec un antigène exogène (5). Chez l'homme normal, les études de stimulation lymphocytaire *in vitro* ont montré la fréquence élevée de cellules précurseurs susceptibles de synthétiser des facteurs rhumatoïdes *in vitro* à la suite d'une stimulation, par exemple par la protéine A de staphylocoque. Des études en dilution limite ont pu estimer que la fréquence des lymphocytes B précurseurs de la synthèse de facteurs rhumatoïdes de classe IgM était de l'ordre de 1 à 3 lymphocytes B pour 1000 lymphocytes B circulants (6). Le rôle de ces facteurs rhumatoïdes physiologiques pourrait être de deux ordres :

- d'une part, sous forme sécrétée, les facteurs rhumatoïdes de classe IgM se fixent faiblement avec les IgG monomériques mais se lient avec une forte avidité à des IgG alignées sur une surface solide telle, par exemple, qu'une paroi bactérienne. Ils stabilisent ainsi la liaison des anticorps de classe IgG de faible affinité produite au cours des phases initiales d'une réponse immunitaire contre un agent infectieux. Ces facteurs rhumatoïdes pourraient également faciliter la clairance des complexes immuns antigènes-IgG. Le rôle de ces FR naturels dans les mécanismes de défense anti-tumorale et l'homéostasie du système immunitaire a également été avancé.

- d'autre part, sous forme de facteurs rhumatoïdes membranaires : les lymphocytes B qui produisent ces facteurs rhumatoïdes membranaires peuvent jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes *in vitro* (7). En effet, au cours d'une réponse immunitaire humorale conventionnelle, le lymphocyte B spécifique de l'antigène est une cellule essentielle dans la présentation antigénique. L'immunoglobuline de surface du lymphocyte B détermine la spécificité pour l'antigène qui est capté, internalisé, métabolisé et présenté au lymphocyte T. Cependant, la fréquence de tels lymphocytes B spécifiques de l'antigène est relativement faible alors que la fréquence des lymphocytes B ayant un facteur rhumatoïde de membrane est beaucoup plus élevée. Ces cellules ayant à la surface un facteur rhumatoïde ont la capacité de fixer les complexes immuns IgG-antigène, quel que soit l'antigène lié par les anti-corps circulants. De tels complexes peuvent être internalisés permettant ainsi la présentation d'un grand nombre d'antigènes par des lymphocytes B dont le récepteur de membrane n'avait pas d'activité exo-antigénique. La localisation préférentielle des précurseurs B exposant un facteur rhumatoïde membranaire dans la zone manteau des ganglions lymphatiques est compatible avec ce modèle (8).

IV.3 - Les facteurs rhumatoïdes en pathologie

Il convient de distinguer les situations où la synthèse de facteurs rhumatoïdes correspond à une prolifération monoclonale lymphocytaire B et celles où les facteurs rhumatoïdes sont issus d'une population lymphocytaire B polyclonale.

IV.3.1 - Les facteurs rhumatoïdes au cours des syndromes lymphoprolifératifs monoclonaux

Au cours de la maladie de Waldenström, environ 10 % des patients ont une IgM monoclonale dont l'activité anticorps reconnue correspond à la définition d'un facteur rhumatoïde. La ou les raisons permettant d'expliquer cette fréquence élevée d'IgM à activité facteur rhumatoïde parmi les patients atteints de maladie de Waldenström reste(nt) mal connue(s). Plusieurs hypothèses ont pu être avancées : la spécificité de l'immunoglobuline de surface peut jouer un rôle dans la cancérogenèse en permettant l'internalisation d'un virus transformant, la réactivité des immunoglobulines de surface vis-à-vis d'autoantigènes ubiquitaires tels que les IgG pourrait aussi expliquer une stimulation permanente des cellules B augmentant ainsi le risque d'événements transformants, ou bien encore l'existence d'une propriété intrinsèque de la sous-population lymphocytaire B (productrice d'anticorps naturels) dont sont issues les cellules tumorales.

Parmi les cryoglobulinémies, les cryoglobulinémies mixtes de type II sont caractérisées par la nature monoclonale du composant IgM qui est en général un facteur rhumatoïde. Les

lymphocytes proliférant dans cette situation sont détectables à la fois dans le sang périphérique et dans la moelle osseuse mais habituellement n'ont pas de caractère néoplasique. Ces cryoglobulinémies de type II sont fréquemment associées à des états infectieux ou inflammatoires subaigus ou chroniques mais apparaissent aujourd'hui souvent contemporaines d'une infection par le virus de l'hépatite C (9). La cryoglobulinémie sera alors constituée d'un facteur rhumatoïde monoclonal fixant des IgG anti-virus de l'hépatite C. Il s'agit donc là d'un exemple fascinant de pathologie infectieuse connue susceptible, par un mécanisme qui reste aujourd'hui indéterminé, d'induire une lymphoprolifération B monoclonale produisant un autoanticorps.

IV.3.2 - Les facteurs rhumatoïdes polyclonaux

L'incidence exacte de la détection de facteurs rhumatoïdes sériques dans une population dépend pour une large part des méthodes de dosage utilisées et du titre choisi pour distinguer les sujets séropositifs des sujets séronégatifs. Si l'on ne tient compte que de méthodes de détection fondées sur les tests d'agglutination, le titre des facteurs rhumatoïdes dans la population normale apparaît comme une variable continue sous forme d'une courbe de Gauss (10). Le vieillissement normal s'accompagne d'une augmentation de la production des facteurs rhumatoïdes : des méthodes très sensibles, sans intérêt clinique, permettent la détection de ces autoanticorps chez les sujets normaux jeunes, alors que la simple utilisation des méthodes d'agglutination permet de trouver des facteurs rhumatoïdes sériques en particulier chez les sujets âgés de plus de 70 ans (voir tableau I).

Tableau I : Fréquence des facteurs rhumatoïdes décelables par des techniques d'agglutination

Situation	Fréquence de détection
Sujet normal (< 65 ans)	< 5 %
Sujet normal âgé (> 65 ans)	5-10 %
Pathologies avec manifestations articulaires	
Polyarthrite rhumatoïde	60-80 %
Syndrome de Sjögren primitif	70-90 %
Lupus érythémateux systémique	25-40 %
Sclérodémie systémique	20-30 %
Hépatite chronique autoimmune	10-45 %
Connectivite mixte	40-50 %
Sarcoïdose	10-25 %
Endocardite bactérienne subaiguë	20-45 %
Pathologies sans manifestations articulaires	
Infections bactériennes	10-20 %
Infections virales (EBV surtout)	20-60 %
Infections parasitaires (leishmaniose, ...)	50-80 %
Cirrhose biliaire primitive	50-60 %

D'après Références 13,14,15,16,17,18,19.

En pathologie, ces facteurs rhumatoïdes polyclonaux sont observés au cours d'états infectieux d'origine virale, bactérienne ou parasitaire, leur détection étant en règle générale

transitoire, accompagnant la phase aiguë ou subaiguë de la pathologie et laissant imaginer que la production de ces facteurs rhumatoïdes est dépendante de la stimulation exoantigénique. Au cours des affections autoimmunes, et en particulier de la polyarthrite rhumatoïde, les facteurs rhumatoïdes persistent à des taux élevés dans le sérum et la commutation de chaînes lourdes n'est que partielle puisque la production de facteurs rhumatoïdes IgM est pérennisée au cours de la pathologie. Si le tableau I rappelle que la détection de facteurs rhumatoïdes sériques, y compris à taux élevé, n'est pas spécifique du diagnostic de polyarthrite rhumatoïde, l'utilité clinique de la détection de ces autoanticorps reste d'actualité. Dans une étude récente, il apparaît que les tests d'agglutination sont, à l'usage, plus spécifiques qu'il n'y paraît dans une population de patients présentant des symptômes articulaires : à une dilution du 1/80, la spécificité du test au latex est chiffrée à 96,8 % (11). Dans une autre étude, la faible utilité de ces tests d'agglutination en pratique de médecine générale est réaffirmée en raison d'une valeur prédictive positive faible. En revanche, l'utilité de la recherche des facteurs rhumatoïdes sériques paraît ici plus grande quand le résultat est négatif (12). En tout état de cause il apparaît clairement que :

- a) l'utilisation de techniques très sensibles de détection, type ELISA, font perdre de la spécificité diagnostique. Tout au plus, peut-on être intéressé par la détection de FR de classe IgA en raison d'une information pronostique qui n'est pas entièrement acquise ;
- b) les résultats de la recherche de FR ne peuvent en aucun cas être détachés de la clinique et des circonstances pathologiques qui ont motivé sa recherche.

■ V. RÔLE PATHOGÉNIQUE

L'approche du rôle pathogénique des facteurs rhumatoïdes a surtout été réalisée au cours de la polyarthrite rhumatoïde. Cette approche peut être décomposée en deux aspects : clinico-biologique d'une part et articulaire d'autre part.

En ce qui concerne l'approche clinico-biologique, celle-ci est déjà ancienne et permet d'objectiver une corrélation globale modeste entre le taux de facteurs rhumatoïdes sériques et l'importance des destructions articulaires évaluées radiologiquement, de sorte que plus la polyarthrite est séropositive, plus elle est destructrice. À l'autre extrémité de cette étude de corrélation figurent bien entendu les formes séronégatives qui sont habituellement moins agressives sur le plan articulaire.

En ce qui concerne l'approche articulaire de la synthèse de facteurs rhumatoïdes, différents travaux ont pu confirmer le lieu de synthèse privilégié intra-articulaire et synovial de facteurs rhumatoïdes au cours de la polyarthrite rhumatoïde. Un certain nombre de constatations permet d'imaginer un rôle pathogène de ces facteurs rhumatoïdes synthétisés dans l'articulation. Tout d'abord les facteurs rhumatoïdes de classe IgG, IgA et IgM participent à la composition des complexes immuns synoviaux qui sont capables de fixer le complément, en particulier quand le nombre de molécules intéressées devient supérieur à 3 ou 4. Les IgG agrégées sont en effet capables d'exposer un certain nombre d'épitopes répétitifs susceptibles de fixer les facteurs rhumatoïdes de classe IgM provoquant ainsi la formation de complexes stables fixant le complément. Il est en effet admis que le liquide synovial des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde est caractérisé par un taux de complément très

bas (à l'inverse du sérum) et par des agrégats d'immunoglobulines de très haut poids moléculaire. Certaines propriétés intrinsèques des molécules de facteurs rhumatoïdes concourent à la constitution de ces complexes. Ainsi, malgré une affinité moyenne faible pour leur antigène (10 fois plus faible que l'affinité d'un anticorps obtenu après immunisation contre un exo-antigène), les facteurs rhumatoïdes de classe IgG et IgM peuvent s'auto-agrégier pour former ces structures stables participant aux phénomènes inflammatoires. Les concentrations élevées de ces complexes immuns dans le liquide synovial par opposition aux concentrations sériques, expliquent vraisemblablement la limitation des dommages à la cavité articulaire. Dans de rares situations pathologiques où les taux sériques des facteurs rhumatoïdes sont susceptibles de s'élever fortement (purpura hypergammaglobulinémique de Waldenström, vascularite au cours des polyarthrites rhumatoïdes fortement séropositives), les taux sériques de facteurs rhumatoïdes s'élèvent fortement et des complexes stables circulants de facteurs rhumatoïdes et d'IgG sont susceptibles de provoquer les phénomènes de vascularité.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- PASQUALI J.L., AZERAD G., MARTIN T., MULLER S., The double reactivity of a human monoclonal rheumatoid factor to IgG and histones is related to distinct binding SITES. *Eur. J. Immuno.* 1998 ;18 :1127-30.
- 2- WILLIAMS R.C., MALONE C.C., HARLEM J.B., Rheumatoid factors from patients with rheumatoid arthritis react with tryptophan 60 and 95, lysine 58, and arginine 97, on human beta-2-microglobulin. *Arthritis Rheum.*1993 ; 36 : 916-26.
- 3- CORPER A.L., SOHI M.K., BONAGURA V.R., STEINITZ M., JEFFERIS R., FEINSTEIN A., BEALE D., TAUSSIG M.J., SUTTON B.J., Structure of human IgM rheumatoid factor Fab bound to its autoantigen IgG Fc reveals a novel topology of antibody-antigen interaction. *Nature Struct. Bio1.*1997 ; 4 : 374-81.
- 4- PREUD'HOMME J.L., DUARTE F., AUCOUTURIER P., Isolation of monoclonal rheumatoid factors in hypergammaglobulinemic purpura. *Diagn. Immunol.*1984 ; 2 : 219-23.
- 5- FEHR T., BACHMANN M.F., BUCHER E., KALINKE U., DI PADOVA F.E., LANG A.B., HENGARTNER H., ZINKERNAGEL R.M., Role of repetitive antigen patterns for induction of antibodies against antibodies. *J. Exp. Med.* 1997 ;185 :1785-92.
- 6- HIROHATA S., TETSUFUMI I., MIYAMOTO T., Frequency analyses of human peripheral blood B cells producing IgM-rheumatoid factors. *J. Immunol.* 1990 ; 145 1681-6.
- 7- ROOSNEK E., LANZAVECCHIA A., Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factors B cells. *J. Exp. Med.* 1991 ;173 : 487- 9.
- 8- CARSON D.A., CHEN P.P., KIPPS T.J., New roles of rheumatoid factor. *J. Clin. Invest.* 1991 ; 87 : 379-83.
- 9- AGNELLO V., CHUNG R.T., KAPLAN L.M., A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* 1992 ; 327 :1490-5.
- 10- WALLER M., TOOBE E.C., VAUGHAN E., Study of rheumatoid factors in a normal population. *Arthritis Rheum.*1964 ; 7 : 513-20.

- 11- WOLFE F., CATHEY M.A., ROBERTS F.K., The latex test revisited. Rheumatoid factor testing in 8,287 rheumatic disease patients. *Arthritis Rheum.*1991; 34 : 951-60.
- 12- SHMERLING R.H., DELBANCO T.L., How useful is the rheumatoid factor ? An analyses of sensivity, specificity, and predictive value. *Arch. Intern. Med.* 1992 ; 152 2417-20.
- 13- CARSON D.A., Rheumatoid factor. In : KELLEY W.N., HARRIS E.D., RUDDY S., SLEDGE C.B., editors. *Texbook of Rheumatology*. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 1989 :198-207.
- 14- HARRIS E.D., Rheumatoid arthrites. Pathophysiology and implications for therapy. *N. Engl. J. Med.* 1990 ; 322 :1277-89.
- 15- ARNETT F.C., EDWORTHY S.M., BLOCH D.A., et al., The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthrites. *Arthritis Rheum.*1988 ; 31: 315-24.
- 16- BLOCH K.J., BUCHANAN W.W., WOHL M.J., BUNIM J.J., Sjögren's syndrome. A clinical, pathological, and serological study of sixty-two cases. *Medicine (Baltimore)* 1965 ; 44 : 87-231.
- 17- ROCCO V.K., HURD E.R., Scleroderma and scleroderma-like disorders. *Semin. Arthritis Rheum.*1986 ; 16 : 22-69.
- 18- TYMMS K.E., WEBB J., Dermatopolymyositis and other connective tissue diseases : a review of 105 cases. *J. Rheumatol.*1985 ; 12 :1140-8.
- 19- BARTFELD H., Incidence and significance of seropositive tests for rheumatoid factor in non-rheumatoid diseases. *Ann. Intern. Med.* 1960 ; 52 :1059-65.

LES ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES

Pierre YOUINOU, Alain SARAUX, Paul LE GOFF



I - INTRODUCTION

II - QUELLES SONT LES INDICATIONS DE LA RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-NUCLEAIRES ?

II.1. La situation du problème

II.2. La pratique médicale courante

II.3. Les indications de l'examen

III - COMMENT METTRE EN ÉVIDENCE LES ANTICORPS ANTI-NUCLEAIRES ?

III.1. Le dépistage des anticorps anti-nucléaires

III.2. La recherche des anticorps anti-nucléaires contre les antigènes nucléaires insolubles

III.3. L'analyse des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

IV - COMMENT ORIENTER LE DIAGNOSTIC

IV.1. Anticorps anti-ADN et anti-ARN

IV.2. Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

V - BIBLIOGRAPHIE

I. INTRODUCTION

Ce sont Malcom Hargraves et ses collaborateurs (1) qui ont ouvert la boîte de Pandore des anticorps anti-nucléaires (AAN). Il s'agit d'autoanticorps reconnaissant un ou plusieurs des constituants du noyau. Ceux-ci s'étant avérés aussi disparates qu'innombrables, les AAN correspondant le sont devenus par la force des choses. Saga inaugurée il y a 40 ans, le problème des AAN reste d'actualité puisque les auteurs s'interrogent encore sur leur signification (2). Sans doute n'avons-nous pas pris conscience de la sévérité des contraintes qu'imposait l'analyse de ces anomalies. Elles évoquent la présence d'une maladie autoimmune non spécifique d'organes, mais il y a belle lurette que le lupus érythémateux disséminé n'en a plus l'apanage (3)... depuis que le biologiste les retrouve dans le syndrome de Gougerot-Sjögren, la sclérodermie systémique, la polyarthrite rhumatoïde, la connectivite mixte, la dermato-polymyosite et dans bien d'autres affections qui ne sont pas toujours autoimmunes. On pressent que le vrai problème est devenu celui de l'identification de la cible des AAN et non plus celui de leur dépistage ; on devine également que cela n'est pas toujours possible. D'amont en aval, trois questions : quelles sont les indications de la recherche des AAN ? comment procéder pour les mettre en évidence ? et, à partir des résultats obtenus, de quelle manière orienter le diagnostic ?

II. QUELLES SONT LES INDICATIONS DE LA RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES ?

II.1- La situation du problème

C'est dans le contexte d'une maladie autoimmune non spécifique d'organes qu'est demandée la recherche des AAN (4-6), que leur dépistage s'effectue par immunofluorescence indirecte (IFI), ou, comme on l'a proposé récemment (7) par « enzyme-linked immunosorbent assays » (ELISA). Le résultat du test d'IFI est rendu sous la forme d'une dilution (ou d'unités internationales par ml, étant entendu qu'un « sérum étalon » de l'OMS en contient 100). Deux tendances s'affrontent. Ou bien le seuil de positivité est repoussé vers le bas, ce qui sensibilise le test mais en réduit la spécificité. Ou bien il est propulsé vers le haut, ce qui revient à sacrifier la sensibilité du test pour en améliorer la spécificité. Reste que les cliniciens préfèrent avantager la sensibilité par rapport à la spécificité, de manière

à ratisser le plus large possible. De cette manière, toutes les maladies autoimmunes sont associées à des AAN, même quand leur présentation clinique est incomplète ou atypique. Évidemment, ce parti pris impose que soit pris en compte le titre des AAN et que soit poursuivie l'analyse de la nature de ces autoanticorps ; bref, contraint le clinicien et le biologiste à communiquer entre eux.

Les individus susceptibles de produire des AAN peuvent être classés en trois catégories. Dans la première, les grandes maladies autoimmunes déjà citées, la découverte d'AAN constitue un argument diagnostique (3). Les situations les plus variées entrent dans la deuxième catégorie. Il ne s'agit plus de maladies systémiques, mais de cancers, de leucémies aiguës ou chroniques, d'hépatopathies, d'insuffisances rénales, d'infections diverses (à parvovirus B19 ou à virus d'Epstein-Barr). Même la grossesse peut être en cause. La troisième catégorie rassemble les sujets apparemment sains, quel que soit leur âge. Bien entendu, la proportion de sérums positifs est d'autant plus élevée que le seuil de significativité est plus bas (2). Elle n'augmente pas notablement jusqu'à 60 ans, mais est susceptible de le faire à un âge plus avancé.

II.2. - La pratique médicale courante

II.2.1- Le diagnostic

Dès que le clinicien soupçonne l'existence d'une maladie autoimmune, cet examen devient légitime. C'est néanmoins l'identification des antigènes reconnus par les AAN qui lui apportera le plus d'informations. Celles-ci ne seront interprétables qu'une fois réinsérées dans le contexte clinique et radiologique qui aura justifié l'examen : lupus, syndrome de Gougerot-Sjögren, polyarthrite rhumatoïde, dermato-polymyosite ou connectivite mixte.

La recherche des AAN peut avoir, au contraire, pour objet d'éliminer une maladie autoimmune (et non plus d'en confirmer la réalité). En l'occurrence, le praticien relève des symptômes susceptibles d'apparaître à l'occasion d'une maladie autoimmune, mais également d'accompagner le cours d'une affection inflammatoire mais non autoimmune (le dilemme entre polyarthrite rhumatoïde débutante et pelvispondylite rhumatismale avec atteintes périphériques illustre ce type de situation). S'il n'y a pas d'AAN, il est déraisonnable de retenir le diagnostic de maladie autoimmune, bien que cette situation s'observe dans environ 1 % des cas de lupus.

II.2.2 - Le pronostic

Généralement il est impossible de poser un diagnostic de maladie autoimmune quand les symptômes semblent bénins ou quand leur nombre reste limité. C'est le cas du syndrome de Raynaud pour lequel force est d'émettre un pronostic. Les examens biologiques sont nécessaires, en particulier la recherche des AAN (8)... nécessaires au médecin qui suit ce malade, guettant l'apparition de la forme CREST (Calcinose sous-cutanée, syndrome de Raynaud, dysfonctionnement de l'Œsophage, Sclérodactylie et Télangiectasies) d'une sclérodermie systémique par exemple.

Il est parfois utile de répéter les dosages d'AAN, que ceux-ci aient été dépistés ou pas dès le premier examen. Le meilleur exemple est celui du lupus induit par un médicament (9),

où l'amélioration parallèle des symptômes cliniques et des anomalies biologiques permet d'imputer la maladie au médicament dont on aura préalablement interrompu la prescription.

II.2.3 - Le classement d'un état pathologique

La présence des AAN figure parmi les critères utilisés pour classer lupus (10) et syndrome de Gougerot-Sjögren (11). À l'inverse, leur absence constitue l'un des critères exigés pour poser le diagnostic de la maladie de Still de l'adulte (12). Aussi, la recherche d'AAN est-elle indispensable à qui veut s'assurer que son patient répond bien aux critères de classification de la maladie qu'il se propose d'étudier, par exemple dans le cadre d'un projet de recherche clinique.

II.3. - Les indications de l'examen

Sur le plan pratique, ce sont la recherche de la cause d'un symptôme isolé et l'étude étiologique d'un syndrome constitué qui justifient les demandes de dépistage d'AAN. L'extrême variété des situations auxquelles le clinicien est confronté nous amène à passer en revue plusieurs organes. Chacun d'entre eux peut présenter des manifestations particulières ; elles peuvent même s'associer de façon insolite, toutes situations orientant vers une maladie autoimmune, invitant de ce fait à vérifier s'il existe des AAN.

II.3.1- La peau

Les manifestations dermatologiques font partie des signes principaux de nombreuses maladies autoimmunes : l'éruption malaire en aile de papillon du lupus, les lésions cutanées de lupus discoïde, et la photosensibilité sont des signes classiques, au point qu'ils constituent 3 des 11 critères de classification du lupus (10). Une alopécie peut aussi apparaître sur ce terrain. Une sclérodactylie, des télangiectases, et une sclérodémie proximale peuvent inaugurer l'évolution d'une sclérodémie systémique. Les doigts boudinés évoquent une connectivite mixte.

II.3.2 - Les muqueuses

Des ulcérations buccales sont possibles au cours du lupus. Une hypertrophie des parotides et un syndrome sec subjectif ou objectif peuvent dénoncer un syndrome de Gougerot-Sjögren, qu'il soit primitif ou secondaire.

II.3.3 - Les articulations

Polyarthralgies ou arthrites alertent le patient dans la grande majorité des maladies systémiques et plus particulièrement le lupus, le syndrome de Gougerot-Sjögren et la polyarthrite rhumatoïde.

II.3.4 - Le système cardio-vasculaire

La péricardite est classique au cours du lupus. Le syndrome de Raynaud fait partie des manifestations habituelles du lupus, du syndrome de Gougerot-Sjögren, de la dermato-polymyosite et de la polyarthrite rhumatoïde. Phlébites et thromboses font partie du

tableau du syndrome des antiphospholipides. Cette suspicion impose la recherche d'un lupus auquel il peut être associé.

II.3.5 - Le système respiratoire

Pleurésie ou fibrose pulmonaire peuvent être observées dans de nombreuses maladies systémiques et tout particulièrement dans le lupus et la sclérodermie systémique.

II.3.6 - Les nerfs et les muscles

Des convulsions, voire une psychose, peuvent traduire l'existence d'un lupus. Des douleurs musculaires ou une faiblesse musculaire font partie du tableau caricatural de la dermatomyosite.

II.3.7 - Le système digestif

Une hépatopathie ou une splénomégalie peuvent augurer d'une maladie autoimmune, quelle qu'elle soit.

II.3.8 - Les reins

Protéinurie et présence de cylindre urinaire peuvent également permettre la découverte d'un lupus.

II.3.9 - Les signes obstétricaux

Les fausses couches répétées font partie du tableau de syndrome des anticorps anti-phospholipides primitif ou associé au lupus.

II.3.10 - Le sang

De nombreuses manifestations hématologiques (leucopénie, lymphopénie, thrombopénie, anémie inflammatoire ou hémolytique, augmentation du temps de céphaline, cryoglobulinémie) doivent faire évoquer le diagnostic de lupus et, partant, faire rechercher la présence d'AAN.

■ III. COMMENT METTRE EN ÉVIDENCE LES ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES ?

III.1- Le dépistage des anticorps anti-nucléaires

Tout examen commence par un dépistage en IFI sur cellules HEp-2 (tableau I). Le résultat est couramment considéré comme positif à partir du 1/80 (encore faut-il tenir compte de l'âge du malade : la découverte d'AAN au 1/80 chez une jeune femme de 23 ans impose de surveiller étroitement cette candidate au LED, alors que le même résultat n'a pas beaucoup de signification chez un vieillard de 84 ans !).

Tableau I - Conduite pratique à la recherche d'anticorps anti-nucléaires

EXAMENS SYSTÉMATIQUES

I - Dépistage par immunofluorescence indirecte (IFI)

II - Identification de l'anticorps

1) Anticorps anti-antigènes nucléaires insolubles

a) ADN natif

. test de Farr

. IFI sur *Crithidia luciliae*

. ELISA

b) Histones

2) Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

a) Sm

b) RNP

c) Ro(SS-A)

d) La(SS-B)

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

EXAMENS EN CAS D'ORIENTATION

I - Anticorps anti-cardiolipines (ELISA)

II - Anticorps anti-centromères (IFI)

III - Certains anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

1) Jo-1

2) Sc170

Traditionnellement on décrit quatre aspects : homogène, moucheté, homogène à renforcement périphérique et nucléolaire. Chacun d'entre eux dénonce un AAN particulier. L'aspect homogène serait dû à des anticorps anti-ADN natif et/ou anti-histones, mais il en est bien d'autres (dont la cible ne figure pas dans cet inventaire) qui, eux aussi, donnent un aspect homogène en IFI. Si l'image est mouchetée, on pense plutôt à des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles, mais aussi à des anticorps anti-centromères. Si elle est nucléolaire, il s'agit d'anticorps anti-ribonucléoprotéines (RNP) nucléolaires, notamment les U3RNP. Si elle est homogène à renforcement périphérique (ce qui est exceptionnel), les AAN sont classiquement considérés comme étant dirigés contre l'ADN natif.

Le moins que l'on puisse dire est que ces paradigmes n'ont rien d'absolu. La coexistence de deux AAN provoque la surimpression de deux images. Au fil des dilutions, la seconde ne se démasque que si le titre de l'anticorps donnant un aspect moucheté est plus fort que celui de l'anticorps donnant un aspect homogène. De plus, on distingue plusieurs types de mouchetures : le type M1 correspond aux anticorps anti-centromères, le type 2 aux anticorps anti-antigènes nucléaires solubles, le type 3 aux AAN de la cirrhose biliaire primaire (l'appellation d'image « en dots » a, semble-t-il, été consacrée par l'usage), le type 4 aux pseudo-anticorps anti-centromères et à certains anticorps dirigés contre les histones de classe H3. Enfin, se pose le problème des anticorps qualifiés d'AAN mais dont la cible se trouve, non pas dans le noyau, mais dans le cytoplasme de la cellule.

Deux cent soixante-dix-neuf des 1000 derniers sérums testés dans le laboratoire étaient positifs au dépistage (28 %). Ces AAN affichaient 210 fois un aspect homogène (75 % des

positifs), 50 fois un aspect moucheté (18 %), 15 fois un aspect homogène et moucheté (5 %), deux fois un aspect homogène et nucléolaire (1 %), une fois un aspect nucléolaire (0,5 %) et une fois un aspect homogène à renforcement périphérique (0,5 %). Nous n'avons évidemment pas découvert 279 cas de LED ! ... Ce diagnostic, les cliniciens ne l'ont posé que chez 11 malades, c'est-à-dire dans 4 % des cas.

Le biologiste n'est pas au bout de ses peines : le résultat peut être faussement négatif. Certains AAN, spécifiques du noyau des polynucléaires neutrophiles, ne reconnaissent pas celui des cellules épithéliales que sont les cellules HEp-2. D'autres échappent quand on les teste au 1/80 (phénomène de zone, qui est mal compris). Plus rarement, il s'agit d'AAN de classe IgG, alors que le réactif reconnaît surtout des IgM ; ou d'AAN agissant à froid, alors que l'examen est pratiqué à la température du laboratoire. Autre cause d'erreur, les anticorps anti-antigènes nucléaires solubles : ils sont quelquefois tellement solubles qu'ils se dissolvent dans le tampon utilisé au moment du dépistage. Enfin certains anticorps décelés sur coupe de foie de rat, examen maintenant hors nomenclature, ne le sont pas sur HEp-2 (et inversement).

III.2 - La recherche des anticorps anti-nucléaires contre les antigènes nucléaires insolubles

III.2.1 - Les anticorps anti-ADN

Il en est de trois sortes : ceux qui se fixent uniquement sur l'ADN natif ou bicaténaire, ceux qui ne se lient qu'à l'ADN dénaturé ou monocaténaire, et ceux qui reconnaissent aussi bien l'ADN bicaténaire que l'ADN monocaténaire. L'appellation « anticorps anti-ADN natif » s'applique aux anticorps du premier groupe, mais également à ceux du troisième. La nuance est importante, puisque ceux du deuxième groupe, les « anticorps anti-ADN dénaturé » n'ont rigoureusement aucun intérêt diagnostique.

Plusieurs techniques permettent de détecter les anticorps anti-ADN natif. Le test de Farr n'est qu'un cas particulier d'examen réalisé en phase liquide. D'autres méthodes se pratiquent en phase solide. Le substrat en IFI peut être un parasite, le *Crithidia luciliae*. Il s'agit d'un protozoaire doté d'une mitochondrie géante, ou kinétoplaste, qui renferme de l'ADN natif mais également des histones. Plusieurs ELISA sont maintenant disponibles. Les résultats diffèrent d'une technique à l'autre (tableau II). Quand on combine les données de la littérature, ces disparités éclatent... dues notamment à la contamination de l'ADN natif du Farr par de l'ADN dénaturé, ou à la présence des histones dans les mitochondries des protozoaires. L'ELISA est l'examen le plus sensible, puisque capable de dépister les anti-ADN natif de faible affinité (ceux qui ne s'accrochent ni à l'antigène du test de Farr, ni à celui des kinétoplastes). Ceci est aussi un inconvénient, d'où l'importance de la connaissance de la concentration des anticorps et de leurs isotypes (13) : des anticorps de la classe IgM seulement et de faible titre s'observent dans de nombreuses conditions, alors que des anticorps de classe IgG ou de plusieurs classes et de titre élevé ont la même signification qu'un test de Farr bien fait fortement positif, fortement en faveur du diagnostic de lupus bien que de tels anticorps s'observent dans de rares cas d'autres maladies autoimmunes (polyarthrite rhumatoïde, myasthénie, hépatite auto-immune, etc...). On peut également noter que la plupart des coffrets commerciaux ELISA ne comportent pas

de puits contrôles non sensibilisés par l'antigène et ne détectent donc pas les sérums dont les immunoglobulines se lient directement au plastique (faux positifs qui ne sont pas exceptionnels).

Tableau II - Discordances entre les résultats obtenus par le test de Farr et par la technique d'immunofluorescence indirecte dans 1326 sérums étudiés à la recherche d'un lupus érythémateux disséminé

Test de Farr	<i>Crithidia luciliae</i>	Nombre	Pourcentage
+	+	321	24,2
+	-	136	10,3
-	+	71	5,3
-	-	798	60,2
		Total 1326	

III.2.2 - Les anticorps anti-histones

Les histones forment un groupe hétérogène de protéines se fixant à l'ADN pour constituer des désoxyribonucléoprotéines. Ces AAN particuliers ne sont plus identifiés par IFI, mais par ELISA. Les cinq classes, H1, H2A, H2B, H3 et H4, y sont regroupées puisque le recours à des ELISA spécifiques de chacune d'entre elles a fait long feu. Comme pour les anticorps anti-ADN dénaturés, la recherche des anticorps anti-histones a peu d'intérêt pratique. La présence d'anticorps anti-histones ou anti-ADN dénaturé à titre élevé contrastant avec l'absence ou un titre faible d'anticorps anti-ADN natif est un argument (faible) en faveur du diagnostic de lupus médicamenteux.

III.2.3 - Les anticorps anti-nucléosomes

L'existence d'anticorps ne reconnaissant ADN natif et histones qu'associés dans les nucléosomes a été rapportée chez l'homme. Le test est réalisé à l'aide de nucléosomes purifiés ou reconstitués. Il peut être avantageux, car on s'est aperçu que trois sérums lupiques sur 40 contenaient des anticorps anti-nucléosomes, mais n'avaient ni anticorps anti-ADN natif, ni anticorps anti-histones (14). Cette observation est intéressante à deux titres au moins l'autoanticorps est celui qui produisait les cellules décrites par Hargraves et des nucléosomes libres circulent dans le sérum des malades.

III.3 - L'analyse des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

Le dépistage se faisait initialement par hémagglutination ou par immunodiffusion et l'identification par traitement enzymatique des antigènes. Les Ro(SS-A) et La(SS-B) étaient sensibles à la trypsine, mais pas à la RNase, les ribonucléoprotéines (RNP) étaient sensibles et les Sm résistants aux deux enzymes.

Le dépistage s'est fait ensuite par contre-immunoélectrophorèse ou électrosynérèse, et l'identification par confrontation à des sérums de référence par la technique d'Ouchterlony. Ces méthodes ont été conservées dans certains laboratoires.

On utilise actuellement l'immunotransfert, plutôt que la simple électrofocalisation, mais la tendance est de recourir à des « radio-immuno-assays » ou à des ELISA, en se servant d'antigènes purifiés ou obtenus par recombinaison génétique.

Quatre ELISA peuvent être réalisés en parallèle pour détecter anticorps anti-Sm, anti-U1 RNP, anti-Ro(SS-A) et anti-La(SS-B). Ils sont systématiques puisqu'il n'existe pas de test valable qui permette de vérifier en une seule fois la présence d'AAN dirigés contre un antigène soluble, quel qu'il soit.

■ IV. COMMENT ORIENTER LE DIAGNOSTIC ?

IV.1- Anticorps anti-ADN et anti-ARN

On peut estimer la fréquence moyenne des AAN au cours du lupus en faisant une sommation de tous les résultats disponibles dans la littérature (6). Ce qui aboutit à ce qu'ils soient détectés dans 90 à 100 % des cas. Dans 13 à 100 % des sérums lupiques, ils comprennent des anticorps contre l'ADN natif (1310 cas sur 1753 [74,7 %] par le test de Farr, 772 sur 1441 [50,1 %] par IFI sur *Crithidia luciliae* et 346 sur 444 [77,9 %] par ELISA). Des différences apparaissent quand on compare les résultats obtenus par deux techniques dans les mêmes sérums. Il existe, par exemple, des disparités entre Farr et IFI. Dans la combinaison Farr +/*Crithidia*-, il peut s'agir de faux positifs en Farr (seuls se fixent les anticorps les plus « affins », en raison de la présence du sulfate d'ammonium) ou de faux négatifs sur *Crithidia* (la sensibilité de ce test s'avère insuffisante). L'isotype de l'anticorps, son avidité pour l'autoantigène et son aptitude à fixer le complément sont autant d'informations qualitatives que l'on peut attendre des tests pratiqués en phase solide comme l'ELISA. Ce sont les anticorps anti-ADN de classe IgG, plutôt IgG₁ et IgG₃, qui caractérisent le lupus (13). Quant aux anticorps anti-ADN dénaturé, ils ne sont ni spécifiques du lupus, ni détectables par IFI s'ils sont isolés. Les anticorps anti-ARN monocaténaire sont plus utiles au clinicien que ces derniers. Au reste, il est exceptionnel que la fluorescence soit exclusivement nucléolaire puisque certains auteurs (15) ne l'ont observée que dans deux sérums sur 271. Le pourcentage d'AAN donnant ce type d'image est de 8 % dans lupus. Plusieurs techniques permettent de mettre en évidence une activité antiribosomes.

IV.2 - Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

Le premier anticorps anti-antigènes nucléaires solubles, baptisé anti-Sm (d'après les deux premières lettres du nom du premier malade) apparaît surtout quand la fluorescence est mouchetée. Bien entendu, les résultats varient selon la technique choisie, mais sensibilité et spécificité atteignent de 34 à 88 % chez les lupiques américains (16), ce qui est considérable. La fréquence de cet anticorps est infiniment plus basse en Europe qu'aux États-Unis (5 à 10 % des cas). Le deuxième anticorps (appelé anticorps anti-RNP puisque l'antigène correspondant était initialement le seul à ressentir les effets de la RNase et de la trypsine) est présent dans le lupus, mais également dans la connectivite mixte. Il semble

que les anticorps anti-RNP soient dirigés plutôt contre les peptides A et C, mais également les peptides BB' et D au cours du lupus, et plutôt contre les peptides 68, A et C quand il s'agit d'une connectivite mixte. Au moins deux autres anticorps dirigés contre des antigènes nucléaires ou cytoplasmiques ont été décrits : l'anticorps anti-Ro(SS-A) et l'anticorps anti-La(SS-B). Le premier se voit dans certaines formes de lupus, mais surtout dans le syndrome de Gougerot-Sjögren, le second est assez spécifique du syndrome de Gougerot-Sjögren (6,17). Ce distinguo n'est évidemment qu'approximatif (18). Pour information, la moyenne des données recueillies dans la littérature figure sur le tableau III.

Tableau III - Pourcentages de sérums positifs pour les anticorps anti-antigènes nucléaires solubles au cours des connectivites

Autoanticorps	Affectations			
	LED	CM	SGS	PR
Anti-Sm	30	1	0	0
Anti-RNP	39	93	3	3
Anti-Ro(SS-A)	31	ND	46	ND
Anti-La(ss-B)	10	ND	40	ND

LED : lupus érythémateux disséminé ;
 CM : connectivite mixte ;
 SGS : syndrome de Gougerot-Sjögren ;
 PR : polyarthrite rhumatoïde ;
 ND : non déterminé.

D'autres anticorps contre les antigènes nucléaires solubles ont été décrits : l'anticorps anti-Me et surtout l'anticorps anti-« *Proliferating Cell NuclearAntigen* », ou PCNA, par exemple. Ce dernier est dirigé contre la cycline et détecté (19) dans 7 sérums lupiques sur 3 000. Il est exceptionnel mais spécifique.

Au total, certains AAN présentent un intérêt incontestable pour le diagnostic et pour le pronostic des maladies autoimmunes (tableau IV). Peut-être faut-il définir des combinaisons d'autoanticorps (20) pour améliorer les performances de ce bilan immunologique.

Tableau IV - Intérêt diagnostique de quelques anticorps anti-nucléaires en pratique médicale courante

Anticorps	Affections
Anti-ADN Natif	Lupus érythémateus disséminé
Anti-Sm	Lupus érythémateus disséminé
Anti-U1 RNP	Connectivite mixte
Anti-Scl 70	Sclérodémie diffuse
Anti-Centromères	Sclérodémie CREST*
Anti-Ro(SS-A)	Lupus érythémateus disséminé
Anti-Ro(SS-a) + anti-La(SS-B)	Syndrome de Gougerot-Sjögren

* Calcinoses sous-cutanées, syndrome de Raynaud, dysfonctionnement Œsophagien, Sclérodactylie et Télangiectasies

BIBLIOGRAPHIE

- 1- HARGRAVES M., RICHMOND M., MORTON R., Presentation of two bonemarrow elements : the « tart » cell or LE cell. Proc. Staff Meet. Mayo Clin. Proc.,1948 ; 23 : 25-8.
- 2- TAN E.M., FELTKAMP T.E.W., SMOLEN J.S., BUTCHER B., DAWKINS R., FRITZLER M.J., CORDON T., HARDIN J.A., KALDEN J.R., LAHITA R.G., MAINI R.N., MCDUGAL J.S., ROTHFIELD N.F., SMEENK R.J., TAKASAKI Y., WIJK A., WILSON M.R., KOZIOL J.A., Range of antinuclear antibodies in « healthy » individuals. Arthrites Rheum.,1997 ; 40 : 1601-11.
- 3- YOUINOU P., AMOURA Z., Immunologie du lupus érythémateux disséminé. Rev.
- 4- HOLLINGSWORTH P.N., PURMER S.C., DAWKINS R.C., Antinuclear antibodies. In : Peter J.B., Shoenfeld Y. (eds), Autoantibodies, Amsterdam, Elsevier 1998, 74-90.
- 5- SHIEL W.C., JASON M., The diagnostic associations of patients with antinuclear antibodies referred to a community rheumatologist. J. Rheumatol.,1989,16, 782-5.
- 6- YOUINOU P., LE GOFF P., SARAUX A., Pratique et interprétation des examens biologiques dans les maladies systémiques. In : Kahn M.F., Peltier A.P., Meyer O., Piette J.C. (eds). Les maladies systémiques, Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 4e édition 1999, sous presse.
- 7- EMLLEN W., O'NEILL L., Clinical significance of antinuclear antibodies. Comparison of detection with immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. Arthrites Rheum.,1997 ; 40 :1412-8.
- 8- SPENCER-GREEN G., Outcomes in primary Raynaud phenomenon: Arch. Intern. Med.,1998 ;158 : 595-600.
- 9- LE GOFF P., SARAUX A., Les lupus induits. Rev. Rhum.,1999, sous presse.
- 10- TAN E.M., COHEN A.S., FRIES J.F., MASI A.T., MCSHANE D.J., ROTHFIELD N.F., SHCALLER J.G., TALAL N., WINCHESTER R.J., The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthrites. Rheum,1982 ; 25,1271-7.
- 11- VITALI C., BOMBARDIERI S., MOUTSOPOULOS H.M., BALESTRIERI G., BENCIVELLI W., BERNSTEIN R.M., BJERRUM K.B., BRAGA S., COLL J., DE VITA S., DROSOS A.A., EBRENFELD M., HATRON P.Y., HAY E.M., ISENBERG D.A., JANIN A., KALDEN J.F., KATER L., KONTTINEN Y.T., MADDISON P.J., MAINI R.N., MANTHORPE R., MEYER O., OSTUNI P., PENNEC Y., PRAUSE J.U., RICHARD A., SAUVEZIE B., SCHIADT M., SCIUTTO M., SCULLY C., SHOENFELD Y., SKOPOULI F.N., SMOLEN J.S., SNAITH M.L., THISLER M., TODESCO S., VALESINI G., VENABLES P.J.W., WATTIAUX M.J., YOUINOU P., Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome : results of a prospective concerted action supported by the European Community. Arthrites Rheum.,1993 ; 36 : 340-7.
- 12- YAMAGUSHI M., OHTA A., TSUNEMATU T., Preliminary criteria of classification of adult Still's disease. J. Rheumatol.,1992 ;19 : 424-30.

- 13- PREUD'HOMME J.L., ROCHARD E., GODET D., Isotypic distribution of ante-double stranded DNA antibodies : a diagnostic evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay. *Diagn. Clin. Immunol.*,1998 ; 5 : 256-61.
- 14- CHABRE H., AMOURA Z., PIETTE J.C., GODEAU P., BACK J.F., KOUTOUZOV S., Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthrites Rheum.*,1995 ; 38 :1485-91.
- 15- PFEIFLE J., ANDERER F.A., FRANKE M., Characterization of nucleolar proteins as autoantigens using human autoimmune sera. *Ann. Rheum. Dis.*,1986 ; 45 : 978-86.
- 16- SANCHEZ-GUERRERO J., LEW R.A., FOSSEL A.H., SCHUR P.H., Utility of ante-Sm, ante-RNP, ante-Ro/SS-A and ante-La/SS-B (extractable nuclear antigens) detected by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnoses of systemic lupus erythematosus. *Arthrites Rheum.*,1996 ;1055-61.
- 17- YOUINO P., ADLER Y., MULLER S., LAMOUR A., BARON D., HUMBEL R.L., Anti-Ro(SS-A) and ante-La(SS-B) antibodies in autoimmune rheumatic diseases. *Clin. Rev. Allergy*,1994 ;12 : 253-74.
- 18- TAN E.M., CHAN E.K.L., SULLIVAN K.F., RABIN R.L., Antinuclear antibodies diagnostically specific immune markers and clues towards the understanding of systemic autoimmunity. *Clin. Immunol. Immunopathol.*,1988 ; 47 : 121-41.
- 19- FRITZLER M.J., MCCARTHY G.A., RYAN J.P., KINSELLA T.D., Clinical features of patients with antibodies against PCNA. *Arthrites Rheum.*,1983 ; 26 : 140-5.
- 20- JUBY A., JOHNSTON C., DAVIS P., Specificity, sensitivity and diagnostic predictive value of selected laboratory generated autoantibody profiles in patients with connective tissue diseases. *J. Rheumatol.*,1991;18 : 354-8.

LES ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES : MÉTHODES DE DÉTECTION ET INTERPRÉTATION

Lucile MUSSET

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

I - GÉNÉRALITÉS

II - STRUCTURES NUCLÉAIRES ET PRINCIPALES CIBLES RECONNUES

II.1. La membrane nucléaire

II.2. Les constituants de la chromatine

II.3. Les constituants du nucléole

II.4. Les ribonucléoprotéines

III - DÉPISTAGE ET IDENTIFICATION DES ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES

III.1. Dépistage des anticorps anti-nucléaires :

III.1.1. Immunofluorescence indirecte sur culture de cellules ou coupe d'organe

III.1.2. Autres techniques de dépistage des anticorps anti-nucléaires

III.2. Identification des anticorps anti-nucléaires

III.2.1. Anticorps anti-ADN

III.2.1.1. Test de Farr

III.2.1.2. Immunofluorescence indirecte sur *Crithidia luciliae*

III.2.1.3. Tests ELISA

III.2.1.4. Immunodot

III.2.2. Anticorps anti-histones et anti-nucléosomes

III.2.2.1. Anticorps anti-histones

III.2.2.2. Anticorps anti-nucléosomes

III.2.3. Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

III.2.3.1. Immunodiffusion double d'Ouchterlony

III.2.3.2. Contre-immunoelectrophorèse ou électrosynérèse

III.2.3.3. Technique ELISA

III.2.3.4. Immunodot

III.2.3.5. Immunotransfert

III.2.4. Anticorps anti-protéines de la membrane nucléaire

IV - CONCLUSION

V - BIBLIOGRAPHIE

LES ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES MÉTHODES DE DÉTECTION ET INTERPRÉTATION

■ I. GÉNÉRALITÉS

Les anticorps anti-nucléaires (AAN) sont des autoanticorps dirigés contre des déterminants antigéniques du noyau des cellules de l'organisme. Ces anticorps sont principalement recherchés au cours de maladies autoimmunes non spécifiques d'organes ou encore appelées connectivites (lupus érythémateux disséminé [LED], polyarthrite rhumatoïde, syndrome de Gougerot-Sjögren polymyosite, sclérodermie...).

Historiquement, le premier « marqueur » sérologique utilisé pour le diagnostic de LED a été la recherche de cellules LE, phénomène décrit par Hargraves et coll. en 1948 (1). En 1957, Friou (2) a introduit la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) pour la détection des AAN et en 1959, plusieurs études ont montré la réactivité du sérum de patients lupiques avec de l'ADN purifié (3).

La recherche d'AAN par IFI sur coupe de tissus animal (foie de rat par exemple), et plus récemment sur culture de cellules humaines (cellules HEP-2) a permis de mettre en évidence des aspects de fluorescence très différents non seulement chez les patients atteints de LED, mais aussi chez les patients atteints d'autres connectivites. Ces différents aspects de fluorescence sont en fait le reflet de la grande hétérogénéité des autoanticorps produits au cours de ces maladies autoimmunes. L'emploi de ces substrats a également montré que les sérums de patients lupiques avaient parfois des autoanticorps dirigés contre d'autres cibles antigéniques, situées dans le cytoplasme des cellules.

Peu à peu, les méthodes d'étude des AAN ont évolué permettant une meilleure connaissance de leur valeur diagnostique pour une spécificité antigénique donnée. À titre d'exemples, les anticorps anti-ADN à titre élevé et les anticorps anti-Sm sont des marqueurs **presque** spécifiques du LED, comme les anticorps anti-topoisomérase I (Scl 70) pour la sclérodermie.

L'aide diagnostique apportée par la biologie dans le cadre d'une symptomatologie extrêmement polymorphe est précieuse. La gravité du diagnostic clinique porté (souvent chez des sujets jeunes) et les conséquences thérapeutiques qui en découlent justifient une parfaite maîtrise des techniques utilisées ainsi qu'une parfaite connaissance dans l'interprétation des résultats.

Ce chapitre précisera tout d'abord les différentes structures nucléaires pouvant être la cible d'autoanticorps, puis les différentes méthodologies utilisables pour leur détection ainsi que les principaux facteurs pouvant influencer les résultats.

■ II. STRUCTURES NUCLÉAIRES ET PRINCIPALES CIBLES RECONNUES

Les différentes cibles antigéniques peuvent être regroupées en quatre catégories principales : la membrane nucléaire, les constituants de la chromatine, les constituants du nucléole, les ribonucléoprotéines (4).

II.1- La membrane nucléaire

La membrane nucléaire est constituée de deux feuillettes lipidiques, le **feuillet externe** et le **feuillet interne** (figure 1). Le feuillet externe est en continuité avec le réticulum endoplasmique rugueux. Le feuillet interne est tapissé de diverses protéines. Les protéines majoritaires sont les **lamines** dont il existe trois types (A, B, et C) (figure 2) (5).

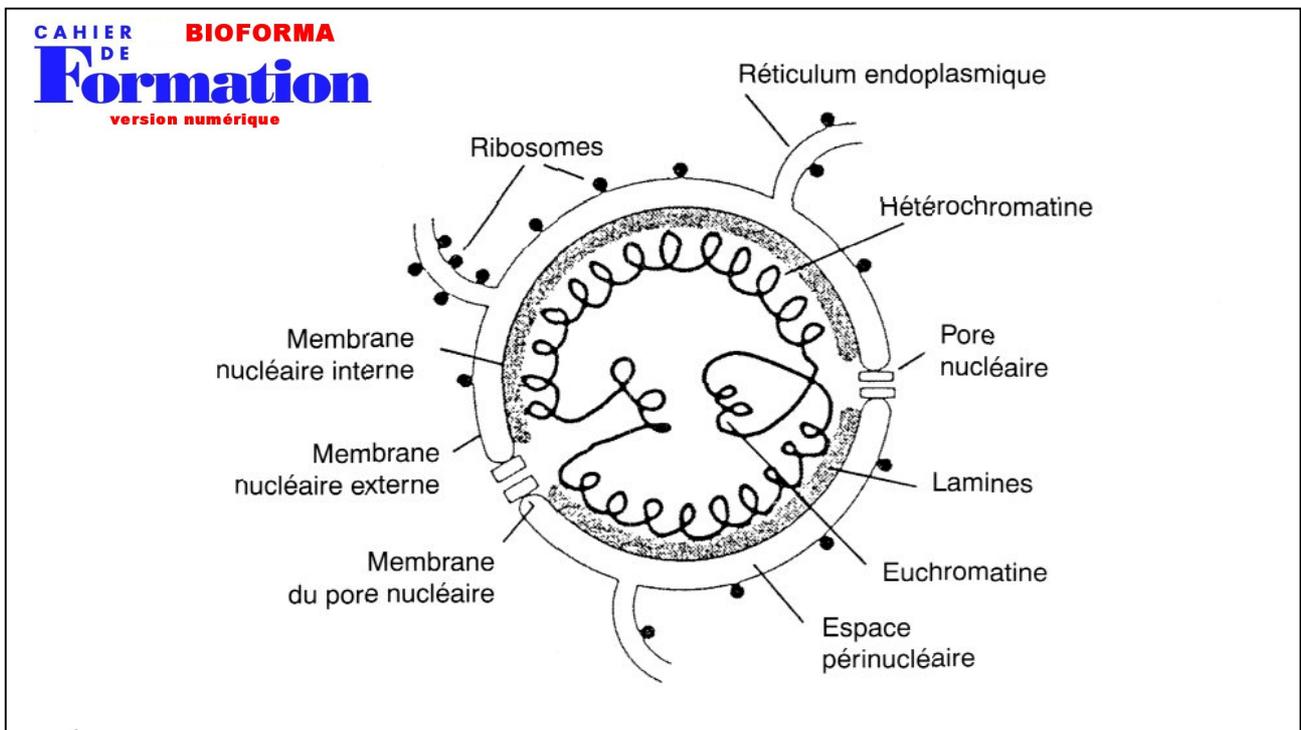


Figure 1 : Représentation schématique de la membrane nucléaire et de ses pores (d'après Worman & Courvalin (5)).

Par endroits, les deux feuillettes s'unissent délimitant ainsi les pores nucléaires. Ces **pores nucléaires**, qui assurent la continuité entre le nucléoplasme et le cytoplasme, sont recouverts de glycoprotéines telles que la **gp 210** (protéine de 210 kDa).

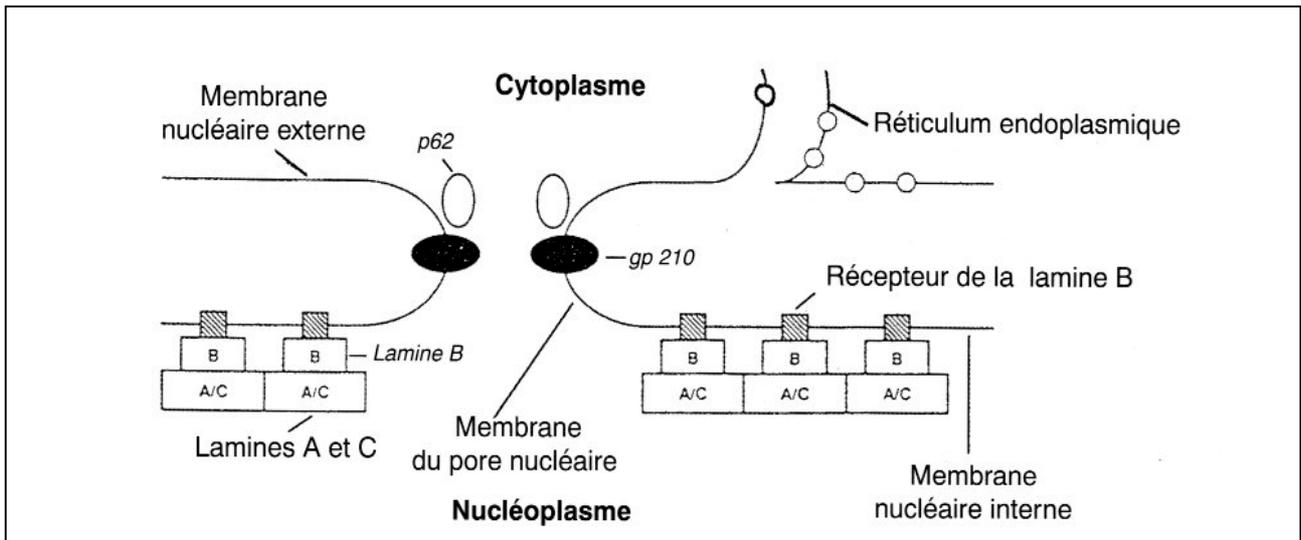


Figure 2 : Principales protéines de la membrane nucléaire et de ses pores (d'après Worman & Courvalin (S)).

La membrane nucléaire se modifie au cours de la mitose. En pro-métaphase, elle se fragmente en petites vésicules dont certaines contiennent les protéines des pores nucléaires. Les différentes lamines sont également modifiées par phosphorylation. À la télophase, la membrane nucléaire se reconstitue et réapparaît dans chacune des deux cellules filles (figure 3).

II.2- Les constituants de la chromatine

Dans le noyau, l'ADN est toujours associé à des protéines, parfois à des ARN, et l'ensemble est appelé **chromatine**. La chromatine baigne dans le nucléoplasme.

- Parmi les protéines de la chromatine, on distingue les **histones** (il en existe cinq appelées respectivement : H1, H2A, H2B, H3 et H4) et les protéines **non-histones**.

- Les histones sont les protéines majoritaires du noyau, de petite taille (11 à 28 kDa) et extrêmement basiques.

- Parmi les protéines non-histones, les **protéines HMG** (High Mobility Group) sont quantitativement les plus importantes dans le noyau. Plusieurs centaines d'autres protéines minoritaires (quelques copies par cellule) sont également présentes, telles que des enzymes, des protéines de structure, des protéines régulatrices de l'ADN.

CELLULE
MÈRE

PROPHASE

Réplication de l'ADN

MÉTAPHASE

Disparition de l'enveloppe
nucléaire

Centriole

Chromosomes en plaque
équatoriale

Fibres du fuseau mitotique

ANAPHASE

Séparation des chromosomes

TÉLOPHASE

Reconstitution
de l'enveloppe
nucléaire

CELLULES
FILLES

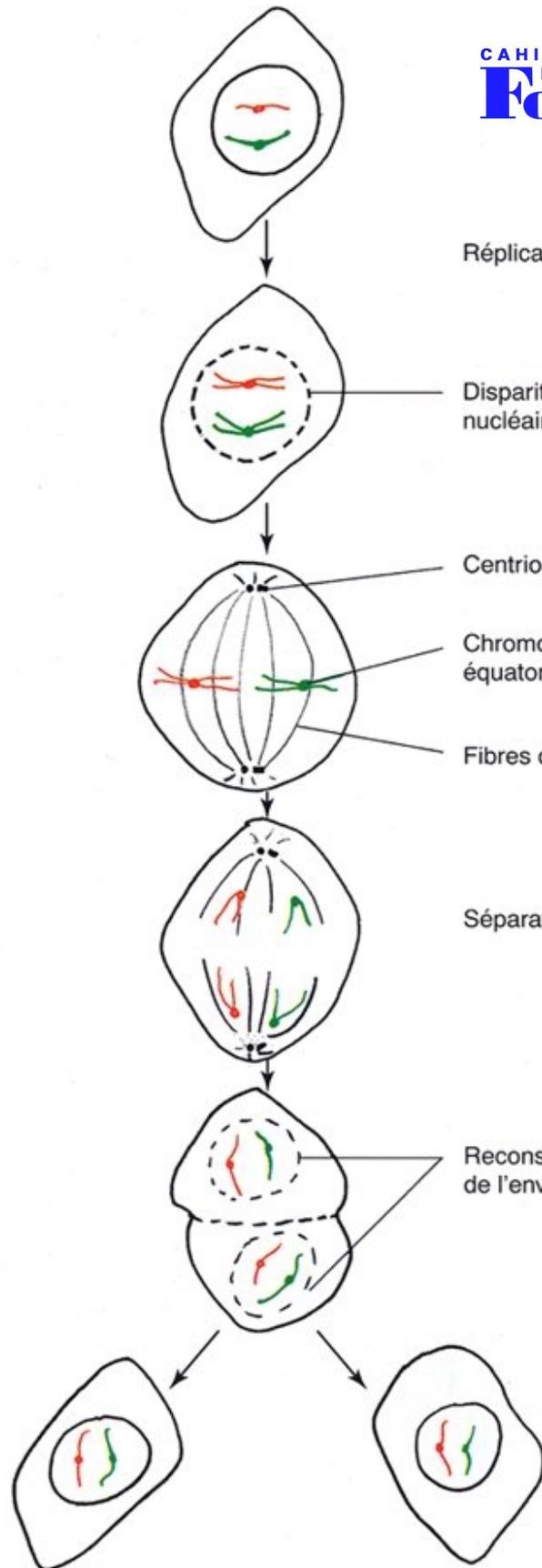


Figure 3 : Principales étapes du cycle cellulaire (mitose).

- La chromatine est constituée par la répétition d'une structure de base, le **nucléosome** et de protéines non-histones. Le nucléosome est constitué par de l'ADN d'une longueur d'environ 200 paires de bases, de 8 molécules d'histones (2 molécules de H2A, 2 de H2B, 2 de H3 et 2 de H4), et de quelques protéines non-histones (figure 4). Ces structures nucléosomiques sont reliées entre elles par de l'ADN double brin, encore appelé **ADN de liaison** formant ainsi une structure en chapelet. Cette structure en chapelet peut rester libre ou s'ordonner en une superstructure en forme de solénoïde, regroupant 6 nucléosomes stabilisés entre eux par une protéine, l'histone H1 se comportant un peu comme une agrafe, la finalité de cette organisation étant de compacter l'ADN. Il existe des **isoformes** de la double hélice d'ADN (**forme B** ou **Z** selon que l'enroulement de la double hélice est respectivement à droite ou à gauche).

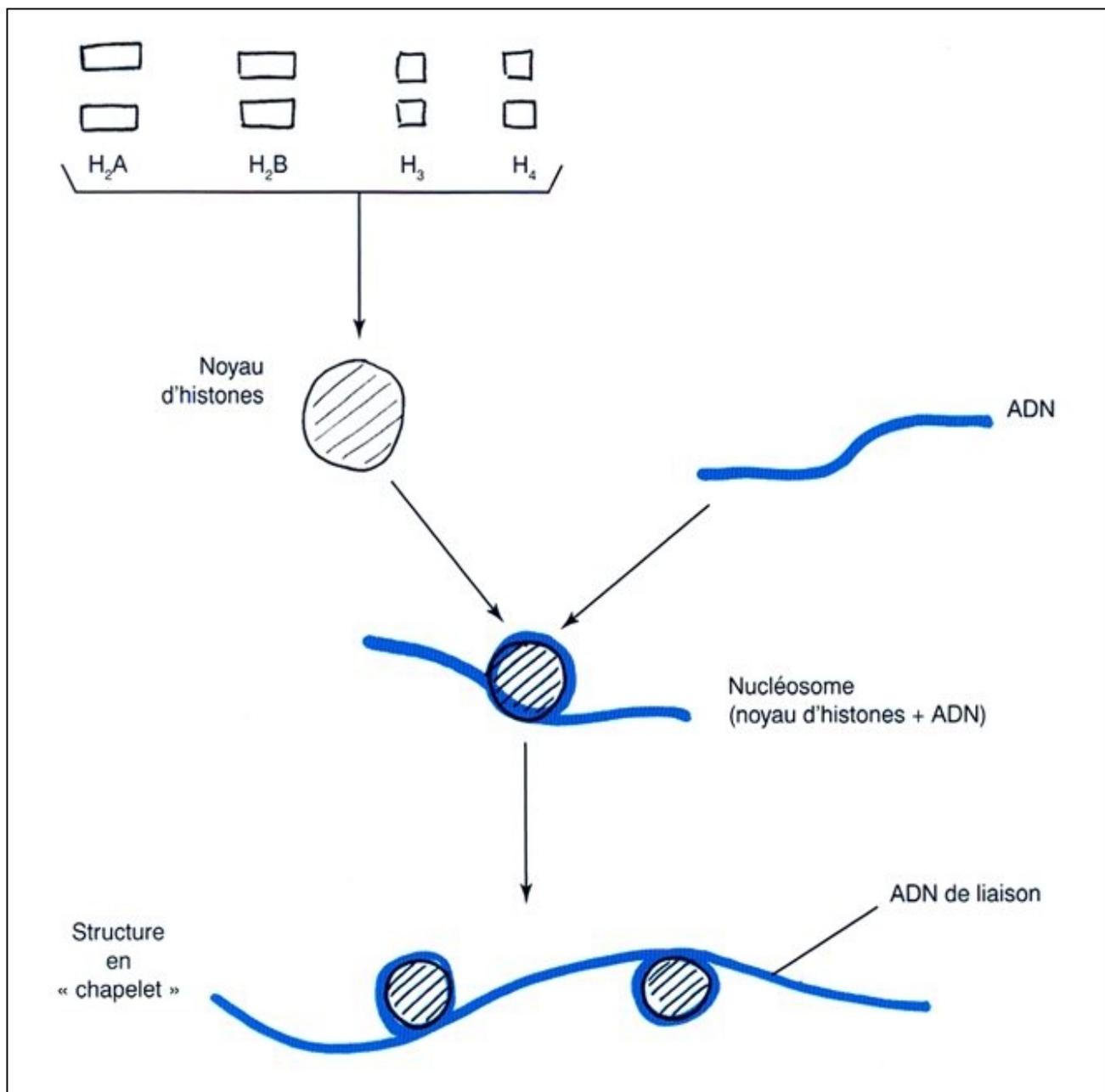


Figure 4 : Structure du nucléosome.

Le nucléosome associe une structure protéique (histones H2A, H2B, H3 et H4, chacun en deux exemplaires) et une longueur d'ADN double brin d'environ 200 paires de bases, enroulée autour du noyau d'histones.

L'organisation de la chromatine au sein du noyau se modifie au cours du cycle cellulaire. Certaines structures n'apparaissent qu'au cours de la mitose (protéines liées aux centromères des chromosomes, aux centrioles, aux microtubules ou aux fibres du fuseau mitotique, par exemple).

II.3- Les constituants du nucléole

Le nucléole est une structure intra-nucléaire riche en ARN. C'est à ce niveau que s'effectue la synthèse des ribosomes. On distingue une **zone granulaire** contenant des particules pré-ribosomales, et une **zone fibrillaire** contenant des ribonucléoprotéines.

II.4- Les ribonucléoprotéines

Les ribonucléoprotéines (RNP) correspondent à l'association d'ARN et de protéines. De l'ARN est présent dans le nucléoplasme, principalement au niveau des nucléoles, mais aussi dans le cytoplasme, en particulier au niveau des ribosomes (6).

- Des ARN de petite taille sont détectés dans le noyau et sont appelés *small nuclear ARN* (sn-ARN) :

Ces ARN sont riches en uracile et sont donc désignés par le préfixe U et numérotés de U1 à U20. Ces U-ARN ne sont pas antigéniques par eux-mêmes. Des protéines (appelées protéines A, B, B', C, D, E, F, G, peptide 68) sont associées à ces Sn-ARN (ou U-ARN) formant ainsi les sn-RNP (ou U-RNP) qui sont des structures antigéniques. Parmi ces sn-RNP, certains ont des protéines communes dans leur composition pouvant définir des **sites antigéniques**. C'est par exemple le cas du **site Sm** qui résulte de l'association des protéines B/B', D, E, F, G aux différents U-ARN. À l'inverse, d'autres protéines sont spécifiques d'un U-ARN particulier, par exemple, les protéine A, C, et le peptide de 68 kDa sont associés aux U1-ARN définissant l'antigène U1-RNP. Certains U-RNP sont localisés dans le nucléole et sont appelés **small nucleolar RNP** (sno-RNP) tel que l'U3-RNP par exemple.

- Des ARN de petite taille sont également détectés dans le cytoplasme et appelés *small cytoplasmic ARN* (scARN)

Ces ARN sont désignés par le préfixe hY (h = human et Y = cYtoplasmic) et numérotés de hY1 à hY5. Des protéines sont associées à ces sc-ARN définissant des particules antigéniques parmi lesquelles, les particules SS-A (protéines de 52 kDa et de 60kDa + sc-ARN) et SS-B (protéine de 47 kDa + sc-ARN) sont les plus connues.

D'autres sc-ARN sont issus du noyau comme les **ARN de transfert** (tARN). Des enzymes, les **synthétases** sont associées à ces tARN, l'ensemble constituant des structures antigéniques. L'histidyl-tARN synthétase est l'une de ces enzymes cytoplasmiques (50-52 kDa) correspondant à l'antigène Jo1.

■ III. DÉPISTAGE ET IDENTIFICATION DES ANTICORPS ANTI-NUCLÉAIRES

En pratique quotidienne, l'étude des AAN nécessite une démarche dichotomique, comprenant tout d'abord un test de **dépistage global** des anticorps puis un ou des tests spécifiques permettant leur **identification** (anticorps anti-ADN natif, anti-histones, anti-antigènes nucléaires solubles, anti-protéines de la membrane nucléaire).

III.1- Dépistage des anticorps anti-nucléaires

La principale technique utilisée pour le dépistage des AAN est l'IFI (sur culture cellulaire ou coupe d'organe), alors que l'immunoenzymologie (ELISA) et l'immunoempreinte (immunodot) (7, 8) sont moins utilisées en dépistage.

III.1.1- Immunofluorescence indirecte sur culture de cellules ou coupe d'organe

L'IFI peut être réalisée à partir de différents substrats, cultures de **cellules HEp-2** (lignée cellulaire provenant d'un carcinome laryngé humain), **coupes d'organe** (foie de rat). Les performances analytiques de ces préparations ne sont pas équivalentes (9). Les coupes de foie de rat ont été peu à peu remplacées par les cellules HEp-2 qui sont plus sensibles pour certains aspects de fluorescence (anti-centromères par exemple), pas pour d'autres aspects. Seule la technique HEp-2 figure à la nomenclature.

L'interprétation des résultats nécessite une parfaite connaissance histologique et cytologique des substrats utilisés.

a) Principe

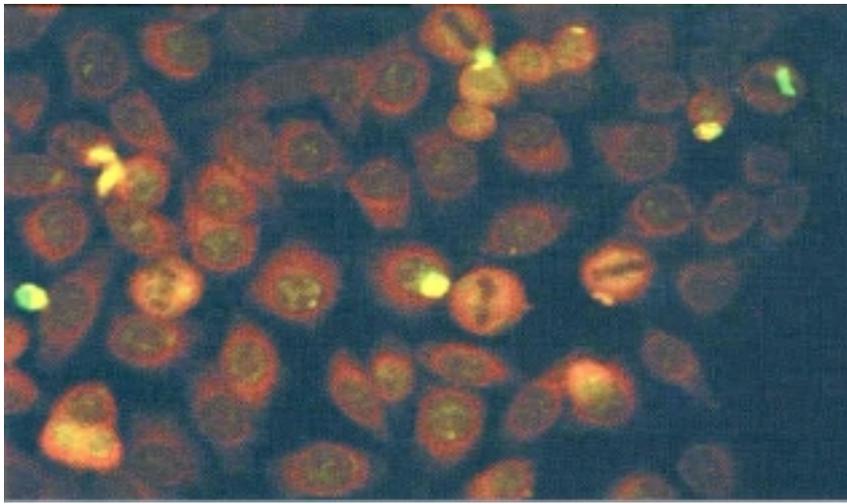
Le sérum est mis en contact avec le substrat à température ambiante en chambre humide. Le temps de contact est en moyenne de 30 minutes. Si le sérum contient des AAN, ceux-ci se fixent spécifiquement au niveau de leurs cibles antigéniques. Leur présence est ensuite révélée, après une étape de lavage, par un anticorps anti-Ig humaines marqué à la fluorescéne.

b) Résultats et interprétation

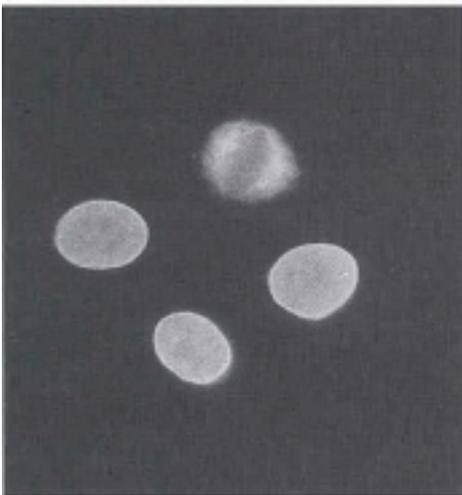
Trois notions sont importantes à envisager, l'**aspect de la fluorescence**, le **seuil de positivité** des résultats, et le **titre** en anticorps.

Aspect de la fluorescence

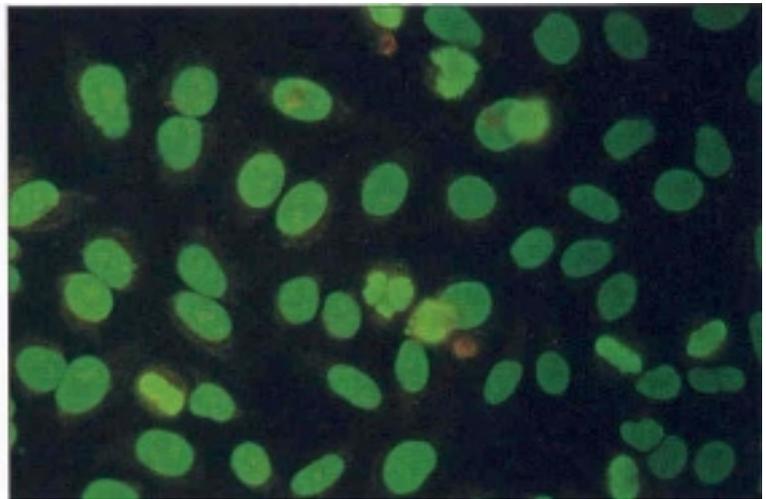
L'aspect de la fluorescence peut être **membranaire**, **homogène**, **moucheté**, **nucléolaire** et parfois **cytoplasmique** (planche 1). Ces divers aspects de fluorescence sont mis en évidence selon la nature et la localisation des antigènes reconnus (tableau I, planche 2).



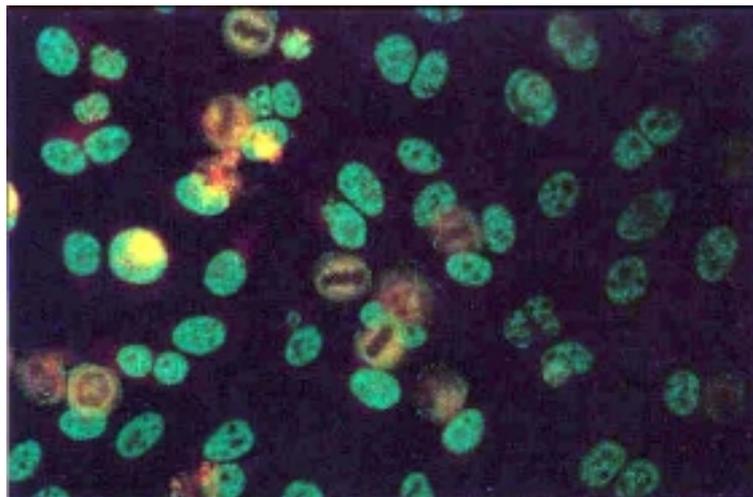
I-A – Négatif.



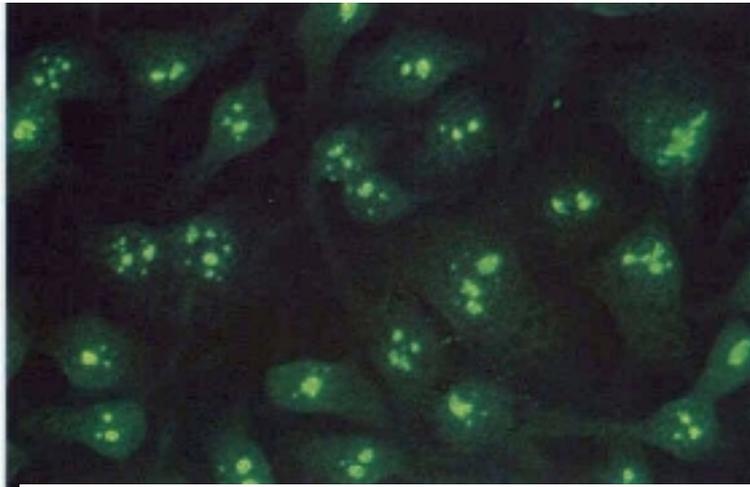
I-B – Aspect membranaire.-



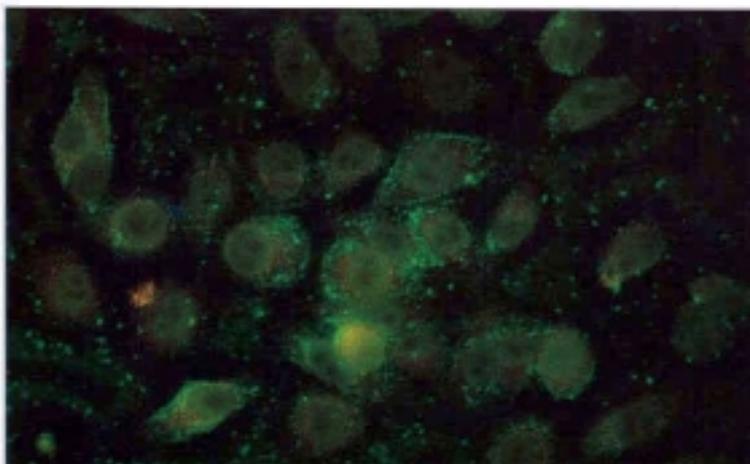
I-C – Aspect homogène.



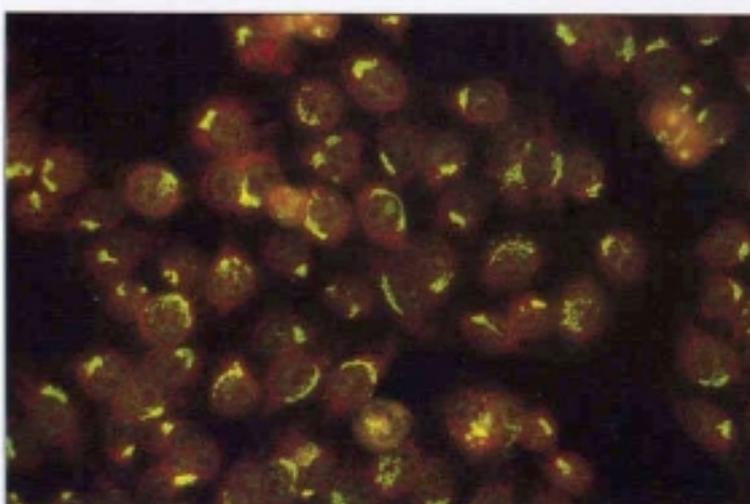
I-D – Aspect moucheté.



1-E-Aspect nucléolaire



1-F-Aspect cytoplasmique

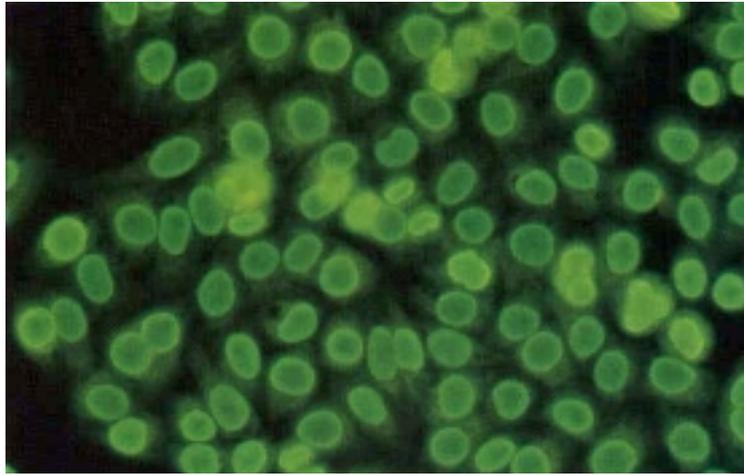


**1-G-Aspect cytoplasmique
(anticorps anti-appareil de Golgi).**

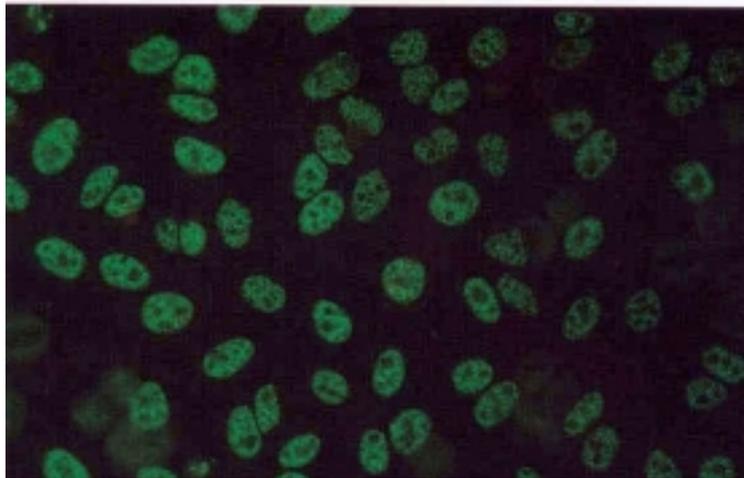
Tableau I : Différents aspects de fluorescence en fonction des cibles antigéniques reconnues par les autoanticorps (aspects sur cellules HEP-2) (Planche 2)

Localisation de la fluorescence	Aspect de la fluorescence	Cibles antigéniques potentielles
Noyau (cellules interphasiques)	<ul style="list-style-type: none"> • Membranaire : - régulier - irrégulier • Homogène • Moucheté : - gros grains - grains moyens - grains fins isolés - grains fins denses - hétérogène • Ponctué : - nombreux grains (± 40) - grains multiples (± 5) - grains rares 	<ul style="list-style-type: none"> - Lames (A, B, C) - Pores nucléaires (gp 210) - Chromatine (ADN, histone, - Matrice - RNP, Sm - SS-A, autres - SS-B, Scl 70, Ku, autres - PCNA - Centromères - Protéine de 100 kDa (sp100) - Protéine de 80 kDa
Nucléoles	<ul style="list-style-type: none"> • Homogène • Granulaire • Moucheté • Ponctué • Périnucléolaire 	<ul style="list-style-type: none"> - PMScl, autres - Scl 70, fibrillarine - ARN polymérase 1 - Organisateur nucléolaire - Chromatine
Cellules en mitose	<ul style="list-style-type: none"> • Appareil mitotique • Ponctué (chromosomes en plaque équatoriale) 	<ul style="list-style-type: none"> - Centriole - Pôle (NuMA) - Tubuline - Centromères

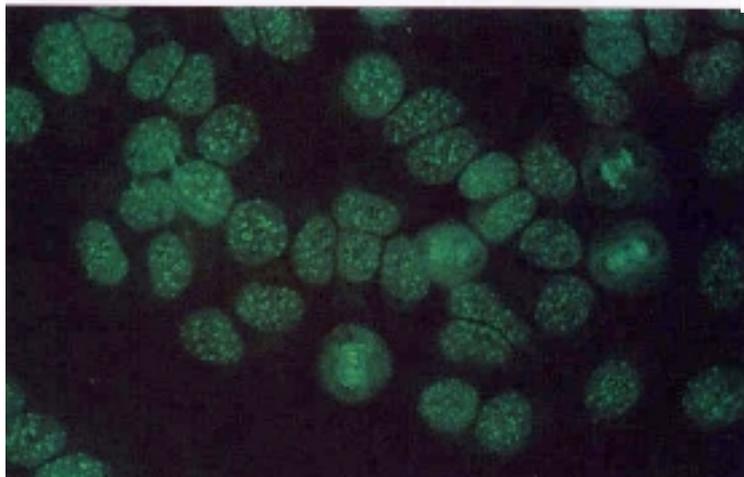
- Plusieurs autoanticorps de spécificités différentes peuvent être présents dans un même sérum. L'aspect de la fluorescence du noyau est alors la résultante de ces différentes populations d'anticorps (planche 3). Une fluorescence homogène correspondant théoriquement à des anticorps anti-ADN peut masquer pour de faibles dilutions du sérum une fluorescence mouchetée correspondant à des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles qui seront révélés à des dilutions sériques plus importantes.
- La présence de complexes immuns (immunoglobulines agrégées, cryoglobulines) peut parfois donner des aspects de fluorescence atypiques.
- Certains autoanticorps de même spécificité peuvent donner des aspects de fluorescence différents. Des anticorps anti-chromatine peuvent donner une fluorescence homogène du noyau ou une fluorescence périnucléolaire.
- Certaines cibles antigéniques nucléaires n'ont été identifiées que récemment. C'est le cas des anticorps anti-nucléosomes par exemple. L'aspect de la fluorescence liée à la présence de ces anticorps apparaît extrêmement variable et peut être aussi bien moucheté qu'homogène ou les deux.
- Il existe différentes préparations commerciales de cellules HEP-2 ou de coupes de foie. L'antigénicité de ces substrats peut varier à la fois d'un fournisseur à l'autre, mais égale-



2-A - Aspect homogène, avec renforcement périphérique donné par un anticorps anti-ADN natif.



2-B- Aspect moucheté
grains en nombre et taille variables

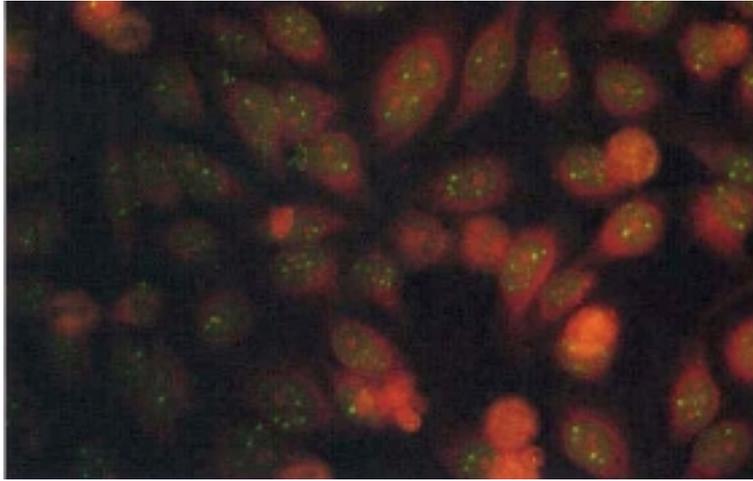


2-C -Aspect moucheté/ponctué donné par un anticorps anti-centromères : dans les cellules en interphase, on observe 40 grains fluorescents. Dans les cellules en métaphase, la fluorescence est localisée au niveau de la plaque équatoriale.

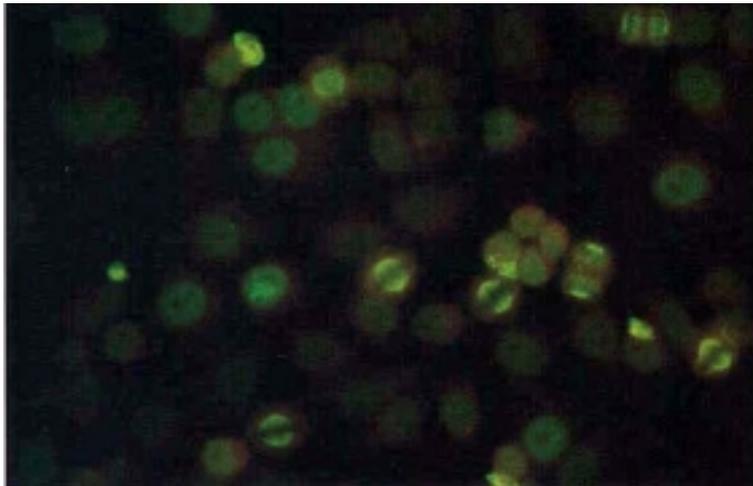
Planche 2 : Anticorps anti-nucléaires : différents aspect en immunofluorescence indirecte sur cellules HEP-2.

- Grossissement X 400

- Sérums dilués au 1:80



2-D – Aspect ponctué ou « dots » (2 à 5 grains par cellule).

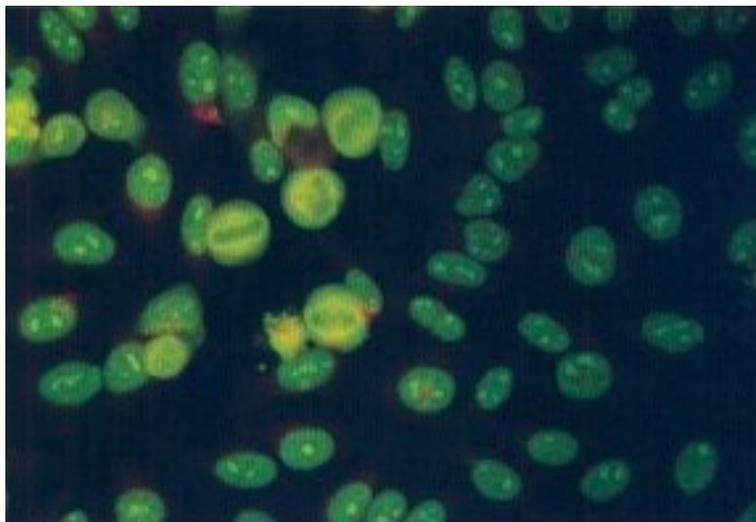


2-E – Fluorescence de l'appareil mitotique, dans les cellules en cours de mitose.

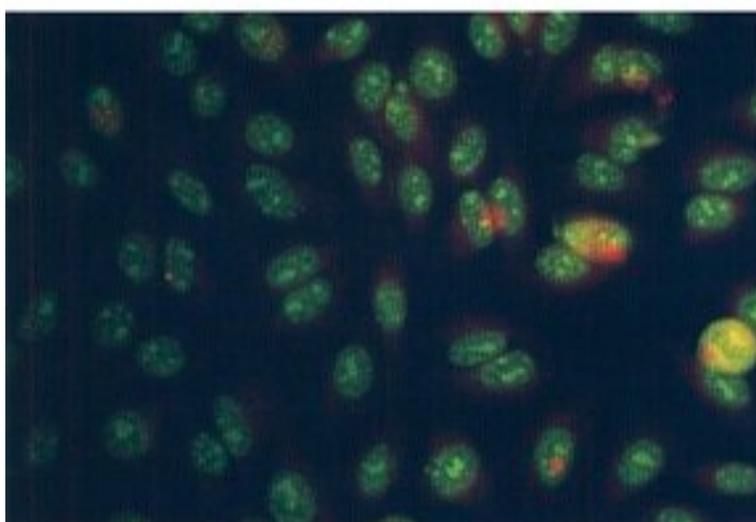
Planche 2 : Anticorps anti-nucléaires : différents aspect en immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2.

- Grossissement X 400

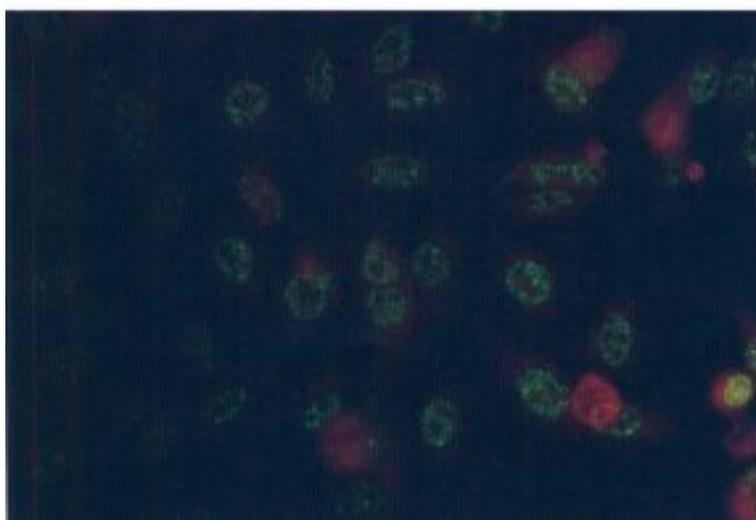
- Sérums dilués au 1:80



3-A – Aspect moucheté (grains fins) associé à un aspect nucléolaire.



3-B – Aspect moucheté (grains moyens) associé à un aspect nucléolaire.



3-C – Aspect moucheté (grains moyens) associé à un aspect ponctué ou « dots »
(2 à 3 grains par cellule).

Planche 3 : Anticorps anti-nucléaires : différents aspects en immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2.

Aspects correspondants à la présence de plusieurs anticorps de spécificité différente.

ment d'un lot à l'autre chez un même fournisseur. De ce fait, un même sérum peut donner des aspects de fluorescence différents selon le substrat utilisé (voir ci-après, les facteurs influençant les résultats).

- Cas particulier de l'IFI sur cellules HEp-2 transfectées par le gène SS-A (10)

Il s'agit d'une technique d'IFI classique, utilisant comme substrat une culture de cellules HEp-2 transfectées par un gène codant pour la protéine S5-A de 60 kDa (Hep-2000TM, Immunoconcept). Dans ces conditions, les cellules expriment dans environ 10 à 15 % des cellules en interphase une grande quantité de protéines SS-A localisées au niveau des nucléoles. L'aspect de la fluorescence liée aux anticorps anti-SS-A doit donc être différencié de l'aspect nucléolaire (planche 4).

Le titrage de ces anticorps vis-à-vis d'antigènes surexprimés dans ces cellules n'a pas d'intérêt diagnostique. En revanche, leur détection est un point d'appel pour identifier ces autoanticorps avec une technique spécifique (immunoprécipitation, ELISA, par exemple).

Seuil de positivité des résultats

Le choix de la dilution initiale pour le dépistage des AAN dépend principalement du substrat et de la méthodologie utilisés. Sur cellules HEp-2, la dilution au 1:80 est recommandée, mais une dilution plus faible, au 1:40 peut être préconisée dans certains cas, en particulier chez l'enfant.

Un phénomène de zone peut exister, et bien qu'il soit exceptionnel, il faut savoir poursuivre les dilutions devant des manifestations cliniques évocatrices.

En 1997, une étude internationale comparant les résultats des titres d'AAN sur cellules HEp-2 entre un groupe de sujets sains (âgés de 20 à 60 ans) et un groupe de patients atteints de différentes connectivites (LED, sclérodermie, syndrome de Sjögren, polyarthrite rhumatoïde), a montré que 31,7 % des sujets sains avaient des AAN au 1/40, 13,3 % avaient des AAN au 1/80, 5 % au 1/160, et 3,3 % au 1/320 (11). Le titre au 1/160 semble être discriminant entre sujets sains et sujets avec connectivite dans cette étude. Toutefois, un titre faible en AAN (1/80) dans un contexte clinique évocateur conserve une valeur diagnostique forte, même si cette situation est peu fréquente. À l'inverse, un titre faible (1/80 ou 1/160) considéré isolément peut conduire à des erreurs diagnostiques graves.

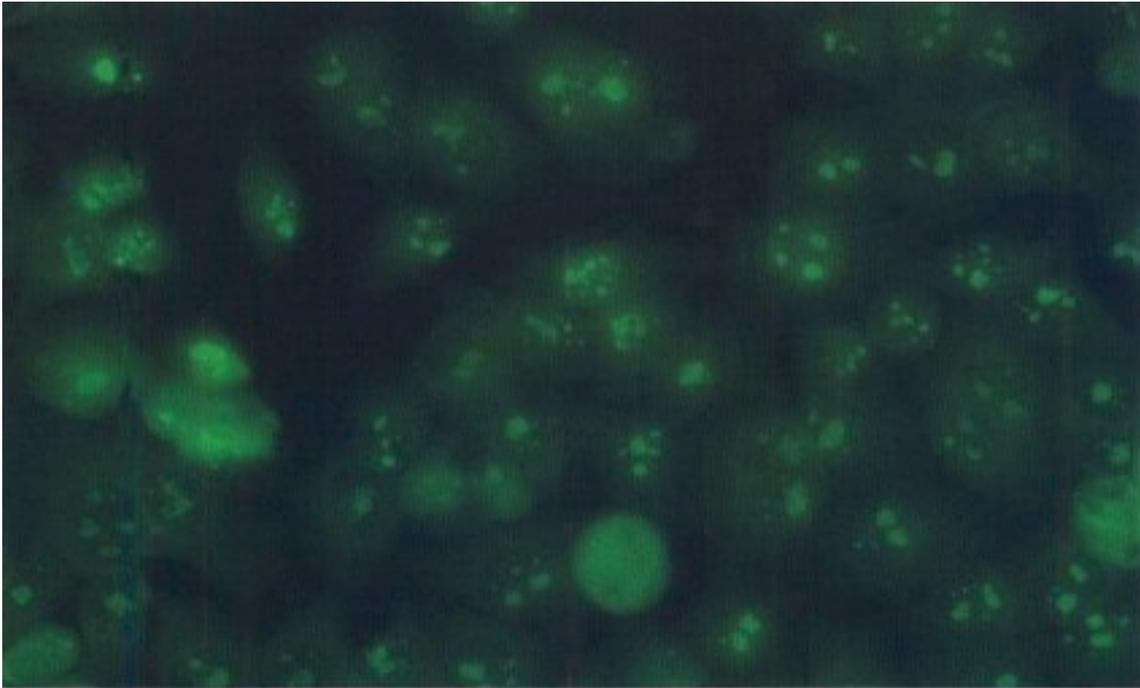
L'âge du sujet est également à prendre en compte dans la détermination du titre seuil de positivité car la fréquence des AAN augmente chez les sujets sains après 60 ans (11).

Titre en anticorps

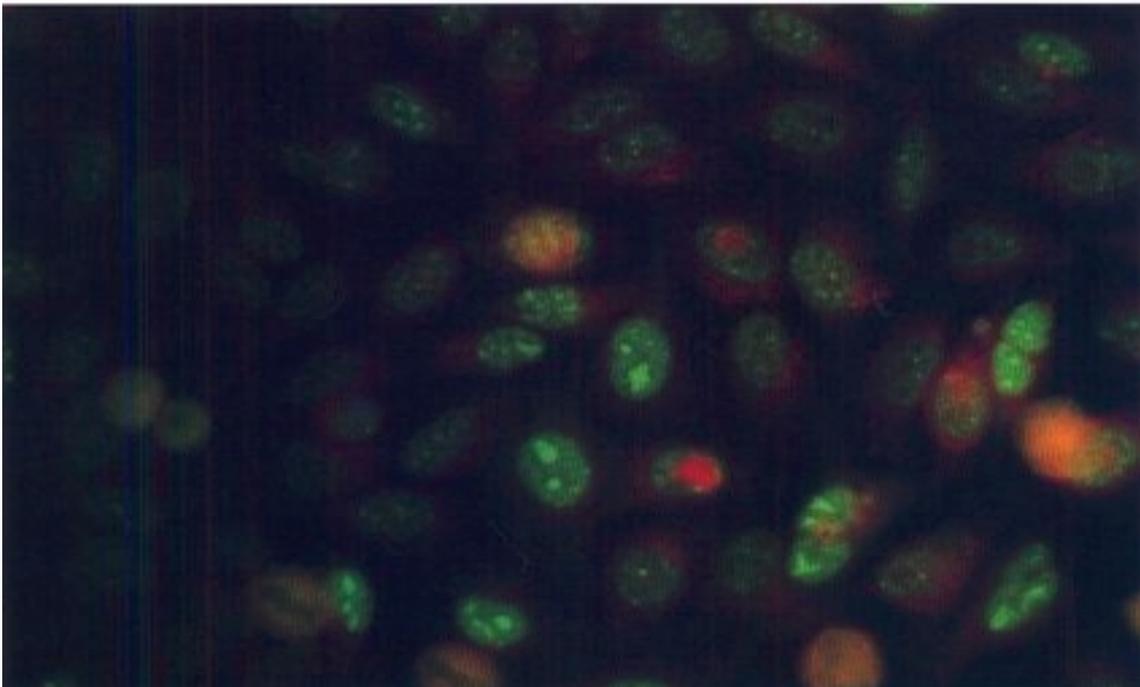
Si un anticorps est détecté, le sérum sera titré à partir de la dilution de départ en réalisant des dilutions croissantes, généralement de 2 en 2.

Le **titre en anticorps** correspond à l'inverse de la dernière dilution du sérum donnant encore une fluorescence positive.

Pour un titre élevé, le résultat peut être rendu supérieur ou égal à une dilution limite. Il n'existe pas de consensus quant au choix de cette **dilution limite** (\geq 1:1000 ou 1:10 000). Une dilution au 1:1000 est suffisante pour juger de la valeur d'un titre (titre élevé), pour différencier des aspects superposés de fluorescence, et orienter un diagnostic.



4-A – Aspect nucléolaire classique : fluorescence des nucléoles dans **toutes** les cellules en interphase (2 à 5 nucléoles par cellule).



4-B – Aspect particulier lié à la présence d'anticorps anti-SS A : fluorescence mouchetée dans la majorité des cellules associée à une fluorescence intense des nucléoles **dans 10 à 15 %** des cellules.

Planche 4 : Recherche d'anticorps anti-nucléaires en immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2000TM (Immunoconcept).

- Grossissement X 400

- Sérums dilués au 1:80

c) Facteurs influençant le résultat

À chaque étape de la réalisation pratique de l'IFI, plusieurs facteurs peuvent influencer la qualité des résultats.

Préparation du substrat

Quel que soit le substrat utilisé (coupe de foie de rat ou cellules HEP-2), la préparation des lames, les procédés de fixation du substrat, et ses conditions de conservation sont déterminants pour le maintien d'une bonne antigénicité

- **La préparation des lames** est importante, en particulier l'épaisseur de la coupe d'organe, la densité cellulaire du frottis de cellules HEP-2, le nombre de cellules en mitose. Aujourd'hui, les cellules HEP-2, peuvent être cultivées directement sur le support de travail. Ceci permet d'obtenir des préparations homogènes de cellules en monocouche dont le cytoplasme est très étalé, le noyau volumineux, et les nucléoles bien visibles (de 1 à 4 par noyau). Ces cellules en culture sont à des stades différents de leur cycle cellulaire. Les cellules en mitose, qui sont plus nombreuses que sur les coupes de foie de rat, permettent de détecter des autoanticorps contre des antigènes qui ne sont présents qu'à ce stade du cycle cellulaire (anti-PCNA [Proliferating Cellular Nuclear Antigen], anti-fuseau ou anti-appareil mitotique [anti-centriole]). Ces cellules ne présentent pas de tissu de soutien comme c'est le cas pour les coupes d'organe. Toutefois, les conditions de culture de ces cellules tumorales, qui ont un fort taux de mutation, peuvent à long terme aboutir à des modifications dans l'expression de certains antigènes.
- **Les procédés de fixation** des substrats varient selon les fabricants. Les cellules doivent être fixées et perméabilisées pour permettre la détection des AAN. Les fixateurs utilisés sont à base de méthanol, d'éthanol, d'isopropanol, d'acétone pure ou de mélanges. Certains épitopes, notamment au niveau de l'antigène SS-A peuvent être modifiés avec l'utilisation de l'éthanol, diminuant ainsi la sensibilité du substrat pour la détection des anticorps anti-SS-A (12,13).
- **Les conditions de conservation** recommandées par les fabricants doivent être rigoureusement respectées, à la fois au niveau de la température (-80°C ou +4°C) et de la durée de la conservation.

Préparation du sérum

Les sérums ne sont pas utilisés purs mais dilués en PBS (Phosphate Buffered Saline) (phosphate de sodium 0,01 M, chlorure de sodium 0,15 M, pH 7,4). En fonction du type de substrat, on ajoute parfois du Tween 20 (0,05 %) ou de l'albumine bovine (2 %) afin de limiter les fixations non spécifiques.

Incubation

Les incubations avec le sérum puis avec le conjugué anti-Ig fluorescent doivent être effectuées dans des conditions définies. Elles sont en général d'une durée de 30 minutes, à température ambiante et en chambre humide. Les dépôts des différentes dilutions des sérums ne doivent pas confluer sur les lames afin d'éviter les contaminations.

Lavage des lames

Après incubation avec les sérums, chaque puits est lavé individuellement (à la pipette) afin d'éviter tout contact avec la dilution d'un sérum voisin. En effet, les risques de contamination d'un puits par un autre puits contenant un sérum à titre élevé en anticorps sont très souvent sous-estimés lors de cette étape de lavage.

Anticorps anti-Ig humaine marqué

Il n'existe pas de consensus quant au choix de l'anticorps révélateur : **anti-immunoglobulines polyvalent** (anti-IgG, IgM et IgA, anti-IgG [H+L]) ou anti-IgG **spécifique**.

Pour chaque type de substrat, et pour chaque lot, le conjugué doit être titré selon la méthode de « titration au carré » (14). Il existe pour cela un standard de sérum de mouton anti-Ig humaines conjugué à la fluorescéine (OMS, n° 480010).

Le choix d'une dilution pour un lot de conjugué n'est pas transposable d'un laboratoire à un autre, ni d'un substrat à un autre.



Microscope

L'utilisation d'un microscope à fluorescence équipé du système d'épifluorescence nécessite un entretien régulier et un réglage adéquat (lampe, filtres, optique). L'équipement doit permettre une lecture à un grossissement minimum de 400 et à l'immersion.

Il faut savoir que l'intensité de la fluorescence d'une préparation diminue progressivement au cours de son exposition.

Lecture

Indépendamment de ces variations méthodologiques, la lecture d'une fluorescence est soumise à une certaine **subjectivité** faisant en sorte que les différences d'interprétation inter et intra-laboratoires sont parfois importantes (15). Au sein d'un même laboratoire, une double lecture par deux lecteurs différents est nécessaire. L'utilisation d'un contrôle négatif et d'un contrôle positif est indispensable pour chaque lame. Des contrôles qualitatifs pour les principaux aspects de fluorescence sont disponibles chez les différents fabricants ou au CDC d'Atlanta (16).

III.1.2- Autres techniques de dépistage des anticorps anti-nucléaires

La recherche d'AAN peut également être réalisée par une technique immunoenzymatique de type ELISA ou par immunoempreinte (immunodot). Ces techniques utilisent comme préparation antigénique des extraits nucléaires ou des mélanges d'antigènes purifiés connus. Ces méthodes sont toutefois rarement utilisées en pratique courante. En effet, comparativement à l'IFI, la performance de ces tests appliqués au dépistage global des AAN est limitée par plusieurs facteurs : l'absence d'orientation diagnostique qui peut être apportée par l'aspect de la fluorescence, leur coût et le nombre très restreint d'antigènes lorsqu'il s'agit de mélanges.

III.2- Identification des anticorps anti-nucléaires

Lorsque le test de dépistage est positif, il faut alors envisager l'identification des AAN. Ces autoanticorps peuvent reconnaître un grand nombre d'épitopes distincts. Bien que la localisation et/ou l'aspect de la fluorescence ne permettent pas de préciser le ou les antigènes reconnus, ils permettent cependant une orientation diagnostique. En fonction de ces résultats et du contexte clinique, différents tests peuvent être pratiqués.

III.2.1- Anticorps anti-ADN

Là encore, il existe une grande hétérogénéité parmi les anticorps anti-ADN (17). Ces anticorps peuvent être classés en trois catégories selon qu'ils reconnaissent l'ADN natif, l'ADN dénaturé ou les deux. Ces autoanticorps peuvent être de classe IgM et/ou IgG ou IgA.

ADN natif = ADN bicaténaire = ADN double brin = dsDNA (double stranded DNA)
ADN dénaturé = ADN monocaténaire = ADN simple brin = ssDNA (simple stranded DNA)

- Les anticorps anti-ADN ne reconnaissant que l'ADN dénaturé peuvent se fixer à différents niveaux de structures non exposées dans l'ADN natif (bases puriques et pyrimidiques, nucléosides, nucléotides, oligonucléotides).
- Les anticorps anti-ADN reconnaissant l'ADN natif peuvent se fixer sur le squelette phosphodésoxyribose (cibles antigéniques communes avec les anticorps anti-ADN dénaturé) et au niveau de cibles antigéniques conformationnelles de la double hélice présentes sur la forme B ou de la forme Z.

Les anticorps reconnaissant exclusivement l'ADN natif sont rares. La plupart des anticorps anti-ADN reconnaissent à la fois l'ADN natif et l'ADN dénaturé. La majorité des tests disponibles pour la recherche des anti-ADN est basée sur leur réactivité vis-à-vis de l'ADN de forme B. La recherche des anticorps anti-ADN dénaturé a peu de valeur diagnostique car ces autoanticorps sont fréquemment observés au cours de maladies inflammatoires, infectieuses et chez les sujets normaux.

En pratique quotidienne, quatre techniques sont utilisables pour la recherche des anti-ADN, la radioimmunologie (test de Farr), l'IFI sur *Crithidia luciliae*, l'immunoenzymologie (ELISA), et l'immunoempreinte. Ces tests ne sont pas équivalents. Certains détectent des anticorps anti-ADN de forte avidité (test de Farr), et d'autres à la fois des anticorps de forte et de faible avidité (IFI, ELISA, immunodot). Ces derniers tests sont moins bien corrélés à l'activité de la maladie (tableau II) (18).

Tableau II : Principales caractéristiques des tests utilisés pour la détection des anticorps anti ADN natif d'après la référence 18 modifiée

Tests	Sensibilité	Spécificité	Corrélation avec l'activité de la maladie	Positivité au cours du LED
Test de Farr (quantitatif)	++	+++* Ne permet pas de discriminer les anti-ADN d'isotype IgG ou IgM	+++ Détection des anti-ADN de forte avidité	50 à 60 %
IFI <i>Crithidia luciliae</i> (qualitatif ou semi-quantitatif si titrage)	++	+++** Les anti-ADN simple brin ne sont pas détectés	+ Détection des anti-ADN de forte et faible avidité	30 à 50 %
ELISA (quantitatif)	+++	+++*	+ Détection des anti-ADN de forte et faible avidité	70 à 90 %

* en fonction des conditions techniques, l'écueil étant la détection des anticorps anti-ADN simple brin.

** petit pourcentage de faux positifs.

III.2.1.1- Test de Farr

a) Principe

Ce test consiste à incuber de l'ADN radiomarqué avec le sérum du patient. Les complexes ADN-anti-ADN sont ensuite précipités par le sulfate d'ammonium ou le polyéthylène glycol. L'ADN non lié reste en solution. La radioactivité présente dans le précipité est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-ADN natif présents dans le sérum (19).

b) Résultats et interprétation

Ce test est **quantitatif**, les résultats sont exprimés en unités internationales (UI/ml). Un résultat positif est hautement spécifique du LED. Ce test ne permet pas de différencier les anticorps anti-ADN d'isotype IgG ou IgM. Il implique des conditions techniques très rigoureuses en raison, notamment, du risque de dénaturation de l'ADN. L'interprétation de tests de Farr dans lesquels les sérums normaux donnent un fort pourcentage de précipitation est délicate.

III.2.1.2- L'immunofluorescence indirecte sur *Crithidia luciliae*

Crithidia luciliae est un protozoaire flagellé voisin du trypanosome. Ce parasite a la particularité de contenir une volumineuse mitochondrie (kinétoplaste) riche en ADN. Il s'agit d'un ADN natif circulaire, associé à des histones. Le kinétoplaste est excentré au niveau du corps cellulaire, il doit être différencié du noyau du parasite qui est plus volumineux, et du corps basal situé à la base du flagelle (figure 5).

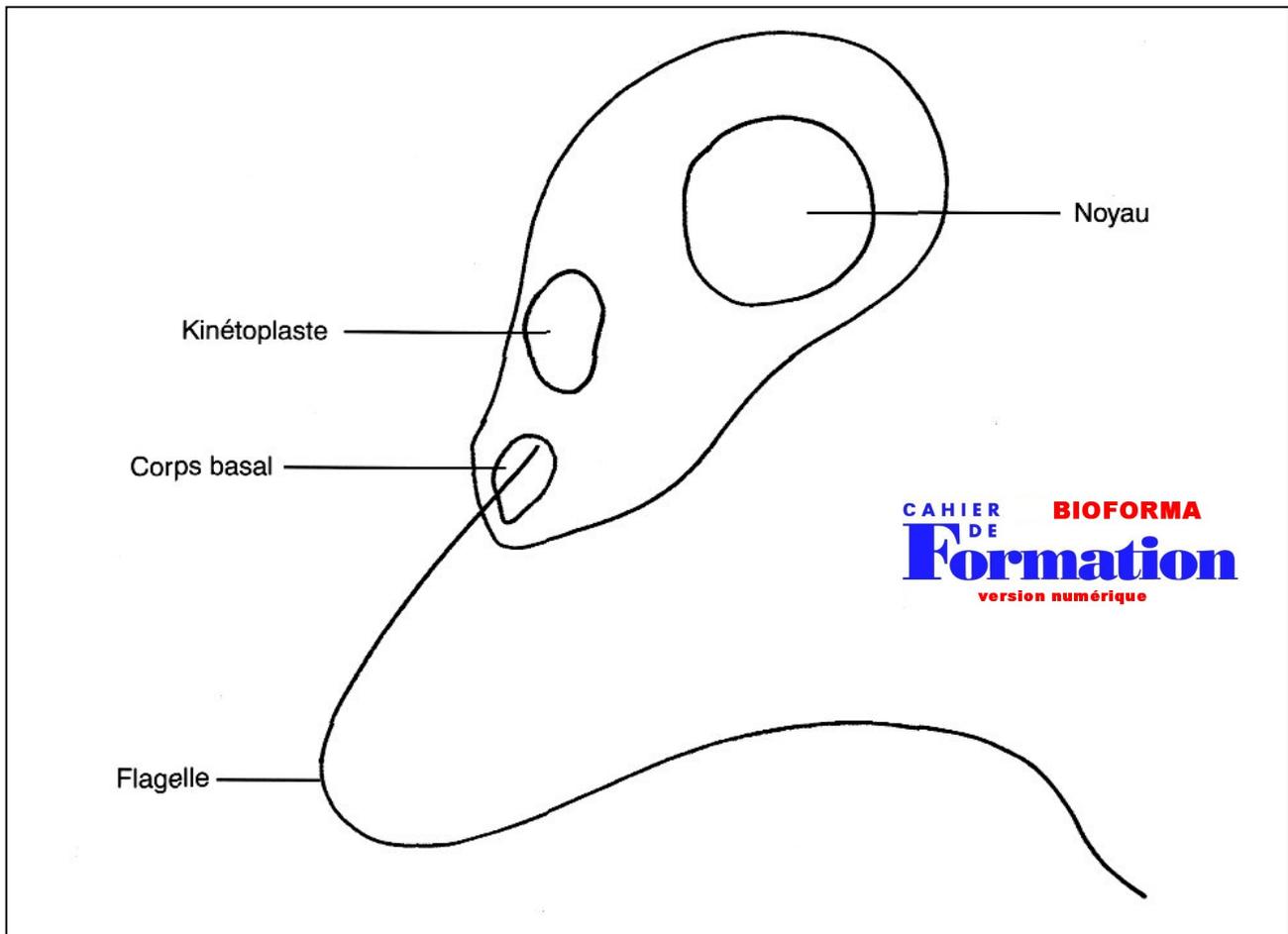


Figure 5 : *Crithidia luciliae*.

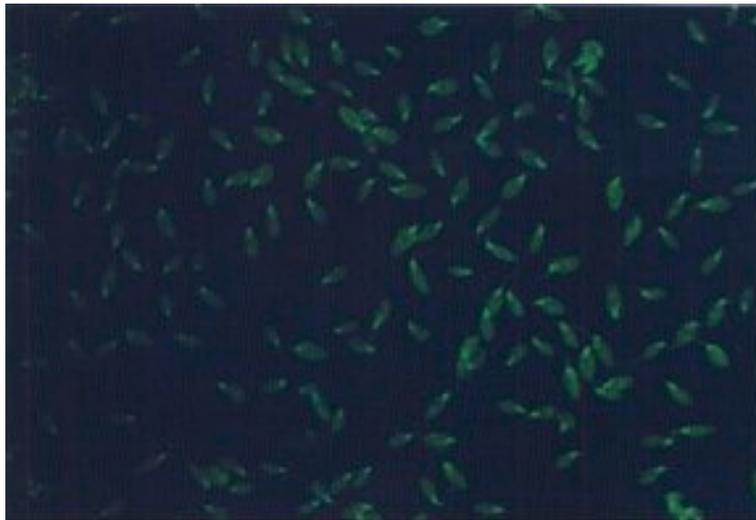
a) Principe

La recherche d'anticorps anti-ADN par IFI est réalisée à partir d'un substrat constitué d'un étalement de *Crithidia luciliae* fixés. Le sérum est mis en contact avec ce substrat. Les anticorps anti-ADN fixés au niveau de l'ADN du kinétoplaste sont ensuite révélés par un conjugué anti-Ig humaines marqué à la fluorescéne (20). La lecture se fait au microscope à fluorescence.

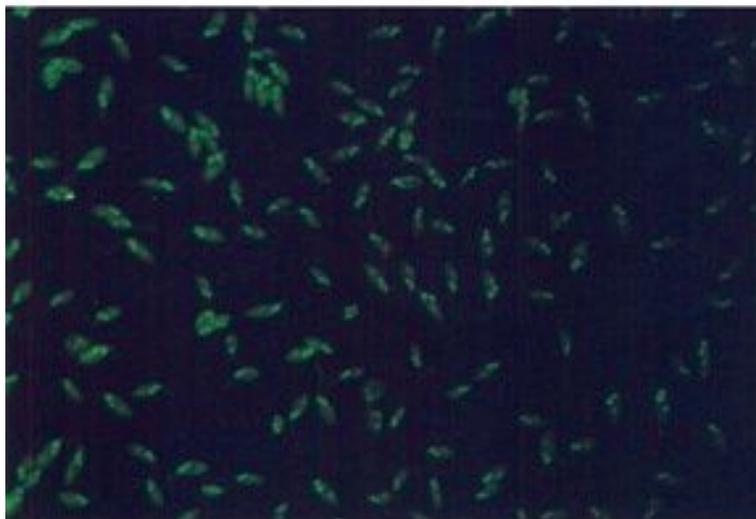
Ce test met en évidence des anticorps anti-ADN natif (tableau II).

b) Résultats et interprétation

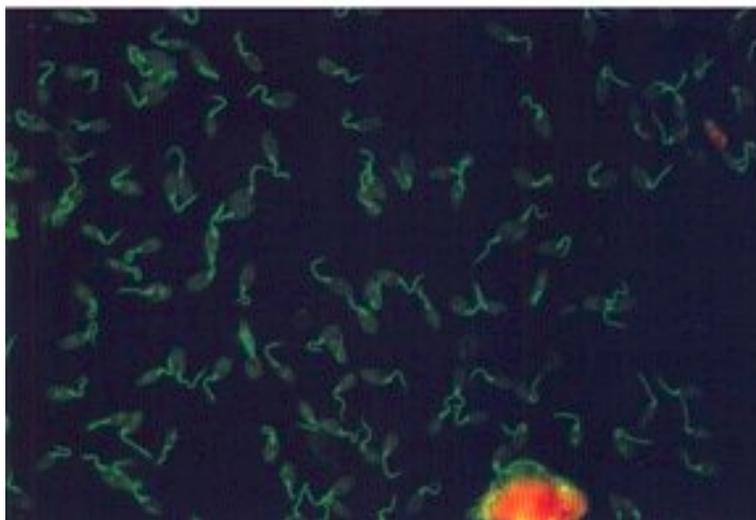
- Un résultat négatif pour la recherche d'anticorps anti-ADN natif se caractérise par une absence de marquage du kinétoplaste.
- Un résultat positif se caractérise par une fluorescence nette du kinétoplaste qui peut avoir un aspect plein ou un aspect cerclé (planche 5). Cette fluorescence doit être différenciée d'une fluorescence isolée ou concomittante du noyau et/ou du corps basal du flagelle. Une fluorescence du noyau et/ou du corps basal, sans fluorescence du kinétoplaste, est un résultat négatif quant à la recherche d'anticorps anti-ADN natif.



5-A – négatif (fluorescence du corps parabasal et non du kinétoplaste)



5-B – Positif (fluorescence intense du kinétoplaste)



5-C – Négatif (fluorescence intense des flagelles).

Planche 5 : Recherche d'anticorps anti ADNnatif sur *Crithidia lucilae* par immunofluorescence indirecte.

- Grossissement X 400

- Sérums dilués au 1:10

- Deux à 5 % des sérums donnent des résultats faussement positifs dont certains seraient dus à la présence d'anticorps anti-histones. Ainsi, ce test a une valeur certaine en raison de sa faible sensibilité, mais avec réserves.

III.2.1.3- Tests ELISA

a) Principe

Les anticorps anti-ADN natif du sérum à étudier se lient à de l'ADN natif fixé au fond des puits d'une plaque de microtitration. La fixation d'IgG anti-ADN natif est détectée par addition d'anticorps anti-IgG humaines marqué par une enzyme. Le substrat de l'enzyme (initialement incolore) devient coloré après action de l'enzyme. La lecture des densités optiques est faite à la longueur d'onde correspondant au substrat utilisé (21, 22).

b) Résultats et interprétation

Les résultats sont exprimés en unités dont le mode de calcul dépend de la trousse utilisée. Le plus souvent, une courbe d'étalonnage est construite à partir de différentes dilutions d'un standard connu et titré en unités internationales (UI) ou en unités arbitraires (U).

Le seuil de positivité doit être déterminé pour chaque technique. Il est établi à partir de la moyenne des résultats obtenus avec des sérums normaux (au minimum 100 à 200, représentatifs des différentes tranches d'âges de 20 à 60 ans et des deux sexes) additionnée de deux déviations standard.

Les anticorps anti-ADN dénaturé et anti-ADN natif appartiennent pour partie au répertoire normal des autoanticorps naturels, la plupart étant des IgM de faible affinité.

Parmi les patients ayant un LED, 60 à 85 % ont des anticorps anti-ADN natif d'isotype IgG (23, 24). Les IgM anti-ADN natif ont une faible valeur diagnostique car ils peuvent être détectés au cours d'autres connectivites que le lupus, et également au cours d'infections virales.

La gravité du diagnostic ainsi que les conséquences thérapeutiques qui en découlent justifieraient que la recherche de ces autoanticorps soit réalisée par deux techniques distinctes utilisant une méthodologie différente (ELISA et IFI par exemple). Si la valeur diagnostique de ces autoanticorps est reconnue, leur valeur prédictive (corrélation entre l'activité de la maladie et le titre en anti-ADN natif) est controversée (23, 25). Une augmentation rapide de leur taux doit cependant faire rechercher une atteinte viscérale, notamment rénale.

c) Facteurs influençant le résultat

Ce test détecte des anticorps de forte et faible affinité pour l'ADN natif, ce qui est un avantage en terme de sensibilité et un inconvénient en terme de spécificité diagnostique.

Plusieurs types d'interférences sont possibles :

- L'ADN utilisé pour la préparation des microplaques doit être débarrassé de ses protéines et de l'ADN dénaturé.
- De l'ADN dénaturé peut se former à partir de l'ADN natif après la sensibilisation des puits. La technique doit donc être très rigoureuse.

- Un facteur limitant spécifique à cette technique ELISA vient de la difficulté à lier l'ADN au support plastique ; d'où la nécessité d'une pré-sensibilisation des plaques avec des protéines basiques telles que la poly-L-lysine ou le sulfate de protamine. Des réactions faussement positives peuvent résulter de la fixation du sérum sur ces molécules.

- Comme pour toute technique ELISA, les résultats peuvent être également influencés par la présence, dans le sérum, de complexes immuns, de facteurs rhumatoïdes et/ou de cryoglobulines (faux positifs ou faux négatifs).

La réalisation d'un témoin pour chaque sérum en utilisant un puits non sensibilisé avec l'ADN permet de contrôler ces fixations non spécifiques, mais aucune trousse commercialisée ne propose ces contrôles.

III.2.1.4- Immunodot

a) Principe

L'immunodot repose sur un principe voisin de l'ELISA, mais l'antigène dans ce cas est déposé sur une bandelette de nitrocellulose. Le sérum est mis en contact avec ce support, et les anticorps anti-ADN fixés sont ensuite révélés avec un anticorps anti-Ig humaine marqué par une enzyme. La lecture de la coloration est effectuée à l'œil comparativement à des témoins négatifs et positifs. L'utilisation d'un lecteur (scanner) est possible.

b) Résultats et interprétation

Il s'agit d'un test **qualitatif** permettant la détection des anticorps anti-ADN natif.

La réaction positive se caractérise par une réaction colorée au niveau du dépôt de l'antigène. Une limite à l'interprétation de ces tests est liée à la subjectivité de la lecture visuelle, en particulier pour les faibles taux d'anticorps, d'où une fiabilité limitée.

III.2.2- Anticorps anti-histones et anti-nucléosomes

III.2.2.1- Anticorps anti-histones

Les anticorps anti-histones regroupent une population très hétérogène d'autoanticorps réagissant avec les cinq groupes d'histones mais également avec des déterminants conformationnels résultant de l'association des histones entre elles ou avec l'ADN (nucléosomes).

a) Principe

Les anticorps anti-histones sont principalement recherchés par des techniques ELISA utilisant comme antigène une préparation d'histones (mélange de deux histones différentes ou plus). Dans ces conditions, l'exposition des différents épitopes varie. Elle est très différente de celle *in vivo* et la réactivité des sérums varie considérablement selon les mélanges utilisés (26).

b) Résultats et interprétation

Les anticorps anti-histones sont détectés par ELISA dans 41 à 51 % des cas de LED (souvent associés à des anticorps anti-ADN natif) et dans 64 à 80 % des cas de lupus

« induits » par des médicaments (où ils peuvent être détectés isolément, sans anticorps anti-ADN associés) (23, 27) et dans diverses autres circonstances. Ils peuvent être de classe IgG ou IgM. Cette distinction n'a pas de valeur diagnostique discriminante en pratique clinique, et l'intérêt de ces anticorps est **très limité**.

III.2.2.2- Anticorps anti-nucléosomes

L'existence d'anticorps reconnaissant des structures macromoléculaires où les histones sont associées à l'ADN dans les nucléosomes a été rapportée chez la souris lupique et chez l'homme (28, 29). Il est très probable que les anticorps anti-ADN natif et anti-histones détectés au cours du LED soient en fait des anticorps anti-nucléosomes.

a) Principe

Les anticorps anti-nucléosomes sont détectés par ELISA en utilisant comme antigène des nucléosomes purifiés ou reconstitués (30).

b) Résultats et interprétation

Les résultats sont exprimés en unités arbitraires dont le mode de calcul dépend de la méthodologie utilisée. Le seuil de positivité, déterminé pour chaque technique, est établi à partir de la moyenne des résultats obtenus avec des sérums normaux (au minimum 100 à 200, représentatifs des différentes tranches d'âges de 20 à 60 ans et des deux sexes) additionnée de deux déviations standard.

La présence chez les patients lupiques d'anticorps dits anti-nucléosomes « restreints » a été démontrée (29). Il s'agit d'anticorps dirigés probablement contre des épitopes conformationnels du nucléosome et non reconnus par les anticorps anti-ADN natif et les anticorps anti-histones.

III.2.3- Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

Les antigènes nucléaires solubles ou ENA (Extractable Nuclear Antigen) sont des antigènes extractibles des noyaux des cellules par des solutions salines physiologiques. Ils sont également appelés ECT (Extrait de Cellules Thymiques) car ils sont obtenus commercialement à partir d'extraits salins de noyaux de thymus de veau ou de lapin. Certains de ces antigènes ont pu être clonés.

Il n'y a pas de règle pour la dénomination des anticorps anti-ENA :

- Certains sont désignés par la première lettre du nom du malade chez lequel a été mis en évidence l'anticorps correspondant (exemple : anti-Sm).
- D'autres sont désignés par la nature de la maladie à laquelle leur présence est associée (SS pour syndrome de Sjögren).
- D'autres enfin sont désignés par la nature moléculaire de l'antigène (RNP pour ribonucléoprotéine) ou par leur masse moléculaire (exemple : 68 kDa).

Ces anticorps correspondent souvent à une fluorescence mouchetée en IFI.

Certains de ces anticorps ne sont pas exclusivement nucléaires mais peuvent être également cytoplasmiques.

Plus d'une centaine d'épitopes ont été identifiés à ce jour, quelques-uns seulement sont recherchés en routine (Sm, U1-RNP, SS-A, SS-B, Jo1, Scl70).

La détection d'un anticorps anti-ENA peut avoir une valeur d'orientation diagnostique ou une valeur prédictive au cours de l'évolution d'une maladie autoimmune (23, 24, 31, 32).

Les anticorps anti-Sm sont quasi spécifiques du LED (32) et font partie des critères de classification de la maladie proposés par l'American Rheumatism Association (ARA). Ils seraient moins fréquents en Europe (5 à 10 % des cas) qu'aux États-Unis (30 % des lupus des sujets noirs). Cependant, une étude récente a montré que la prévalence des anticorps anti-Sm chez les patients lupiques était en fait de 70 %, après utilisation de tests plus sensibles (33).

Les anticorps anti-U1-RNP peuvent être présents au cours du LED mais aussi au cours des connectivites mixtes. Il semble que les épitopes reconnus par ces anticorps soient différents selon la maladie associée. Ces épitopes sont situés au niveau des différentes protéines complexées aux U-ARN (6).

Les anticorps anti-SS-A (ou Ro) reconnaissent au moins trois protéines de masses moléculaires différentes (46, 52 et 60 kDa) parmi les sc-RNP. Ces anticorps sont détectés dans certaines formes de lupus, mais surtout au cours du syndrome de Gougerot-Sjögren. Leur détection chez la femme enceinte est importante. Il existe en effet, une relation entre la présence d'anticorps anti-SS-A chez la femme enceinte et le risque de bloc auriculo-ventriculaire congénital chez l'enfant (31).

Les anticorps anti-SS-B (ou La) sont dirigés contre d'autres épitopes du complexe sc-RNP, dont une protéine de 47 kDa. Ils sont rares au cours du lupus, et sont assez spécifiques du syndrome de Gougerot-Sjögren.

Les anticorps anti-Jo1, dirigés contre l'histidyl-tARN synthétase (antigène cytoplasmique), sont détectés au cours de la polymyosite.

Les anticorps anti-Scl-70, spécifiques de la topo-isomérase I, sont détectés dans les sclérodermies.

De nombreux autres anticorps anti-ENA ont été décrits. **L'anticorps anti-PCNA** (Proliferating Cell Nuclear Antigen) par exemple est dirigé contre la cycline qui apparaît dans le noyau pendant la phase S (synthèse) du cycle cellulaire. Il est exceptionnel (détecté dans moins de 1 % des sérums de patients lupiques) mais très spécifique de la maladie.

En pratique quotidienne, différentes techniques sont utilisables pour la recherche des anticorps anti-ENA : l'immunoprécipitation en milieu gélifié, l'ELISA, les techniques d'immunoempreintes (immunodot, immunotransfert) (34).

- Ces techniques peuvent être adaptées à un **dépistage global** des anticorps anti-ENA. Dans ce cas, la préparation antigénique est un **mélange d'antigènes** (soit un mélange d'antigènes purifiés soit un extrait de thymus ou de rate).

- Ces techniques peuvent également et surtout être adaptées à une **identification** des anticorps anti-ENA. Dans ce cas, les **antigènes purifiés ou recombinants** sont utilisés purs et non en mélange. L'association de plusieurs spécificités permet de définir des profils de réponse anticorps.

III.2.3.1- Immunodiffusion double d'Ouchterlony

a) Principe

La réaction est effectuée dans un gel d'agarose dans lequel ont été découpés des puits équidistants, en couronne, autour d'un puits central. La préparation antigénique (antigènes isolés ou mélanges d'antigènes extraits de thymus ou de rate humains ou animaux) est déposée dans le puits central, et les sérums à étudier dans les puits périphériques. Après diffusion (24 à 72 heures) à température ambiante, il y a formation d'un arc de précipitation, pour un rapport antigène-anticorps correspondant à la zone d'équivalence.

b) Résultats et interprétation

L'identification des arcs se fait par comparaison avec des sérums de référence connus (réaction d'identité totale, d'identité partielle ou de non-identité) (figure 6).

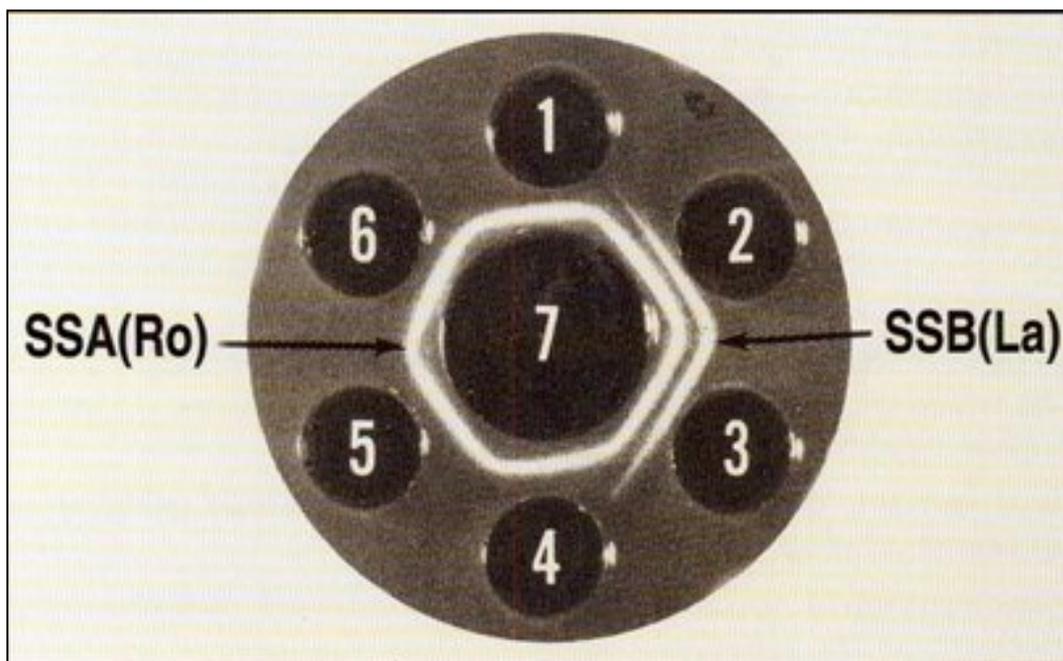


Figure 6 : Immunodiffusion double d'Ouchterlony pour la recherche et l'identification d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles.

Dans le puits central (n° 7) est déposée la préparation antigénique.

Dans les puits 1 et 5 : sérum de référence contenant des anticorps anti-SS A.

Dans le puits 3 : sérum de référence contenant des anticorps anti-SS A et anti-SS-B.

Dans les puits 4 et 6 : sérums testés contenant des anticorps anti-SS A (un arc de précipitation en réaction d'identité totale avec le sérum de référence).

Dans le puits 2 : sérum contenant des anticorps anti-SS A et anti-SS-B (deux arcs de précipitation en réaction d'identité totale avec les sérums de référence).

La lisibilité des arcs dépend du bon rapport entre les concentrations d'antigène et d'anticorps, le principal écueil de cette technique étant le phénomène de zone. La composition du gel, du tampon, la température et la durée d'incubation, la composition de l'extrait antigénique, sont également des facteurs importants influençant la qualité des résultats.

En théorie : à chaque couple antigène-anticorps correspond un arc de précipitation distinct. Plusieurs arcs peuvent être ainsi visualisés si le sérum contient plusieurs anticorps différents.

En pratique : deux anticorps différents peuvent parfois donner des arcs de précipitation superposés.

III.2.3.2- Contre-immunoelectrophorèse (CIE) ou électrosynérèse

a) Principe

Il s'agit d'une technique d'immunodiffusion double plus rapide que la précédente car la rencontre de l'antigène et de l'anticorps est accélérée par l'application d'un courant électrique. Elle est soumise aux mêmes contraintes méthodologiques que la technique d'Ouchterlony.

En dehors de la rapidité d'obtention des résultats, les performances analytiques de ces deux techniques sont comparables. La CIE reste cependant une technique artisanale, pratiquée par quelques centres spécialisés, et est peu utilisée en routine (il n'existe pratiquement pas de systèmes commercialisés).

III.2.3.3- Technique ELISA

a) Principe

Les techniques ELISA sont applicables à la recherche des anticorps anti-ENA et à leur identification. Les préparations antigéniques utilisées pour sensibiliser les puits peuvent être un mélange d'extraits nucléaires, des antigènes purifiés ou recombinants utilisés séparément ou en mélange.

b) Résultats et interprétation

Les résultats sont exprimés en unités arbitraires dont le mode de calcul dépend de la trousse utilisée. Parfois, les résultats sont qualitatifs et exprimés par rapport à la densité optique lue pour des témoins connus positifs et négatifs.

L'ELISA est une technique très sensible, mais pour laquelle il existe de très nombreuses causes d'erreur. Certains antigènes purifiés ne le sont que dans la description du fabricant. S'agissant de complexes macromoléculaires, certains épitopes conformationnels peuvent être perdus ou modifiés au cours des étapes de préparation de l'antigène. Lorsque ces antigènes sont obtenus par génie génétique, ces antigènes sont supposés purs. Ils expriment souvent les épitopes immunodominants de la protéine native, mais ils n'expriment pas toujours ceux liés à sa structure tridimensionnelle *in vivo* après glycosylation par exemple (s'ils sont préparés dans un système bactérien) ou liaison avec l'ADN ou l'ARN. L'absorption des protéines sur un support peut également entraîner des modifications dans la conformation de certains épitopes et donc influencer sur leur reconnaissance par les anticorps.

La qualité des résultats peut être influencée par des fixations non spécifiques sur le support, la présence dans le sérum de complexes immuns (Ig agrégées), de facteurs rhumatoïdes et/ou de cryoglobulines. Ces interférences peuvent en partie être décelées par l'utilisation en parallèle de puits non recouverts d'antigènes, ces contrôles n'étant malheureusement pra-

tiquement jamais proposés dans les différentes trousse commerciales (qui sont loin d'être équivalentes).

III.2.3.4- Immunodot

a) Principe

L'immunodot repose sur un principe voisin de l'ELISA, mais l'antigène (pur ou en mélange) est déposé dans ce cas sur une bandelette de nitrocellulose. Le sérum est mis en contact avec le support, et la fixation d'anticorps spécifiques est révélée avec un conjugué anti-Ig humaine marqué par une enzyme. Après addition du substrat de l'enzyme, la lecture de la coloration est effectuée à l'œil comparativement à des témoins négatifs et positifs. L'utilisation d'un lecteur (scanner) est possible.

b) Résultats et interprétation

Une réaction positive se caractérise par une coloration au niveau du dépôt de l'antigène. Une limite à l'interprétation de ces tests est liée à la subjectivité de la lecture visuelle, en particulier pour les faibles taux d'anticorps.

III.2.3.5- Immunotransfert

a) Principe

Les différents constituants d'une préparation antigénique sont séparés en fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Sur cette membrane est ensuite effectuée la réaction immunologique. Le sérum est mis en contact avec la membrane, et la fixation d'anticorps spécifiques est révélée avec un conjugué anti-Ig humaine marqué par une enzyme. Après addition du substrat de l'enzyme, la lecture de la coloration est effectuée à l'œil comparativement à des témoins négatifs et positifs. L'utilisation d'un lecteur (scanner) est possible.

b) Résultats et interprétation

La spécificité des anticorps est définie uniquement en fonction des masses moléculaires des protéines reconnues (exprimées en kDa), comparativement à des témoins de masse moléculaire.

Lors de la séparation électrophorétique, les protéines et les complexes macromoléculaires subissent une dénaturation. Certains épitopes peuvent ne plus être reconnus par les autoanticorps (antigène SS-A par exemple) ou bien donner lieu à la présence de plusieurs bandes différentes. À l'inverse deux antigènes différents peuvent avoir la même masse moléculaire (l'anticorps anti-SS-A et l'anticorps anti-Jo1 reconnaissent tous deux une protéine de 50 kDa). L'ensemble de ces constatations fait que l'interprétation de ces immunotransferts nécessite beaucoup de prudence.

D'autres techniques utilisent un système intermédiaire d'immunoempreinte qui consiste à déposer sur une membrane de nitrocellulose en des zones distinctes différents antigènes purifiés ou recombinants. Ceci évite les inconvénients liés à la dénaturation des protéines mais n'exclut pas les problèmes liés aux épitopes conformationnels des protéines natives

ou des complexes macromoléculaires. La subjectivité de la lecture peut être réduite par l'emploi d'un scanner permettant une mesure de l'intensité de la coloration des bandes comparativement à des bandes témoins positives et négatives. Le développement de ces techniques d'immunotransfert ou d'immunoempreinte présente l'avantage de pouvoir détecter des associations d'anticorps au cours de certaines maladies voire de définir des profils de réponse anticorps.

III.2.4- Anticorps anti-protéines de la membrane nucléaire

Ces autoanticorps peuvent reconnaître différents épitopes situés au niveau de protéines de la membrane nucléaire (en particulier lamines A, B, C ou récepteur de la lamine B) ou au niveau des pores nucléaires (protéines du complexe des pores, en particulier la gp 210) (figures 1 et 2).

La description de ces autoanticorps est récente et leur valeur diagnostique reste à définir. Ces autoanticorps sont, là encore, très hétérogènes, ils ne sont pas restreints à un épitope particulier au niveau d'une protéine donnée, mais peuvent reconnaître de nombreux épitopes différents (5).

Les anticorps anti-lamines A et C, les anticorps anti-lamine B ou les anticorps anti-lamine A sont observés au cours de diverses maladies autoimmunes, principalement au cours du LED ou au cours de l'hépatite autoimmune.

Les anticorps réagissant exclusivement avec la lamine C, et non avec la lamine A (ces deux protéines ayant une séquence primaire d'acides aminés très voisine) ont été décrits surtout chez les patients co-infectés par les virus des hépatites B et Delta.

Les anticorps anti-gp 210 et anti-récepteurs de la lamine B, lorsqu'ils sont présents, sont très évocateurs de la cirrhose biliaire primitive.

En pratique courante, les anticorps anti-protéines de la membrane nucléaire ou des pores nucléaires sont décelés à partir des tests d'IFI effectués sur coupe d'hépatocyte de rat ou culture de cellules HEp-2. Selon l'aspect de la fluorescence périnucléaire, on peut évoquer la présence d'anticorps anti-lamines (fluorescence régulière de la membrane nucléaire) ou la présence d'anticorps anti-gp 210 (fluorescence ponctiforme de la membrane nucléaire).

En fonction de ces aspects de fluorescence et du contexte clinique, la spécificité de ces anticorps peut être recherchée par des techniques immunoenzymatiques de type ELISA ou par immunoempreinte, utilisant des extraits membranaires ou des peptides recombinants.

Ces identifications ne sont pas encore de pratique courante, et sont réservées à quelques laboratoires spécialisés.

■ IV. CONCLUSION

Peu à peu, les méthodes d'étude des AAN ont évolué. Elles étaient initialement réservées à quelques laboratoires spécialisés, utilisant le plus souvent des techniques artisanales. La commercialisation des tests d'autoimmunité est récente, rendant leur réalisation accessible à de nombreux laboratoires: Il s'agit en fait d'une apparente facilité. En effet, l'absence de standardisation des techniques, la qualité très inégale des coffrets disponibles, l'absence de puits non sensibilisés dans la quasi-totalité des ELISA, la subjectivité des lectures, les incertitudes concernant la préparation et la reconnaissance de certains épitopes (en particulier conformationnels), sont à l'origine d'une grande disparité des résultats inter- et intra-laboratoires.

L'étude des AAN nécessite une démarche diagnostique dichotomique guidée par la symptomatologie clinique et conditionnée par les performances analytiques des tests mis en œuvre. Cette démarche diagnostique n'est pas standardisée à l'heure actuelle.

La mise en place de recommandations analytiques de base, communes aux différents laboratoires, d'un contrôle de qualité, et d'une standardisation des tests est urgente pour améliorer la fiabilité des résultats et permettre le suivi des patients dans le cadre de maladies souvent graves, évolutives, et pour lesquelles les décisions thérapeutiques ne sont pas anodines.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- MARGRAVES M.M., RICHMOND H., MORTON R., Presentation two bone marrow elements : « tart » cell and « L.E. » cell. Proc. Staff Meet. Mayo Clin.1948 ; 23 : 25-8.
- 2- FRIOU G.J., Clinical application of lupus sérum nucleoprotein réaction using fluorescent antibody technique. J. Clin. Invest. 1957; 36 : 890-4.
- 3- SELIGMANN M., Mise en évidence dans le sérum de malades atteints de lupus érythémateux disséminé d'une substance déterminant une réaction de précipitation avec l'acide désoxyribonucléique. Compt. Rend: Acad. Sci.1957 ; 245 : 243-5.
- 4- GILBERT D., JOUEN-BEADES F., BRARD F., JOVELIN F., TRON F., Autoanticorps anti-nucléaires. Méd. Thérap.1996 ; 2 : 479-87.
- 5- WORMAN H.J. & COURVALIN J.C., Autoantibodies against nuclear envelope proteins in liver disease. Hepatology 1991;14 :1269-79.
- 6- CRAFT J.E., Anti-snRNP antibodies. In : Wallace D.J., Hahn B.H., Eds. Dubois'lupus erythematosus. 5th ed. Baltimore : Williams & Wilkins,1997 ; 457-69.
- 7- FELTKAMP T.E.W., Antinuclear antibody determination in a routine laboratory. Ann. Rheum. Dis. 1996 ; 55 : 723-7.
- 8- HOLLIGSWORTH P.N., PHIL D., PUMMER S.C., DAWKINS R.L., Antinuclear antibodies. In : Peter J.B., Shoenfeld Y. (Eds), Autoantibodies, Elsevier Science B. V., Amsterdam,1996.
- 9- ABUAF N., PROST A.C., ROUQUETTE-GALLY A.M., BEDDA N., FERMANIAN J., HOMBERG J.C., Comparaison cellules tumorales humaines (HEp-2) et foie de

rat pour la détection des anticorps anti-nucléaires en immunofluorescence indirecte. *Ann. Biol. Clin.* 1984 ; 42: 363-9.

10- FRITZLER M.J., MILLER B.J., Détection of autoantibodies to SS-A/Ro by indirect immunofluorescence using a transfected and overexpressed human 60 kD Ro autoantigen in HEP-2 cells. *J. Clin. Lab. Anal.* 1995 ; 9 : 218-24.

11- TAN E.M., FELTKAMP T.E.W., SMOLEN J.S., BUTCHER B., DAWKINS R., FRITZLER M.J., CORDON T., HARDIN J.A., KALDEN J.R., LAHITA R.G., MAINI R.N., MCDOUGAL J.S., RUTHFIELD N.F., SMEENK R.J., TAKASAKI Y., WIJK A., WILSON M.R., KOZIOL J.A., Range of antinuclear antibodies in « healthy » individuals. *Arthritis Rheum.* 1997 ; 40 :1601-11.

12- MONCE N.M., CAPPEL V.L., SAQUETON C.B., A comparison of two fixatives on IFA HEP-2 slides for the détection of antinuclear antibodies. *J. Immunoassay* 1995 ; 15:55-68.

13- ABUAF N., CHYDERIOTIS G., KEROS L., ROUQUETTE A.M., SERVAIS G., VAN DE STADT R.J., STROKES R., Étude européenne multicentrique, Comparaison de la sensibilité des lames HEP-2 avec des sérums contenant des anticorps SSA/Ro. *Option/ Bio* 1998 ; 220 (suppl.) : 7-11.

14- FELTKAMP T.E.W., Titration of conjugates. In: Holborow E.J. (Ed), *Standardization in immunofluorescence*, Blackwell, Oxford, 1970, pp. 189-91.

15- FELTKAMP T.E.W., KLEIN F., JANSSENS M.B.J.A., Standardization of the quantitative determination of antinuclear antibodies (ANA) with a homogeneous pattern. *Ann. Rheum. Dis.* 1988 ; 47 : 906-9.

16- SMOLEN J.S., BUTCHER B., FRITZLER M., CORDON T., HARDIN J., KALDEN J.R., Reference sera for antinuclear antibodies: II. Further definition of antibody specificities in international antinuclear antibody reference sera by immunofluorescence and western blotting. *Arthritis Rheum.* 1997 ; 40 : 413-8.

17- HAHN B.H., Antibodies to DNA. *N. Engl. J. Med.* 1998 ; 338:1359-68.

18- HAHN B.H., T SAO B.P., Antibodies tu DNA. In : Wallace D.J., Hahn B.H., Eds. *Dubois'lupus erythematosus*. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997 : 407-22.

19- PINCUS T., Immunochemical conditions affecting the measurement of DNA antibodies using ammonium sulfate precipitation. *Arthritis Rheum.* 1971;14 : 623-30.

20- AARDEN L.A. DE GROOT E.R., FELTKAMP T.E.W., Immunology of DNA. III. *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the determination of ante-ds DNA with the immunofluorescent technique. *Anil. NY Acad. Sci.* 1975 ; 254 : 505-15.

21- PREUD'HOMME J.L., DANON F., ROCHARD E., GODET D., TOUCHARD G., AUCOUTURIER P., ALCALAY M., Détection des anticorps ante-ADN natif de classes IgG, IgA et IgM par ELISA, comparaison avec le test de Farr et l'immunofluorescence indirecte. *Presse Med.* 1988 ;17 :1401-4.

22- PREUD'HOMME J.L., ROCHARD E., GODET E., DANON F., ALCALAY M., TOUCHARD G., AUCOUTURIER P., Isotypic distribution of ante-double stranded DNA antibodies. A diagnostic evaluation by enzyme-linked immunosorbent assasy. *Diagn. Clin. Immuno.* 1988 ; 5 : 256-61

- 23- QUISMORIO F.P., Clinical application of serologic abnormalities in systemic lupus erythematosus. In : Wallace D.J., Hahn B.H., Eds. Dubois'lupus erythematosus. 5th ed. Baltimore : Williams & Wilkins,1997 : 925-42.
- 24- YOUINOU P., LE GOFF P., SARAUX A., Pratique et interprétation des examens biologiques dans les maladies systémiques. In : Kahn M.F., Peltier A.P., Meyer O., Piette J.C. (eds). Les maladies systémiques. Paris : Flammarion Médecine-Science, 4^e édition 1998.
- 25- BORG E.J., HORST G., HUMMEL E.J., LIMBURG P.C., KALLENBERG C.G.M., Measurement of increases in ante-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus : a long-term, prospective study. Arthritis Rheum.1990 ; 33 : 634-43.
- 26- HARDIN J.A., THOMAS J.O., Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus : localization of prominent autoantigens on histones H1 and H2B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983 ; 80 : 7410-4.
- 27- EPSTEIN A., BARLAND P., The diagnosis value of antihistone antibodies in druginduced lupus erythematosus. Arthritis Rheum.1985 ; 28 :158-62.
- 28- AMOURA Z., CHABRE H., KOUTOUZOV S., LOTTON C., CABRESPINES A., BACH J.F., JACOB L., Nucleosome-restricted antibodies are detected before ante-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/+ mice and are present in kidney eluates. Arthritis Rheum.1994 ; 37 :1684-8.
- 29- CHABRE H., AMOURA Z., PIETTE J.C., GODEAU P., BACH J.F., KOUTOUZOV S., Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum.1995 ; 38 :1485-9.
- 30- BURLINGAME R.W., RUBIN R.L., Subnucleosome structures as substrates in enzyme-linked immunosorbent assays. J. Immunol. Methods 1990 ;134 :187-99.
- 31- HERREMAN G., SAUVAGET T., GENEREAU T., GALEZOWSKI N., Blocs auriculo-ventriculaires congénitaux et maladies autoimmunes maternelles. Ann. Med. Intern. 1990 ; 141 : 234-8.
- 32- SANCHEZ-GUERRERO J., LEW R.A, FOSSEL A. H., SCHUR P. H., Utility of ante-Sm, ante-RNP, ante-Ro/5SA and ante-La/SSB extractible nuclear antigens-detectable by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum.1996 ; 39 :1055-61.
- 33- RIEMEKASTEN G., MARELL J., TREBELJAHR G., KLEIN R., HAUSDORF G., HAUPL T., SCHNEIDER-MERGENER J., BURMESTER G.R., HIEPE F., A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest. 1998 ;102 : 754-63.
- 34- BRIDGES A.J., LORDEN T.E., HAVIGHURST T.C., Autoantibody testing for connective tissue diseases. Comparison of immunodiffusion, immunoblot, and enzyme immunoassay. Am. J. Clin. Pathol. 1997 ;108 : 406-10.

EGOPRIM

30/32 rue du Couëdic - 75014 Paris

Février 1999

Dépôt légal mars 1999

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| N° 1 : <i>HÉMATOLOGIE</i> | N° 15 : <i>DÉPISTAGE</i> |
| N° 2 : <i>IMMUNOANALYSE</i> | <i>DE LA TRISOMIE 21</i> |
| N° 3 : <i>PARASITOLOGIE</i> | N° 16 : <i>IMMUNO-ALLERGIE (2)</i> |
| N° 4 : <i>BACTÉRIOLOGIE</i> | N° 17 : <i>VIRUS DES HÉPATITES</i> |
| N° 5 : <i>HORMONOLOGIE</i> | <i>A (VHA) et E (VHE)</i> |
| <i>GAZOMÉTRIE</i> | N° 18 : <i>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</i> |
| N° 6 : <i>G.B.E.A.</i> | <i>TOME II</i> |
| N° 7 : <i>IMMUNO-ALLERGIE (1)</i> | N° 19 : <i>VAGINITES ET VAGINOSES</i> |
| N° 8 : <i>HÉMOGLOBINES GLYQUÉES</i> | N° 20 : <i>HÉMOSTASE ET THROMBOSE</i> |
| <i>LIPIDES</i> | N° 21 : <i>VIRUS DES HÉPATITES</i> |
| N° 9 : <i>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</i> | <i>B (VHB), DELTA (VDH),</i> |
| <i>TOME I</i> | <i>C (VHC), AUTRES</i> |
| N° 10 : <i>HÉMATOLOGIE</i> | N° 22 : <i>SYNDROME</i> |
| <i>CAS ILLUSTRÉS</i> | <i>DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES</i> |
| N° 11 : <i>AMIBES ET FLAGELLÉS</i> | N° 23 : <i>PARASITES SANGUINS</i> |
| <i>INTESTINAUX</i> | N° 24 : <i>BIOCHIMIE PEDIATRIQUE</i> |
| N° 12 : <i>LES MALADIES A PRIONS</i> | N° 25 : <i>LES MOISSISSURES</i> |
| N° 13 : <i>AUTOIMMUNITÉ</i> | <i>D'INTÉRÊT MÉDICAL</i> |
| <i>ET AUTOANTICORPS</i> | |
| N° 14 : <i>L'EXPLORATION</i> | |
| <i>DE LA THYROÏDE</i> | |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m. privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A., et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes. (S.d.B., S.N.M.B., et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privés et hospitaliers, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros, ou épuisés en version papier, seront disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net à partir de 2002.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6 500 exemplaires.