

Comment rechercher les auto-anticorps ? Choix et performances des méthodes

René-Louis Humbel^a

1. Introduction

De nombreuses méthodes sont utilisées pour la recherche des auto-anticorps.

Elles consistent à visualiser l'interaction de l'auto-anticorps à rechercher avec son antigène cible à l'aide d'un anticorps anti-immunoglobulines humaines (conjugué) marqué par un fluorochrome, une enzyme, un isotope radioactif ou un luminogène. L'immunofluorescence indirecte (IFI) sur des préparations cellulaires ou coupes de tissus est le plus souvent une technique de dépistage, les techniques immunoenzymatiques, radio-immunologiques, fluorimétriques ou la chimiluminescence permettront d'identifier la cible des auto-anticorps dépistés mais aussi de rechercher des auto-anticorps de façon directe et spécifique.

2. L'immunofluorescence indirecte

L'IFI est la technique la plus utilisée en routine. Elle permet de mettre aisément en évidence un grand nombre d'anticorps. Les anticorps antinucléaires (ANA) sont recherchés en bloc sur des cultures de cellules HEP-2, alors que pour les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires (ANCA pour antineutrophil cytoplasmic antibodies) le substrat est un étalement de granulocytes humains. Les auto-anticorps spécifiques d'organes sont recherchés à l'aide des coupes de tissus de rongeurs ou de primates, ces derniers sont obligatoires pour un certain nombre d'auto-anticorps comme les anticorps anti-membrane basale glomérulaire et les anticorps anti-myéline du nerf périphérique.

L'aspect de la fluorescence au niveau de la cellule ou du tissu est en général fortement évocateur de la nature de l'antigène cible reconnu par les anticorps. Dans certains cas il est suffisamment caractéristique pour être attribué sans ambiguïté à une spécificité particulière, c'est le cas, par exemple, des anticorps anti-centromères. Mais dans la plupart des cas l'IFI ne permet pas à elle seule de déterminer la cible des anticorps qui doit être identifiée

grâce à des méthodes spécifiques. La fluorescence sur cellules HEP-2 peut se révéler très faible pour certains ANA et/ou variable selon les préparations commerciales (anticorps anti-SS-A [Sicca Syndrom antigen A], -Jo-1, -HMGCR [3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA Reductase], -MDA5 [melanoma differentiation antigen associated 5]). L'interprétation est également compliquée si des anticorps de spécificité différente coexistent dans le sérum examiné. Dans le lupus systémique, le sérum contient souvent plusieurs anticorps, à des titres très élevés, associant des anticorps anti-nucléosome, anti-ADN, -PCNA [proliferating cell nuclear antigen], -SS-A, -Sm donnant en immunofluorescence sur le noyau des cellules HEP-2 une image uniformément homogène (« un auto-anticorps peut en cacher un autre »). Seule une recherche d'un large panel d'auto-anticorps permettra de mettre en évidence les différentes spécificités. Certains auto-anticorps peuvent marquer une structure spécifique dans un tissu, mais correspondre à des identités différentes présentes dans la même structure. Ainsi, les anticorps anti-peau qui marquent la substance intercellulaire sur les coupes d'œsophage de singe peuvent correspondre à des spécificités très différentes comme la desmogléine 1, la desmogléine 3 ou la desmoplakine. L'identification des anticorps est très importante car ils correspondent à des affections différentes (pemphigus foliacé pour la desmogléine 1, pemphigus vulgaire pour la desmogléine 3 et pemphigus paranéoplasique pour la desmoplakine). L'immunofluorescence sur coupes d'organes ne permet pas la mise en évidence de certains auto-anticorps importants (**tableau I**). Ceux-ci doivent donc obligatoirement être recherchés par les méthodes spécifiques.

Il existe enfin une série d'auto-anticorps détectés par immunofluorescence mais pour lesquels nous ne disposons pas encore de méthodes ni de réactifs pour leur identification en routine. C'est le cas notamment pour les anticorps anti-ovaire et anti-testicule qui ne peuvent être recherchés que par immunofluorescence sur coupes d'organes. Il existe aussi de nombreux ANA ou anticorps anticytoplasmiques, décelés par immunofluorescence sur les cellules HEP-2, pour lesquels il n'existe pas de méthodes d'identification. Depuis peu, un certain nombre d'auto-anticorps peuvent être recherchés et identifiés par IFI sur des cellules transfectées. L'expression, *in vitro*, d'auto-antigènes a trouvé un domaine important dans la recherche des auto-anticorps dirigés contre des protéines membranaires difficiles voire impossibles à purifier. Ces cellules se sont en particulier révélées utiles pour la mise en évidence des anticorps anti-membrane neuronale et synaptique (récepteurs et canaux ioniques).

^a Luxembourg

4, ancienne Côte d'Eich
L-1459 Luxembourg

* Correspondance

rlhumbel@pt.lu

Tableau I: Liste d'auto-anticorps ne pouvant pas être détectés par la technique de recherche classique d'immunofluorescence et méthodes à utiliser.

Anticorps anti-	Méthodes - ELISA, FIA, Dot-	Méthodes radio-immunologiques (RIA)	Immuno-fluorescence sur cellules transfectées
SLA	+	-	+
Facteur intrinsèque	+	+	-
Protéines citrullinées	+	-	-
Phospholipides	+	-	-
Gangliosides	+	-	-
Cochlée (Po)	+	-	-
Rétine (Récovérine)	+	-	-
PLA2R	+	-	+
Récepteurs TSH	+	+	-
Récepteurs glutamate	-	-	+
Récepteurs GABA	-	-	+
Récepteurs glycine	-	-	+
Récepteurs acétylcholine	+	+	-
MuSK	+	+	-
Canaux potassiques	-	+	-
Canaux calciques	-	+	-

ELISA: enzyme linked immunoassay; FIA: fluorescence enzyme immunoassay; GABA: acide gamma-aminobutyrique; MuSK: Muscle Specific Kinase; PLA2R: Phospholipase A2 receptor; SLA: Soluble Liver Antigen; TSH: ThyroStimulating Hormone

Tableau II: Principaux éléments intervenant dans les méthodes de recherche des auto-anticorps

ANTIGÈNE		
Naturel	Extrait de tissus humains	Structure
	Extrait de tissus animaux	Conformation
Recombinant	Exprimé sur procaryote	Structure
	Exprimé sur eucaryote	Structure
Synthétique	Chimique	Structure
		Composition
PRÉSENTATION		
Immobilisation		
- directe	Cupule polystyrol Membrane de nitrocellulose Microbilles de latex Lames de verre activées	Quantité Stabilité Orientation moléculaire Densité des épitopes Accessibilité
- assistée	Via un monoclonal (CAPTURE) Antigène biotinylé capté sur l'avidine (ANCOR)	
CONDITIONS RÉACTIONNELLES		
Tampon	Molarité, pH, additifs	
Incubation	Durée, température	
CONJUGUE		
Anti-sérum	Spécificité	IgG, IgA, IgM
	Sélectivité	IgG1, 2, 3, 4
Protéine A	Sélectivité	IgG1, 2, 4 (pas IgG3)

3. Les techniques immunoenzymatiques

À l'heure actuelle, la recherche et l'identification des auto-anticorps sont réalisées le plus souvent par des méthodes immunoenzymatiques (ELISA et/ou immunodots) de plus en plus automatisées. Leurs performances analytiques sont variables, dépendant de la nature des nombreux réactifs commerciaux utilisés et de l'environnement technique propre à chacune d'elles. Il est donc très important pour le biologiste de connaître tous les détails de chaque test, ce qui est mesuré et de quelle manière, pour orienter son choix de méthode et interpréter les résultats. Il est en effet de sa responsabilité de consulter les fiches techniques des trousse de réactifs et d'exiger des fabricants de kits les détails techniques nécessaires au rendu des résultats, en particulier en ce qui concerne la nature et la qualité de l'antigène dont dépendent la sensibilité et la spécificité de la technique utilisée (*tableau II*).

3.1. L'importance de l'antigène utilisé

La nature de l'antigène utilisé est très importante, trois types sont généralement employés.

3.1.1. Les antigènes naturels

Les antigènes naturels sont obtenus par extraction de tissus humains ou animaux. Les antigènes d'origine animale présentent généralement une homologie avec les antigènes humains et peuvent être utilisés. C'est le cas pour les préparations de nucléosomes, d'ADN, d'histones, RNP (ribonucléoprotéines), mais aussi pour les gangliosides. Il existe cependant quelques exceptions. Ainsi les anticorps anti-glycoprotéine MAG (*myelin associated glycoprotein*) de la myéline présentent une réactivité maximale avec la MAG humaine, mais moindre avec la MAG bovine et nulle avec la MAG de rat. De nombreux auto-antigènes sont constitués de complexes multimoléculaires au sein desquels se trouvent les composants antigéniques. Ces constituants sont sélectionnés pour la réalisation des tests. Les résultats du test dépendent du choix de ce composant. La molécule native du complexe peut présenter des épitopes spécifiques liés à l'association avec certains constituants. Le nucléosome présente un néo-épitope formé par l'association de l'ADN et des histones du core.

La nature et la configuration moléculaire de l'antigène sont des éléments majeurs pour la réaction avec l'auto-anticorps. Certains auto-anticorps ne reconnaissent

que des déterminants antigéniques conformationnels, c'est-à-dire liés à la structure quaternaire de l'antigène. La dénaturation ou la déformation de la molécule conduisent à la perte de reconnaissance de l'antigène par les anticorps. Mais c'est surtout le procédé d'immobilisation de l'antigène sur les surfaces solides qui peut entraîner des modifications structurales. À l'adsorption passive des molécules sur les supports de polystyrol et les membranes de nitrocellulose s'est substituée une fixation covalente sur les microbilles. Aucun de ces procédés ne permet une orientation moléculaire conformationnelle. Les auto-anticorps associés au diabète auto-immun ne reconnaissent que les formes natives conformationnelles de la GAD (Glutamic Acid Decarboxylase), de l'IA2 (Islet Antigen-2) et de l'insuline. Ils ne peuvent donc pas être recherchés par les ELISA et dots classiques.

De nouveaux procédés respectant la conformation moléculaire des antigènes ont été développés. Elles sont basées sur :

- la capture de l'antigène sur un anticorps monoclonal préalablement adsorbé sur le support.

Un inconvénient provient du fait que si l'auto-anticorps reconnaît un épitope spécifique également reconnu par le monoclonal, cette compétition peut exposer à un résultat négatif,

- l'utilisation d'un antigène préalablement couplé à la biotine et qui se fixe sur la streptavidine du support. Ces procédés sont utilisés pour la recherche des anticorps anti-PR3 (proteinase 3). La molécule de PR3 porte plusieurs épitopes dont la reconnaissance est hétérogène et varie fortement chez les malades traités. Cela explique les différences notables observées avec les ELISA classiques, ELISA capture et ELISA Ancor. Les méthodes utilisant les antigènes biotinylés sont mises en œuvre pour la recherche des anticorps anti-GAD, -IA2, -aquaporine 4, -MuSK (Muscle-Specific Kinase) en particulier.

L'antigénicité de certaines molécules augmente fortement après polymérisation. Les auto-anticorps anti-actine, associés à l'hépatite auto-immune, réagissent fortement avec l'actine polymérisée (Actine-F) alors qu'ils ne reconnaissent pas les monomères d'actine (Actine-G). Dans certaines molécules les déterminants antigéniques peuvent être inaccessibles parce que ceux-ci sont enfouis au sein de complexes multiprotéiques. Une dénaturation est alors nécessaire pour permettre l'accès aux anticorps. C'est le cas pour les anticorps anti-membrane basale glomérulaire qui réagissent avec un épitope présent sur le collagène IV mais qui n'est accessible qu'après dissociation du complexe de la membrane basale ainsi que de celle de l'hexamère natif du collagène IV.

Des néo-antigènes sont formés par l'association de l'antigène original avec d'autres molécules. La lactoferrine est très peu antigénique mais, après association avec de l'ADN, elle forme un complexe qui est reconnu par les auto-anticorps associés à la rectocolite hémorragique. Certains malades traités par injection d'héparine développent des anticorps contre un néo-épitope formé par le complexe héparine-facteur plaquettaire 4.

3.1.2. Les antigènes recombinants

Les antigènes recombinants sont de plus en plus utilisés pour la recherche des auto-anticorps. Les antigènes obtenus par génie génétique, malgré leur pureté, ne sont pas totalement identiques aux antigènes naturels. Les protéines exprimées par le système procaryote (*Escherichia coli*) ne subissent pas de repliement moléculaire ni de modifications post-traductionnelles. Le système d'expression sur cellules eucaryotes permet de produire des protéines structurellement de meilleure qualité. Ils ne peuvent cependant pas remplacer dans tous les cas les molécules natives. Les antigènes recombinants ne peuvent, par exemple, pas être utilisés pour la recherche des anticorps anti-PR3 et anti-MPO (myéloperoxydase).

3.1.3. Les peptides/antigènes de synthèse

Des antigènes de synthèse sont également utilisés dans certains tests. Il s'agit surtout de peptides synthétiques formés par de courtes séquences d'acides aminés correspondant à la région antigénique immunodominante :

- un peptide correspondant à la région amino-terminale de la titine (MET 30) est utilisé à la place de la protéine native dont l'énorme taille moléculaire empêche l'utilisation,

- un tri-peptide correspondant aux régions immunodominantes des trois cétoacides déhydrogénases est un substrat employé pour la recherche des anticorps anti-mitochondries,

- des peptides synthétiques modifiés par remplacement d'un résidu d'arginine par un résidu de citrulline sont les antigènes largement utilisés pour la recherche des anticorps anti-protéines/peptides citrullinés (ACPA/CCP) pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde. La réactivité de ces peptides est variable, dépendant du nombre de résidus citrullinés, de leur position et du type des autres acides aminés qui les entourent.

3.2. L'importance des conditions techniques

Les conditions techniques dans lesquelles la réaction antigène - auto-anticorps est analysée influent également sur la performance des tests :

- la composition du tampon d'incubation est importante. La molarité de la solution peut influencer

- sur l'avidité des anticorps. Un tampon hypermolaire est utilisé dans certaines méthodes pour la mesure des anticorps anti-ADN de haute avidité (Farrzyme®, Bioplex®),

- l'addition de certaines substances est essentielle pour éviter « les fausses fixations »,

- la réduction notable de la durée de réaction sur les automates peut influencer la détection de certains auto-anticorps de faible avidité,

- la spécificité du conjugué est importante à connaître. Si la plupart des auto-anticorps appartiennent à la classe des IgG, certains sont de classe IgM (MAG, mitochondrie) ou de classe IgA (-transglutaminase tissulaire). Enfin il faut garder à l'esprit que certains auto-anticorps appartiennent majoritairement à une

sous-classe des IgG (IgG 4 pour les anti-PLA2R [Phospholipase A2 Receptor] et anti-MuSK, IgG2 pour les anti-phospholipides), ce qui implique une vérification de la spécificité du conjugué.

4. Les autres méthodes

Les performances de ces méthodes sont également tributaires de la nature et de la qualité des sources antigéniques utilisées tout comme de leur environnement technique propre.

La fluorimétrie en flux (technologie Luminex[®]) dérivée de la cytométrie en flux peut être utilisée pour rechercher des panels d'anticorps définis par les firmes mais pas forcément prescrits.

La chimiluminescence permet l'obtention de résultats rapides au coup par coup.

Les méthodes radioimmunologiques, en phase liquide ou solide, sont utilisées pour la recherche de certains auto-anticorps très particuliers. Elles sont indispensables pour la recherche des auto-anticorps anti-récepteurs membranaires (récepteurs de l'acétylcholine, MuSK) et des anticorps anti-canaux ioniques (potassiques, calciques).

5. Conclusion

Une variété de techniques et de réactifs sont à la disposition des laboratoires pour la recherche des auto-anticorps. Cependant l'utilisation de ces méthodes et l'interprétation des résultats ne sont pas toujours aussi simples qu'il puisse y paraître. L'objectif de cette revue a été de faire un rappel sur les caractéristiques de ces différents procédés.

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