

Stratégie de dépistage des anticorps anti-nucléaires (ANA)

La classification des maladies auto-immunes (MAI) distingue les maladies spécifiques d'organes (comme le diabète de type I, la thyroïdite auto-immune, les hépatites auto-immunes (HAI),...) et les maladies auto-immunes non spécifiques d'organes dites systémiques, parmi lesquelles les connectivites (comme le lupus érythémateux systémique (LES), le syndrome de Gougerot-Sjögren (SS), la sclérodermie, la dermatomyosite, la polymyosite ou la polyarthrite rhumatoïde (PR), ...) et les vascularites à ANCA.

Comment détecter en pratique des auto-anticorps anti-nucléaires (ANA) ?

Leur détection repose sur une démarche en cascade : toute recherche d'ANA commence par un dépistage par immunofluorescence indirecte (IFI), puis, si le dépistage est positif, il se poursuit par une étape d'identification dont l'objectif est la caractérisation du ou des antigènes cibles reconnus par l'ANA dépisté.

La recherche des ANA s'effectue par IFI sur cellules HEp-2, cellules épithéliales humaines, directement cultivées sur lame, provenant d'une lignée de cellules cancéreuses trachéales, avec de gros noyaux activés comprenant de multiples antigènes nucléaires et cytoplasmiques.

De nombreuses préparations commerciales sont disponibles, parmi lesquelles une particulière, avec lames transfectées pour le gène SSA/Ro 60 kDa, qui surexpriment cet antigène (HEp-2000®). Bien que de nouvelles techniques Elisa aient été développées ces dernières années, et que l'avenir soit certainement à des techniques automatisées, standardisées et miniaturisées utilisant les principes de la protéomique, l'IFI reste actuellement la méthode de référence et imposée par la NABM, pour la détection des ANA.

Étape de dépistage des ANA par IFI sur cellules HEp-2

La dilution "seuil" en dépistage n'est pas standardisée. Habituellement, elle est de 1/80^e ou 1/100^e. La négativité des ANA

en dépistage est en défaveur d'une connectivite. Leur positivité suggère l'existence d'un terrain auto-immun : connectivite ou autre MAI spécifique d'organes (cirrhose biliaire primitive (CBP), HAI). Mais ils peuvent être retrouvés au cours d'une pathologie inflammatoire, infectieuse (notamment infections par EBV, VHB, VHC, HIV, coxsackie ou VZV), tumorale (leucémie lymphoïde chronique, lymphome), être induits par des médicaments (bêta-bloquants, anti-TNF alpha...) ou être détectés chez le sujet sain.

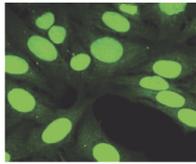
Lorsque les ANA sont positifs, il faut déterminer l'aspect de la fluorescence du noyau (+/- cytoplasmique, renseignée en commentaire) et déterminer le titre par dilutions successives du sérum.

Les aspects de fluorescence sont nombreux :

- fluorescence nucléaire homogène, membranaire, mouchetée (gros grains, grains fins), centromères, nucléolaire, dots nucléaires (dots multiples, 4-6 dots), hétérogène, fuseau mitotique, mixte.
- fluorescence cytoplasmique : grains fins des anti-synthétases, ribosomes, SRP, réticulum endoplasmique, lysosomes, peroxysomes, endosomes, golgi, mitochondries, actine, vimentine, tubuline.

Principaux aspects de fluorescence :

Fluorescence de type homogène



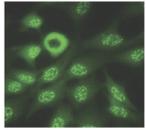
- ✓ Ac anti-ADNn
- ✓ Ac anti-histones
- ✓ Ac anti-nucléosomes

↓

- > LES
- > Lupus induits
- > Polyarthrite rhumatoïde
- > Arthrites juvéniles chroniques
- > Sclérodermie systémique

Fluorescence de type moucheté

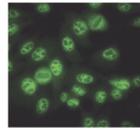
Gros grains



- ✓ Ac anti-RNP
- ✓ Ac anti-Sm

- LES
- Connectivite mixte (syndrome de Sharp)
- SS
- Sclérodermie
- Syndrome de Raynaud

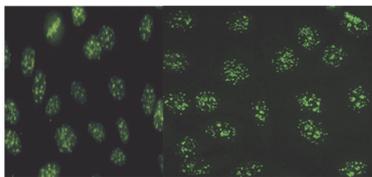
Grains fins



- ✓ Ac anti-SSA/Ro 60, 52
- ✓ Ac anti-SSB/La
- ✓ Ac anti-ARN polymérase II et III
- ✓ Ac anti-Mi 2

- LES
- Lupus cutané sousaigu
- Lupus néonatal
- SS
- Sclérodermie
- Dermatomyosite

Fluorescence de type centromères



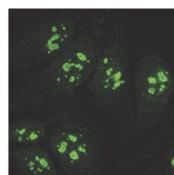
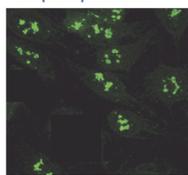
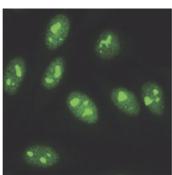
- ✓ Ac anti-centromères (A, B, C, D, E, F)

- Dans 50 à 98% des syndromes CREST (Calcinose sous-cutanée, syndrome de Raynaud, dysmobilité Oesophagienne, Sclérodactylie, Télangiectasies)
- Syndrome de Reynolds (association CREST + Cirrhose Biliaire Primitive)
- Dans 20 à 40% des sclérodermies systémiques
- Syndrome de Raynaud
- LES
- SS

Fluorescence nucléolaire (1)

Différents aspects de fluorescence nucléolaire sont décrits mais restent difficiles à distinguer en pratique :

- ✓ Aspect homogène
- ✓ Aspect granulaire
- ✓ Aspect moucheté fin
- ✓ Aspect ponctué



Fluorescence nucléolaire pure

Fluorescence nucléolaire associée à d'autres aspects de fluorescence

Etape d'identification : caractérisation des anti-gènes cibles

Elle est habituellement effectuée à partir d'une positivité des ANA $\geq 1/160^e$ (mais le débat reste ouvert) et comporte la recherche des Ac anti-ADN natif et celle des Ac anti-antigènes nucléaires solubles (ENA).

Les Ac anti-ADN natif (ou ADN bicaténaire ou ADN double brin ou *double stranded DNA* ou ds DNA) sont spécifiques du lupus (ils font partie des 11 critères diagnostiques, selon l'*American College of Rheumatology*).

Les Ac anti-ADN dénaturé (ou monocaténaire ou ADN simple brin ou *simple stranded DNA* ou ss DNA) sont sans intérêt diagnostique ni pronostique.

Pour l'identification des Ac anti-ADN natif, 4 groupes de méthodes de dosage sont disponibles, différant par la nature de l'ADN utilisé (purifié, recombinant), les isotypes (IgG, IgM) et l'avidité des anticorps détectés : test de Farr, IFI sur frottis de *Crithidia luciliae*, Elisa et technologie Luminex®. Peu importe la technologie utilisée, ses caractéristiques doivent être connues.

Pour l'identification des Ac anti-ENA, dont les principaux antigènes solubles et cytoplasmiques identifiés en routine sont Sm, RNP, SSA/Ro 60, SSA/Ro 52, SSB/La, Scl70, CENP-B, JO1 +/- PCNA, PM/Scl, Ku, Mi 2, ribosome P, les techniques disponibles sont l'immunodiffusion double d'Ouchterlony, l'Elisa, l'immunodot et la technologie Luminex®.

La dénomination des Ac anti-ENA utilise plusieurs références : deux 1^{er} lettres du nom du 1^{er} malade chez lequel l'Ac a été trouvé (SM pour Smith, Ku, Mi, La, Ro), nature de l'affection au cours de laquelle l'Ac est le plus souvent rencontré (SS pour Sjögren Syndrome), nature de l'antigène reconnu (RNP pour ribonucléoprotéine) ou phénomène observé en immunodiffusion sur gel "précipitating line" : PL (PL7, PL12).

Intérêt clinique des anticorps anti-SSA/RO 52 kDa ou anti-TRIM 21

Ils sont fréquemment associés avec les Ac anti-SSA/Ro 60 kDa, parfois avec les anticorps anti-JO1 ; au cours des CBP, ils auraient un intérêt pronostique. De nombreuses techniques détectent ces Ac, mais ils semblent avoir un intérêt clinique limité.

Fréquence des principaux ANA au cours du LES

Anticorps spécifiques

- Anti-ADN natif : 70-95%
- Anti-Sm (caucasiens) : 5-10%
- Anti-nucléosomes : 40-75%
- Anti-PCNA : 10-43%

Anticorps non spécifiques

- Anti-histones : 30-70%
- Anti-U1 RNP : 20-40%
- Anti-SSA/Ro 60 : 20-90%
- Anti-SSB/La : 10-70%
- Anti-ribosomes : 10%

Auto-anticorps et manifestations cliniques au cours du LES

- anti-ADN natif
- anti-Sm
- anti-U1 RNP
- anti-SSA
- anti-SSB
- anti-ribosomes

- Néphropathie
- Néphropathie
- Phénomène de Raynaud, myosite
- Photosensibilité-lésions cutanées, syndrome sec
- Photosensibilité-lésions cutanées, syndrome sec
- Atteintes neurologiques centrales et hépatiques

L'absence d'auto-anticorps n'exclut pas le diagnostic de MAI, pour différentes raisons : au début d'une affection les anticorps peuvent manquer et apparaître par la suite ; les auto-anticorps ne sont pas constants au cours d'une MAI ; chez un malade avec un déficit en immunoglobulines, ils peuvent être non détectables. En suivi thérapeutique, seuls les Ac anti-ADN natif ont un intérêt.

Carole Emile, d'après une communication de Stéphanie François, Biomnis Paris

