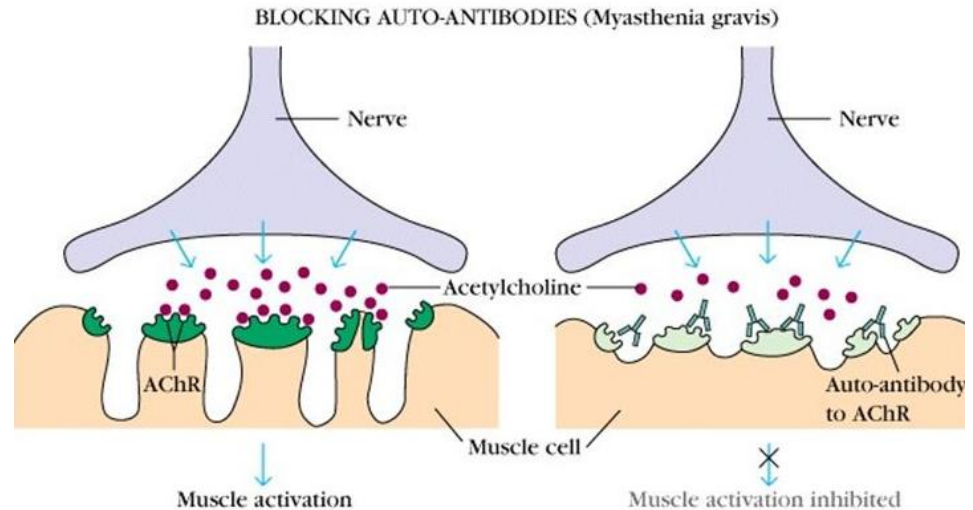


# Recherche des anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine sur cellules transfectées

Benoit NESPOLA



# Structure du récepteur à l'acétylcholine

- Récepteur nicotinique
- Post- synaptique
- Complexe protéique transmembranaire
- Assemblage de 5 sous-unités délimitant un canal ionique
- Récepteur adulte  $2\alpha$   $1\beta$   $1\delta$   $1\varepsilon$
- Récepteur foetal :  $2\alpha$   $1\beta$   $1\delta$   $1\gamma$

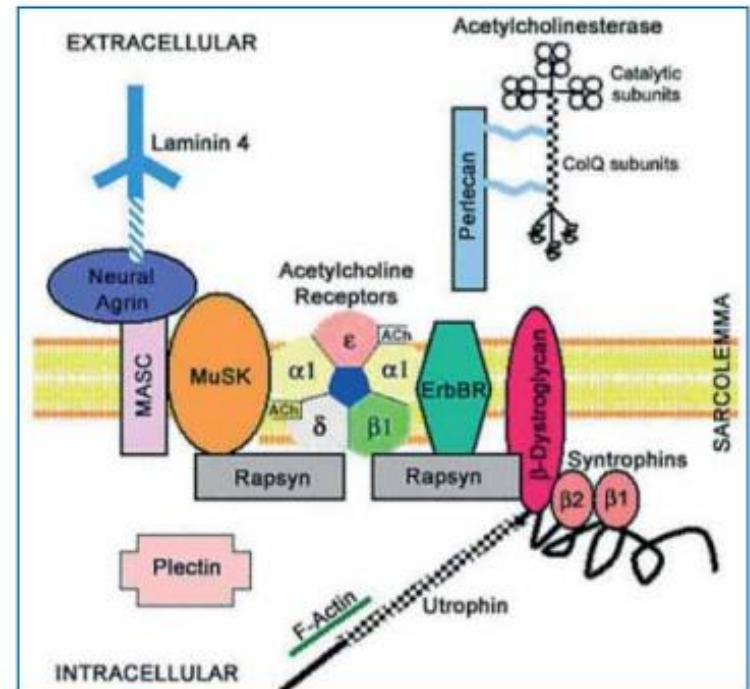


Figure 4 : structure schématique du récepteur de l'acétylcholine et des protéines associées

# ELISA RSR

- **Historiquement**

Envoi au laboratoire d'immunologie Necker

- **Seuil :**

- Négatif < 0,45 nM/l
- Positif  $\geq$  0,45 nM/l

- **Antigène :**

RAch adulte et foetal

- **Spécificité clinique :**

402 donneur sains = **99,8%**

- **Sensibilité clinique :**

83 patients avec le diagnostic de myasthénie = **92%**

# IFI sur cellules transfectées Euroimmun

- **Antigène :**

RAch adulte ( $\epsilon$ ) et foetal ( $\gamma$ ) séparés  
+ Musk  
+ contrôle de transfection

MUSK	AChR $\epsilon$
ctrl	AChR $\gamma$

- **Spécificité clinique :**

- 207 donneur sains = **100 %** pour les Ac anti-RAch
- 207 donneurs sains = **99,5 %** pour les Ac anti-MUSK

- **Sensibilité clinique vs RIA:**

100 patients myasthénie + = **96 %** pour les Ac anti-RAch et **98 %** pour les Ac anti-MUSK

- Sérums dilués au 1/10

Technique TITERPLANE



support de réactifs

Pipetage: 30 µl par puits



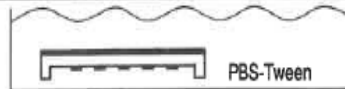
échantillons dilués



Incubation (1): 30 min



Lavage: rincer 1 s  
5 min dans le bac de lavage



Pipetage: 25 µl par puits



conjugué biotine



Incubation (2): 30 min



Lavage: rincer 1 s  
5 min dans le bac de lavage



Pipetage: 25 µl par puits



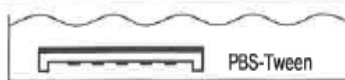
avidine couplée au FITC



Incubation (3): 30 min



Lavage: rincer 1 s  
5 min dans le bac de lavage



Montage: max. 10 µl par puits

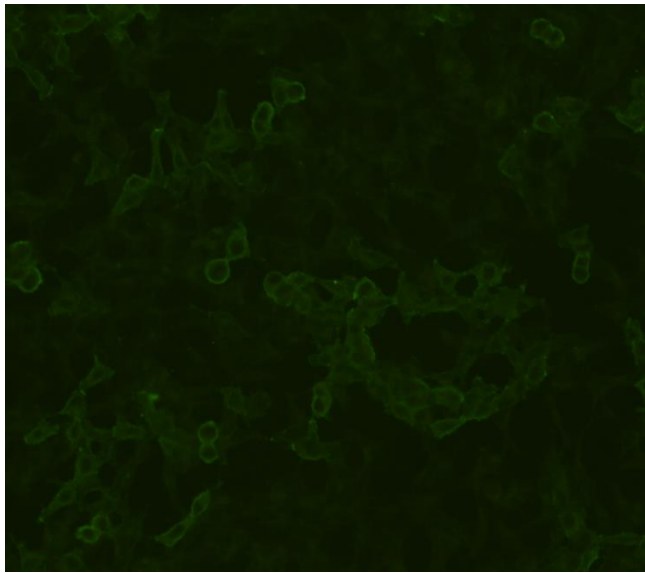


milieu de montage

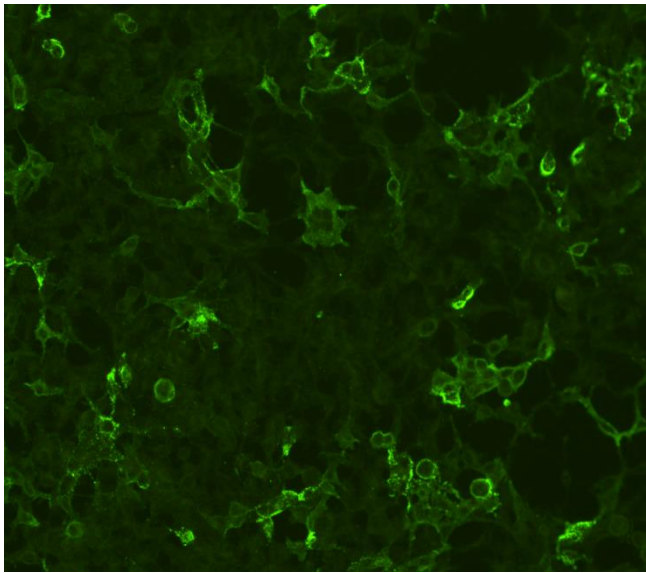


Evaluation: microscope à fluorescence

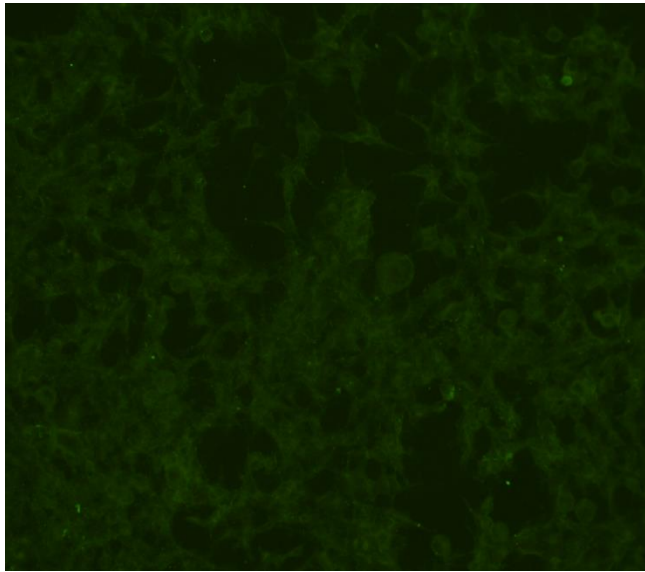




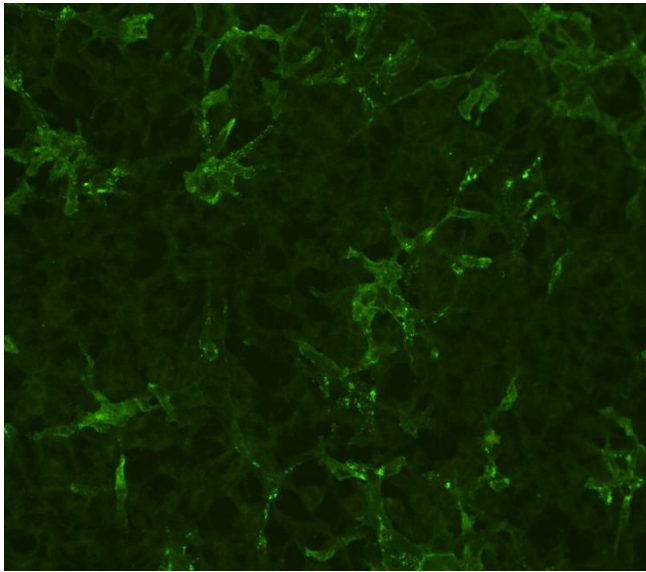
Contrôle + MUSK



Contrôle + RAcH (adulte)



Contrôle négatif de transfection



Contrôle + RAcH (foetal)

# IFI sur cellules transfectées Euroimmun

## Ac anti-RAch

23 sérums de titres variables : 0,41 nmol/L → > 100 nmol/L

IFI réalisée sur les mêmes sérums

16 myasthénies (11 sérums au diagnostic, 5 en suivi)

2 suspicions cliniques

Ac anti-MUSK non testés (aucun positif l'année passée)

# Résultats Strasbourg

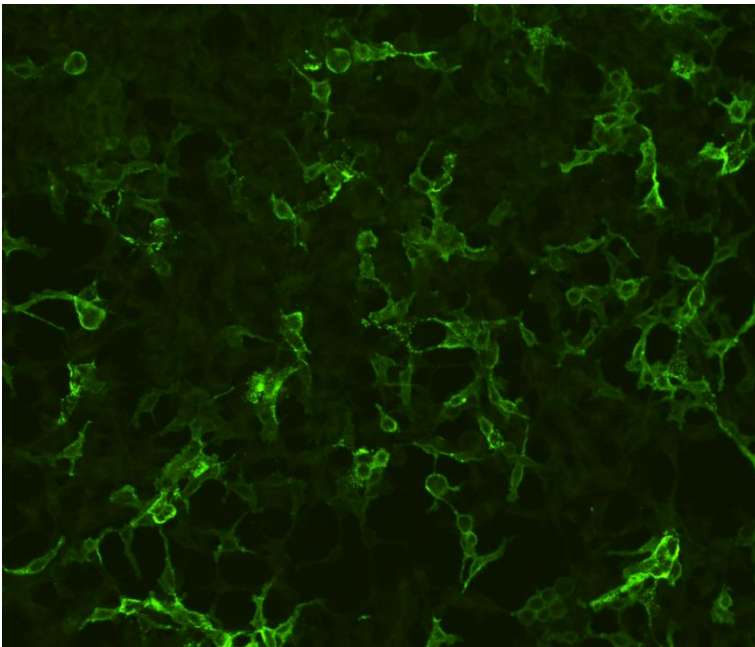
Titre Ac anti-RACH (nmol/L)	Aspect fluorescence	Diagnostic de myasthénie ?
0,41	FNS	Pas d'informations
0,49	+/-	Pas d'informations
0,51	neg	Suspicion, diag non posé
0,58	neg	Myasthénie
0,75	neg	Myasthénie
0,8	neg	Myasthénie
0,84	neg	Doute
0,86	FNS	Myasthénie
0,87	+ AChR $\epsilon$	Myasthénie
1,01	+ AChR $\epsilon$	Suspicion, diag non posé
1,57	neg	Myasthénie
1,9	neg	Pas d'informations
2,41	neg	Myasthénie
4,73	neg / FNS	Myasthénie
7,02	+ surtout AChR $\gamma$	Myasthénie
29,82	+++	Myasthénie
51,1	FNS intense et granules ++	Myasthénie
68,7	+++	Myasthénie
90	+++	Myasthénie
91,1	+++	Myasthénie
>100	+++	Myasthénie
>100	+++	Myasthénie



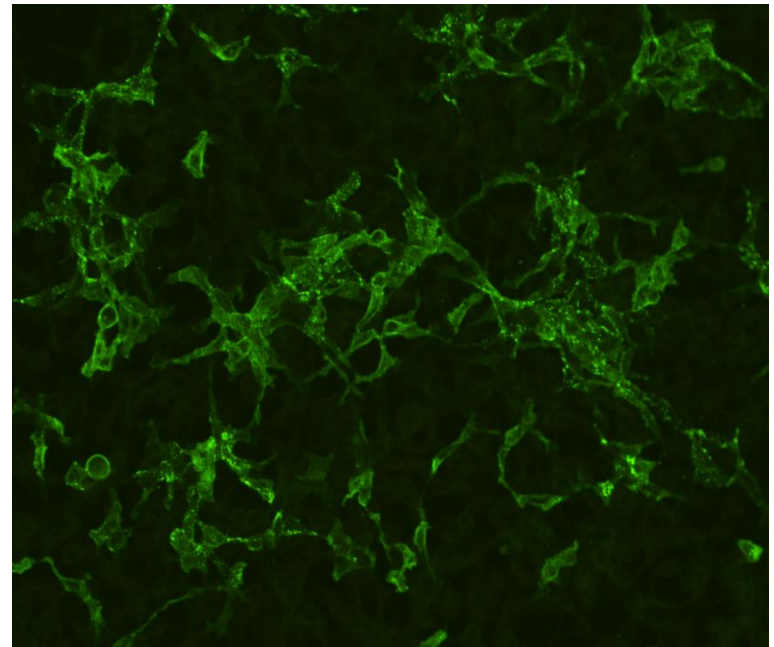
# Résultats Strasbourg

Titre Ac anti-RACH (nmol/L)	Aspect fluorescence	Diagnostic de myasthénie ?
0,41	FNS	Pas d'informations
0,49	+/-	Pas d'informations
0,51	neg	Suspicion, diag non posé
0,58	neg	Myasthénie
0,75	neg	Myasthénie
0,8	neg	Myasthénie
0,84	neg	Doute
0,86	FNS	Myasthénie
0,87	+ AChR $\epsilon$	Myasthénie
1,01	+ AChR $\epsilon$	Suspicion, diag non posé
1,57	neg	Myasthénie
1,9	neg	Pas d'informations
2,41	neg	Myasthénie
4,73	neg / FNS	Myasthénie
7,02	+ surtout AChR $\gamma$	Myasthénie
29,82	+++	Myasthénie
51,1	FNS intense et granules ++	Myasthénie
68,7	+++	Myasthénie
90	+++	Myasthénie
91,1	+++	Myasthénie
>100	+++	Myasthénie
>100	+++	Myasthénie

**Titre > 100 nmol/l**

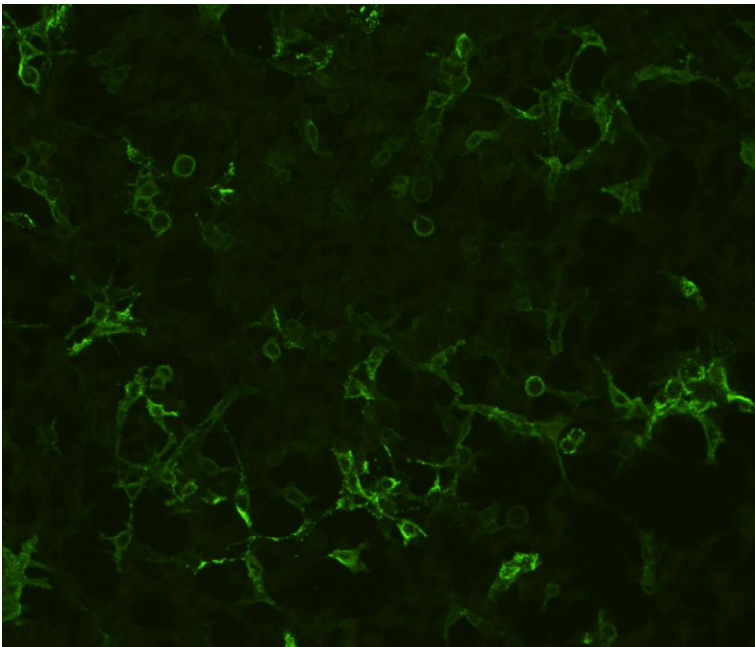


RACH adulte

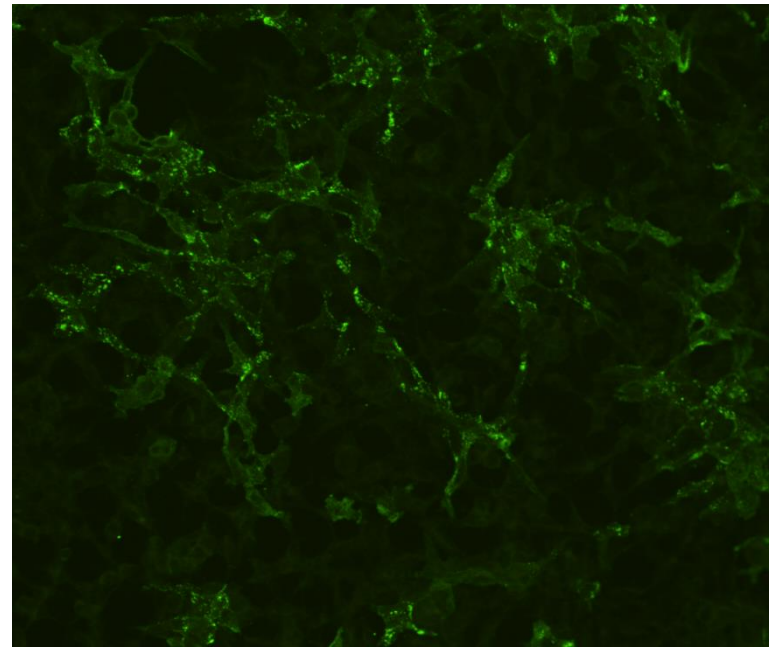


RACH foetal

**Titre 91 nmol/l**

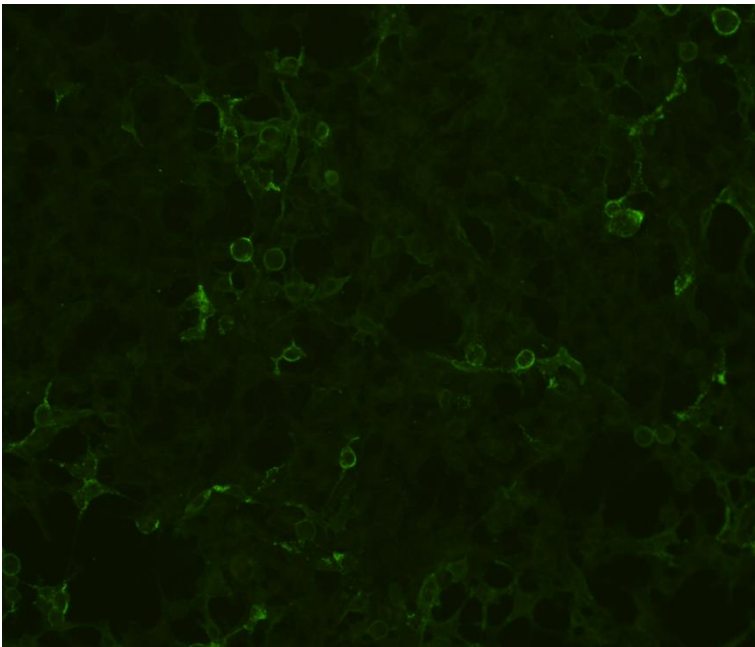


RACH adulte

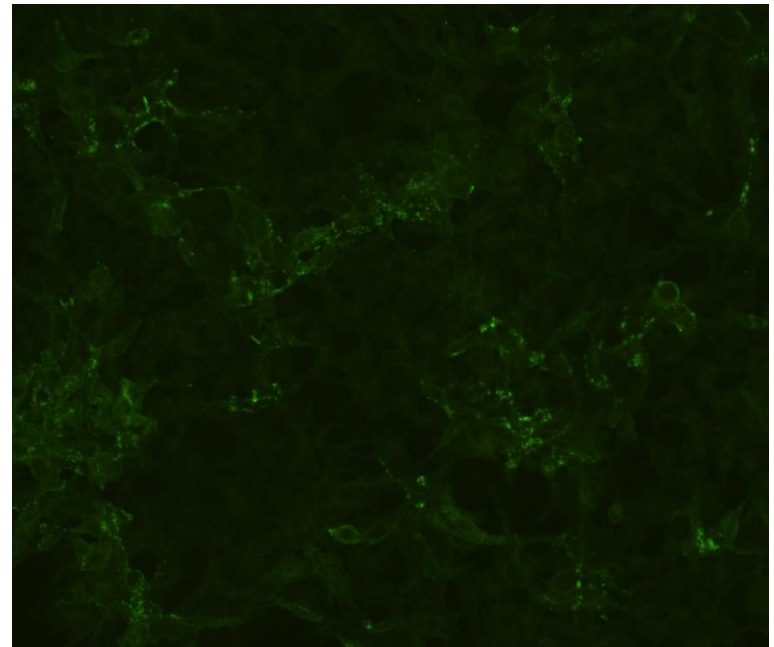


RACH foetal

**Titre 30 nmol/l**

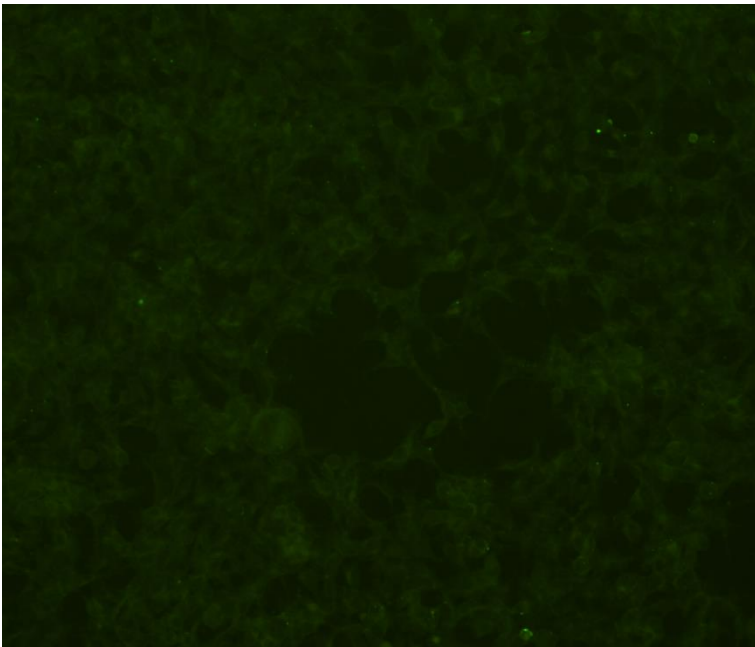


RACH adulte

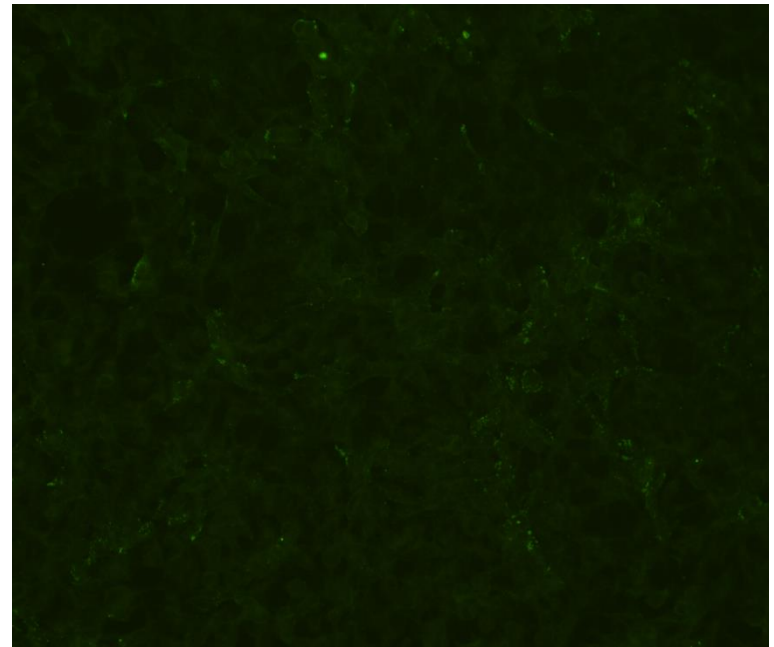


RACH foetal

**Titre 7 nmol/l**

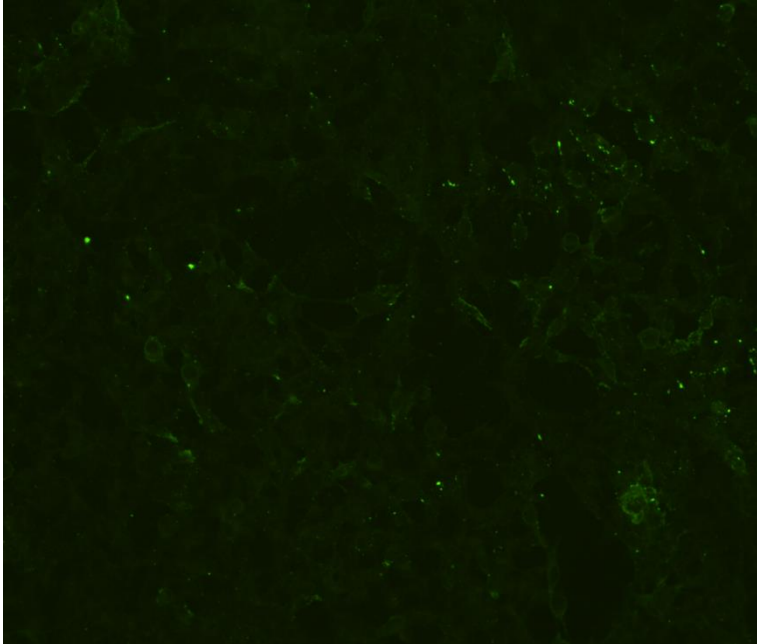


RACH adulte



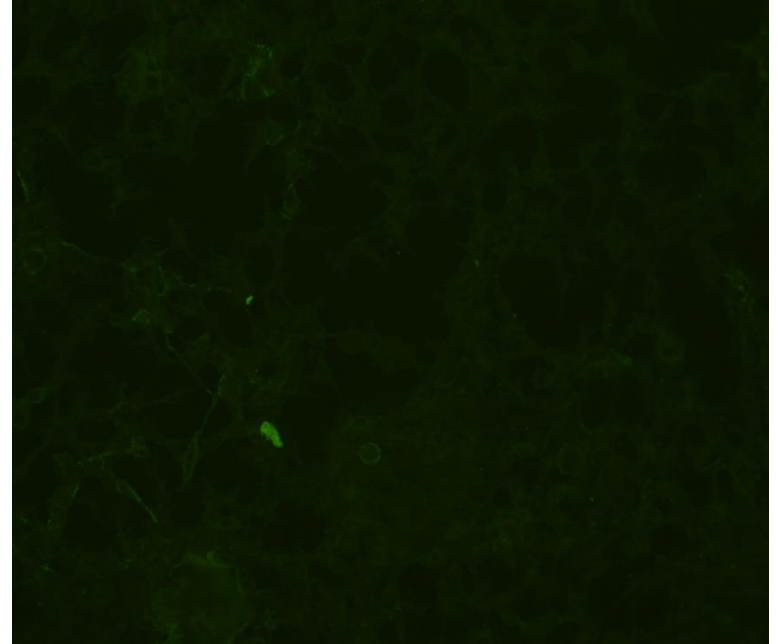
RACH foetal

**Titre 1,01 nmol/l**



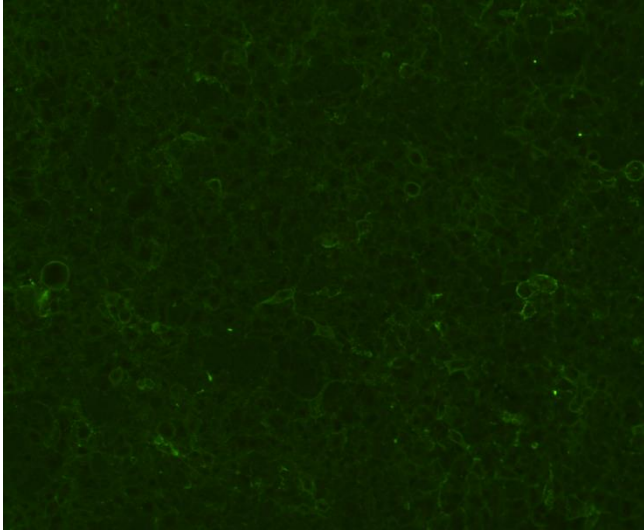
RACH adulte

**Titre 0,87 nmol/l**

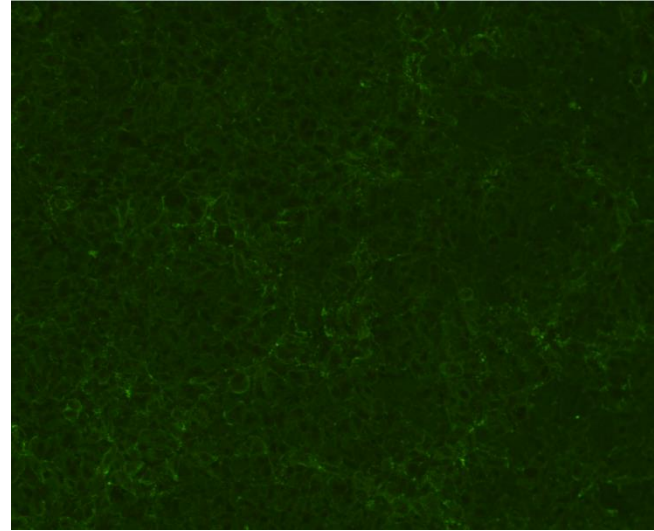


RACH adulte

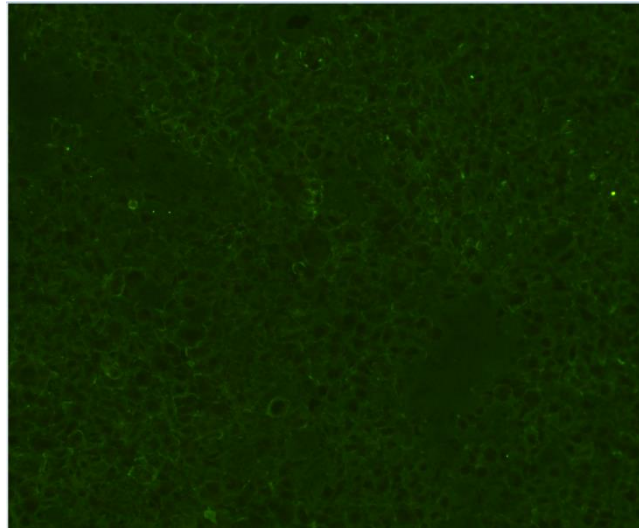
# Titre 51 nmol/l



RACH adulte



RACH foetal



Contrôle

# Résultats Bicêtre

Ac anti-Rach RIA Nal <0.4nMol/l	IFI Rach	Diagnostic
>100 en 2014	négatif	Myasthénie découverte en 2014 traitée par Ritux va bien. Plus de corticoïdes
positif en 2012	positif	myasthénie découverte en 2012. Poussée en décembre 2020
Positif en 1999	négatif	myasthénie diagnostiquée en 1999. Thymectomie et Ritux
>100	positif	suspicion de myasthénie
positif d'après le dossier	négatif	myasthénie découverte en 2019 au Québec stable actuellement
12.4 en 2010	négatif	Myasthénie découverte en 2010. Stable pas de poussée depuis 2019
1.2 en 2019	négatif	Myasthénie découverte en avril 2019. Myasthénie stable bien contrôlée
>100 en 2008	négatif	myasthénie diagnostiquée en 2008, thymectomie myasthénie stable
>100	positif	hospitalisé en mai 2021 pour crise aigüe de myasthénie
31.9 en 2019	négatif	myasthénie avec CBP et Sclérodémie systémique à forme cutanée limitée diagnostiquée en octobre 2018
42.8 en 2014	négatif	myasthénie diagnostiquée en aout 2014
>100 en 2019	négatif	myasthénie diagnostiquée en janvier 2019. bien contrôlée
positif en 2012	négatif	myasthénie daignostiquée en janvier 2012 stable depuis 2015
positif sur le dossier	négatif	après IG IV donc sans valeur
1.53 en novembre 2009	négatif	myasthénie daignostiquée en 2007. stable
positif en 1996	négatif	myasthénie découverte en 1996. Actuellement asymptomatique
positif en 2011	négatif	myasthénie diagnostiquée en novembre 2011. stable sous ritux
1.33 en 2010	négatif	myasthénie diagnostiquée en 2010. Myasthénie bien contrôlée
28.0 en 2016	négatif	myasthénie diagnostiquée en janvier 2016. Bien contrôlée
16.8 en 2015	négatif	myasthénie diagnostiquée en 2009. stable depuis 2016
positif en 2014	négatif	myasthénie diagnostiquée en 2014. Stable depuis
0.9 en 2016	négatif	myasthénie découverte en avril 2016. stable depuis
positifs en 2010	négatif	myasthénie découverte en 2010 sur drépano SS et LES. Stable depuis 2016;



# Conclusion

- Avantages
  - Technique plus rapide que l'ELISA
  - Recherche simultanée des Ac anti-RAch et anti-MUSK
  - Adapté à une faible volumétrie
- Mais manque évident de sensibilité
- A évaluer pour la recherche des Ac anti-MUSK