

Histoire des anticorps antinucléaires

En avril 1943, l'hématologiste Malcolm Hargraves remarque, dans la moelle sternale d'un malade, la présence de cellules particulières constituées de polynucléaires neutrophiles ayant phagocyté le noyau d'une autre cellule. Ce n'est cependant qu'en 1984 qu'il fut démontré que ces cellules étaient associées au lupus érythémateux et elles furent, pour cette raison, appelées cellules LE. Cette découverte ne fut possible que parce que M. Hargraves utilisait de la moelle sternale récoltée dans un tube et étalée après leucoconcentration. Or c'est précisément cette préincubation qui s'est révélée indispensable pour la formation de la cellule LE, puisque celle-ci n'est pas observée si la moelle est directement étalée et colorée. L'année suivante, John Haserick montra que le sérum des malades lupiques mis en présence de moelle sternale normale provoquait la formation des cellules LE et que le facteur sérique était présent dans la fraction globulinique. En 1954, le suisse Peter Miescher réussit à adsorber le facteur sérique LE avec des noyaux de cellules thymiques de veau, démontrant ainsi que le facteur LE est un anticorps antinucléaire. Les études se sont poursuivies dans le laboratoire de H.G. Kunkel où fut montré, en 1957, que le facteur LE du sérum pouvait également être adsorbé par le complexe ADN-histones, constituant des nucléosomes, et que ce pouvoir adsorbant était aboli après traitement des nucléoprotéines par la DNase. La même année trois équipes différentes révélaient que le sérum des lupiques réagissait avec l'ADN. Le français Maxime Seligman, le premier, montra que le sérum des lupiques provoque un précipité lorsqu'il est superposé à une solution d'ADN. La précipitation de l'ADN en milieu gélifié est observée par l'italien R. Ceppellini et l'allemand H.R.G. Deischer. Les anticorps anti-ADN étaient devenus le marqueur sérologique spécifique du lupus ! Du fait de son importance, la recherche des anti-ADN a fait l'objet de nombreux travaux, et de nombreuses techniques ont été proposées. L'immunoprécipitation étant peu sensible, d'autres techniques ont été utilisées : l'hémagglutination conditionnée, la radio-immunoprécipitation (le test de Farr) et l'ELISA. Une très élégante technique a été développée en France par J. Thivolet et J.C. Monier en 1965. Celle-ci utilise des frottis de sang de souris infectées par *Trypanosoma gambiense* qui permettent d'identifier, par immunofluorescence, les anticorps anti-ADN car ceux-ci marquent intensément le kinétoplaste des trypanosomes. Ce principe a été modifié par L.A. Aarden (1975) avec un autre protozoaire, le *Crithidia lucilae* qui peut être obtenu en culture en tube et qui présente un kinétoplaste d'un volume très supérieur à celui des trypanosomes. Plus récemment, G. Servais et J. Duchateau (1998) ont décrit une nouvelle méthode d'immunofluorescence basée sur la réaction avec l'ADN membranaire de certains lymphocytes en culture.

SOMMAIRE

- **Editorial**
Histoire des anticorps antinucléaires
page 1
- **Point de vue du clinicien :**
Lupus : quoi de neuf à l'aube du troisième millénaire ?
page 3
- **Mise au point :**
Anticorps antinucléosomes
page 5
- **Étude multicentrique :**
Signification clinique des anticorps anti-ribosomes anti-P (P0, P1, P2) et anti-non-P
pages 9 à 12
- **Analyse critique de l'actualité bibliographique**
page 13
- **Résumé de congrès**
Rapport du 8^e Symposium sur les anticorps antiphospholipides
page 14
- **Calendrier des manifestations en auto-immunité**
page 16

L'histoire des anticorps antinucléaires va prendre une tournure importante, grâce à George Friou, chef du service des Maladies Infectieuses à l'Hôpital de West Haven dans le Connecticut, qui applique la technique d'immunofluorescence développée en 1953 par Albert Coons. À l'aide d'un éclairage UV archaïque provenant d'une lampe récupérée d'un avion de la seconde guerre mondiale et d'une antiglobuline humaine marquée à la fluorescéine dans des conditions dangereuses liées à l'utilisation de gaz phosgène, G.J. Friou peut montrer que le sérum des malades lupiques se fixe sur le noyau des cellules. Le test d'immunofluorescence pour la recherche des anticorps antinucléaires était né ! Le premier à l'utiliser sur coupe de tissus est E.J. Holborow, à Londres. En France, les premiers essais sont réalisés par A. Eyquem, à l'Institut Pasteur de Paris. En 1961, l'anglais J.S. Beck décrit l'existence de différents « patterns », c'est-à-dire de diverses images fluorescentes correspondant à des spécificités différentes des anticorps : homogènes pour les anticorps du sérum des lupiques, mouchetées et nucléolaires. L'immunofluorescence ne se généralisera qu'à partir de 1968 lorsque les premiers microscopes équipés d'un éclairage UV se répliquent dans les laboratoires. Différents substrats seront utilisés : des coupes de tissus animaux (J.S. Beck, 1961), des cellules desquamées de la muqueuse jugale (E. Mandema, 1961), des globules rouges de poulet (T.E.W. Feltkamp, 1963), du sang humain (S.P. Cazals, 1963), des empreintes de rate humaine (K.H. Svec, 1967). J.S. Beck fut le premier, en 1962, à utiliser les cultures de cellules Hela. Il fut suivi par N. Hahon, en 1975, qui compara plusieurs types de cellules, dont la cellule HEp2, isolée en 1955 par A.E. Moore, d'une tumeur trachéale humaine et qui devient le substrat universellement accepté pour la recherche des anticorps antinucléaires en routine.

Une autre découverte fait date dans l'histoire des anticorps antinucléaires ; il s'agit de la mise en évidence, en 1961 par l'équipe de J.R. Anderson à Glasgow, dans le sérum des malades atteints du syndrome de Sjögren, d'anticorps précipitants un extrait soluble de divers tissus. C'est le départ des travaux sur les anticorps anti-ENA (Extractable Nuclear Antigens), c'est-à-dire d'antigènes solubles dans des solutions de molarité physiologique. L'année suivante, d'autres anticorps précipitants sont mis en évidence dans le sérum des lupiques (appelés anti-lup), puis dans la sclérodermie (J.S. Beck, 1963). Un de ces anticorps sera identifié en 1966 par Eng. M. Tan sous le nom d'anti-Sm, abrégé du nom de la patiente atteinte d'un lupus (Stéphanie Smith) qui a fourni le sérum. Depuis, un grand nombre d'anti-ENA ont été caractérisés, certains étant des marqueurs spécifiques des connectivites.

Peu à peu les nouvelles techniques d'immunoanalyse et de biologie moléculaire seront appliquées à l'étude des anticorps antinucléaires, conduisant à une meilleure connaissance sur la nature des antigènes cibles et sur la signification clinique des anticorps. L'identification moléculaire des antigènes nucléaires sera entreprise en 1979 par M.R. Lerner et J.A. Steitz. Développée par H. Towbin en 1979, la technique du Western-blot sera appliquée à l'étude des anticorps antinucléaires par H. Gueldner à partir de 1983. L'ELISA sera utilisée, dès 1970, par Benson pour les anticorps antinucléaires, et pour les anti-ADN par M.J. Pesche, en 1974. Elle tend à être remplacée par l'immunodot (Haynes, 1989). Ces techniques profiteront largement du clonage et de la production par génie génétique des principales cibles antigéniques. Le gène codant pour l'antigène SSA a été le premier découvert, en 1983, par S.L. Wolin et Steitz. J.C. Chambers produira, en 1985, l'antigène SSB en utilisant le système d'expression dans *E. coli*. Ce mode d'expression sera remplacé avantageusement, au début des années 80, par un procédé utilisant comme vecteur le baculovirus dans des cellules eucaryotes, assurant l'obtention de molécules se rapprochant des antigènes natifs humains. Aujourd'hui, la plupart des antigènes nucléaires ont été clonés.

À ce jour, près d'une quarantaine d'anticorps antinucléaires différents ont pu être caractérisés. L'immunofluorescence sur cellule HEp2 a cependant permis de montrer qu'il existe aussi des autoanticorps réagissant préférentiellement avec le cytoplasme et non avec le noyau. Ceux-ci comportent des spécificités variées et certains de ces anticorps sont importants pour le diagnostic car ils sont associés à des maladies précises. En 1980, N. Nishikai a rapporté l'existence d'un anticorps anti-cytoplasme associé à la polymyosite. Initialement appelé anti-Jo1 il s'est révélé être dirigé contre l'histidyl-tRNA synthétase. Par la suite, la liste des anticorps anticytoplasme s'est allongée avec la découverte des anticorps anti-appareil de Golgi (H. Rodriguez, 1982), anti-SRP (W.H. Reeves, 1986) et toute une série d'anticorps contre les différents tRNA-synthétases (M.B. Mathews, 1984). En dehors des connectivites, des anticorps antinucléaires peuvent aussi être trouvés dans d'autres affections. C'est ainsi qu'un anticorps réagissant avec une protéine centromérique spécifique du chromosome en division (CENP-F) s'est révélé être fréquemment associé à une tumeur cancéreuse (R.L. Humbel, 1987).

*René Louis HUMBEL
Laboratoire de biochimie
CH Luxembourg*

LUPUS : quoi de neuf à l'aube du troisième millénaire ?

L'AVIS DU CLINICIEN

Louis Alphée CAZENAVE a introduit, en 1850 (Gazette des Hôpitaux de Paris, Juillet 1850), le terme de "lupus érythémateux". Depuis, que de choses ont changé !! Aujourd'hui, nous ne parlons plus de lupus mais d'affections lupiques, tellement la diversité clinico-biologique de cette entité est grande. Cette maladie "plurielle" offre aux cliniciens et biologistes de multiples aspects qui ont déjà fait couler beaucoup d'encre. Avant d'aborder le troisième millénaire, il est intéressant de s'interroger sur les grands progrès du passé et les orientations du futur comme l'illustrent les 6 points suivants :

1/ La description des signes cliniques élémentaires a peu changé : le masque lupique reste toujours le signe emblématique de cette maladie même si son origine sémantique est toujours controversée. En fait, ces dernières années, la principale avancée a été la découverte du syndrome des anti-phospholipides. Le mérite revient à E.N. HARRIS et G.R.V. HUGUES d'avoir compris le lien entre thrombose et anticorps anti-phospholipides. Depuis, le diagnostic et la compréhension de ce syndrome s'affinent grâce à la découverte de nouveaux auto-anticorps intervenant dans la cascade de l'hémostase (anti-B2-glycoprotéine 1, anti-prothrombine...).

2/ Si les anticorps anti-DNA natifs, identifiés par Maxime SELIGMANN en 1957, restent toujours la pierre angulaire du diagnostic biologique, la sophistication et la standardisation des techniques (encore insuffisante) de détection des anticorps antinucléaires ont permis d'authentiques progrès diagnostiques. Grâce à ces nouvelles méthodes, il est vraisemblable qu'il reste moins de 1% de lupus systémiques véritablement séronégatifs.

3/ Le diagnostic précoce du lupus est toujours difficile malgré la mise à jour récente (1997) des critères diagnostiques. La nouvelle version a supprimé (enfin!!) les cellules LE et la "fausse sérologie syphilitique" (VDRL) qui font désormais partie du patrimoine historique de cette célèbre maladie. Il faut rappeler que ces critères "dépassés" servent surtout de critères de classification destinés aux travaux scientifiques. En pratique quotidienne, ils servent de "cadre de réflexion" mais leur utilisation ne doit pas conduire à la dictature des critères car l'expérience montre que de nombreux patients ont un "vrai" lupus même s'ils ne répondent pas à un nombre de critères suffisants pour affirmer "officiellement" le diagnostic. Pour améliorer le diagnostic précoce, la tendance actuelle est donc de remplacer ces critères cumulatifs par des systèmes d'arbres décisionnels ou par des critères diagnostiques pondérés (tableau 1).

4/ En 1998, ont été présentés les premiers résultats des études génétiques familiales. Ces études confirment le caractère multi-factoriel et multigénique du lupus dont la transmission répond à des lois non-mendéliennes. Même si cette approche n'a pas encore d'application pratique, la découverte des gènes de susceptibilité est un élément très important qui va certainement permettre de mieux comprendre certains aspects cli-

nico-biologiques de la maladie. Plusieurs travaux ont démontré l'importance des gènes du chromosome 1 (figure 1). Cette région de susceptibilité comprend, notamment, le gène de la PARP (poly ADP ribose polymérase) qui régule la réparation de l'ADN intervenant surtout dans les phénomènes d'apoptose. Il existe dans le lupus des anomalies génomiques de la PARP qui pourraient expliquer la mort prématurée de certaines cellules (par apoptose) mais aussi l'exposition anormale de l'ADN et d'autres ribonucléoprotéines, les rendant ainsi plus immunogènes. Récemment, plusieurs autres travaux ont été consacrés à l'étude du polymorphisme allélique des gènes des récepteurs Fc γ RII et RIII, également localisés sur le chromosome 1. Schématiquement, ces travaux démontrent qu'il existe, dans le lupus, une expression plus fréquente d'allèles codant pour des Fc γ qui ont une affinité moindre pour les IgG, réduisant ainsi la capacité de phagocytose des complexes immuns. Il semble que ces anomalies puissent expliquer, en partie, la sévérité de la maladie. Le gène de la chaîne ζ du TCR se situe également sur le chromosome 1. Dans le lupus, il a été démontré récemment que 70% des patients ont des lymphocytes T qui n'expriment pas la chaîne ζ du complexe TCR/CD3. Cette anomalie ne semble pas avoir de conséquence dans les mécanismes d'activation de transduction mais pourrait influencer des phénomènes de sélection des lymphocytes T. Cependant, l'interprétation de cette anomalie n'est pas univoque : pour certains, il s'agit d'une anomalie génomique (déletion d'un exon) mais pour d'autres, il s'agit simplement d'un phénomène physiologique car la chaîne ζ disparaît quand les lymphocytes T sont activés (ce qui est le cas au cours du lupus). D'autres gènes comme le gène de l'IL-10, le gène du C1q ou le gène du fas ligand sont également présents sur le chromosome 1. De nombreuses études sont en cours pour essayer de comprendre leur importance au cours du lupus.

Figure 1 / Principaux sites de susceptibilité

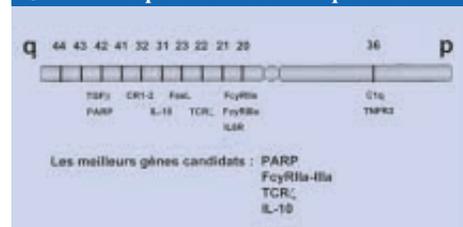
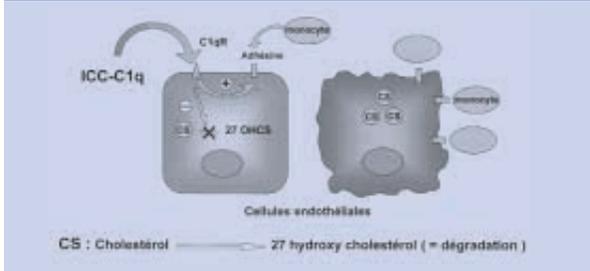


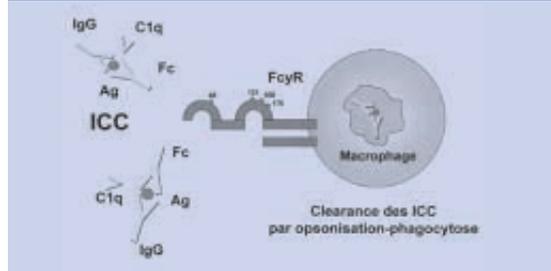
Figure 2 / Mécanismes de l'athéromatose liée aux immuns complexes du lupus



5/ Ces dernières années ont vu un développement de nouveaux concepts immunopathogéniques, débordant largement le cadre du lupus : rôle du déséquilibre cytokinique (profil TH1/TH2), importance du phénomène d'apoptose, modulation des phénomènes de sélection, mécanismes d'auto-immunisation par diffusion épitopique ("epitope spreading"). Au-delà de ces nouveaux concepts, d'autres travaux ont permis de mieux comprendre certains aspects particuliers du lupus. En 1998, des arguments solides semblent démontrer que l'activité du lupus est spécifiquement responsable de l'induction d'une athéromatose accélérée (figure 2). Les complexes immuns circulants (ICC), mal éliminés dans le lupus, se fixent sur le récepteur du C1q, à la surface des cellules endothéliales. Cette fixation va entraîner une inactivation de l'enzyme de dégradation du cholestérol (cholestérol 27-hydroxylase). La conséquence de cette inhibition enzymatique est une accumulation de cholestérol dans les cellules endothéliales. Parallèlement, la fixation des ICC aux récepteurs du C1q provoque aussi l'hyperexpression des molécules d'adhésion leucocytaires à la surface des cellules endothéliales, ce qui va attirer un afflux de leucocytes qui vont léser l'endothélium.

Ainsi, au total, ces altérations et l'accumulation de cholestérol déclenchent une athéromatose accélérée spécifique du lupus.

Figure 3 / Rôle des récepteurs des fragments Fc des IgG (FcγR) dans la phagocytose des immuns complexes



6/ Les progrès thérapeutiques ont été significatifs, principalement dans 3 axes :

- Les manifestations viscérales les plus sévères, en particulier les néphropathies et le syndrome des anti-phospholipides sont relativement bien contrôlées par les corticoïdes, les immunosuppresseurs et les anti-coagulants. Dans certaines circonstances exceptionnelles (syndrome catastrophique des anti-phospholipides, manifestations polyviscérales sévères), des modalités thérapeutiques d'exception, comme l'intensification de l'immuno-suppression avec greffe de moelle ou de cellules souches périphériques, ont permis d'améliorer des situations désespérées.
- Une meilleure prise en charge et une meilleure planification des grossesses ont transformé le pronostic et la vie des jeunes femmes lupiques.
- Un meilleur contrôle et une meilleure prévention des infections et de l'athéromatose ont permis d'améliorer considérablement la qualité de vie et la survie des patients atteints de lupus.

En conclusion, tous ces éléments nouveaux permettent une meilleure connaissance et une meilleure prise en charge des patients atteints de lupus. En effet, à titre d'exemple, depuis quelques années, il semble que l'incidence du lupus soit en augmentation mais que sa mortalité soit en réduction comme le confirme une étude récente de la Mayo Clinic. Cette enquête rétrospective a comparé l'incidence et la mortalité du lupus durant la période de 1950 à 1979 et celle de 1980 à 1992. De 1950 à 1979, l'incidence du lupus est évaluée à 1,53 nouveau lupus pour 100000 habitants/an alors que cette incidence est estimée à 5,8 de 1980 à 1992. Cette augmentation de l'incidence est parallèle à une baisse significative de la mortalité. Cette observation est certainement le résultat de l'amélioration des traitements et de la découverte de lupus moins sévères grâce à l'utilisation de tests diagnostiques plus performants.

A l'aube du troisième millénaire, le lupus n'est plus considéré comme une affection rare ou une fatalité dramatique. Nous pouvons parier que, dans un avenir proche, les progrès exponentiels de l'immunopathologie et l'avènement de nouveaux immuno-modulateurs permettront encore des progrès plus spectaculaires.

Jean SIBILIA
Service de Rhumatologie
Hôpital de STRASBOURG

Scores pondérés des critères préliminaires du lupus érythémateux disséminé

Critère	Score pondéré
Cytopénie	1,5
Erythème malaire	1,0
Sérite	0,6
Alopécie	0,6
Photosensibilité	0,6
Protéinurie > 3,5 g/24h	1,0
Cylindres cellulaires	1,5
Psychose ou convulsions	0,7
Lupus discoïde	1,5
Phénomène de Raynaud	0,3
Sérologie cardiolipide positive	0,5
Arthrite	0,1
Ulcération nasales ou orales	0,1
Biologie FAN +	0,5
FAN + anti-ADN -, anti-Sm -	0,3
FAN + anti-ADN +, anti-Sm -	1,3
FAN + anti-ADN -, anti-Sm +	1,3
FAN + anti-ADN +, anti-Sm +	1,4
FAN -	-1,8

Lupus érythémateux disséminé si score cumulé > 2, sensibilité : 92% ; spécificité : 96% ; FAN - : absence de facteurs anti-nucléaire; FAN + : présence de facteurs anti-nucléaires.

Anticorps antinucléosomes

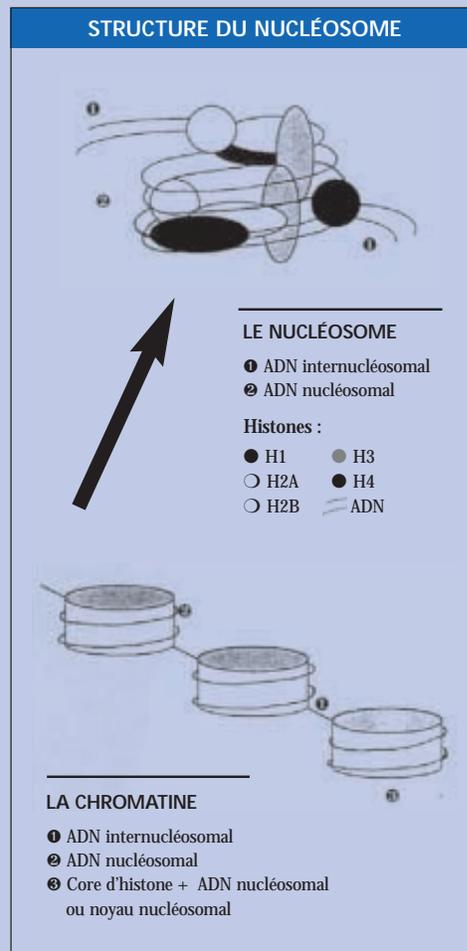
J.GOETZ, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, laboratoire d'Immunologie.
Avenue Molière, 67000 Strasbourg

R.-L. HUMBEL, Centre Hospitalier du Luxembourg, laboratoire d'Immunopathologie.
4, rue Barblé, 1210 Luxembourg

Les anticorps anti-nucléosomes font partie du groupe des anticorps anti-nucléaires de type anti-chromatine. Responsables du phénomène LE, ils ont été décrits pour la première fois en 1948 par HARGRAVES mais leur rôle dans la formation des cellules LE et leur spécificité n'ont été établis qu'en 1957 par HOLMAN et KUNKEL. Ce sont les anticorps anti-DNP (désoxyribonucléoprotéine) dont la plupart sont des anticorps anti-ADN + histones.

Au début des années 1990, plusieurs équipes les ont incriminés dans la pathogenie du lupus érythémateux disséminé, tant chez l'animal que chez l'homme. Des méthodes de détection de ces anticorps ont été développées afin de déterminer leur éventuelle signification clinique.

Figure 1



1/ LE NUCLÉOSOME :

Dans le noyau d'une cellule humaine en interphase, les chromosomes sont despiralisés et forment la chromatine constituée d'ADN et de protéines qui lui sont associées. La chromatine est composée de sous-unités empilées : les nucléosomes.

1. STRUCTURE :

Dans chaque nucléosome de poids moléculaire 262 kDa, 146 paires de bases d'ADN en double hélice s'enroulent autour d'un octamère d'histones (histones du «core») formé d'une paire de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4, de poids moléculaire 14 kDa, 13,8 kDa, 15,3 kDa et 11,3 kDa respectivement, chaque copie d'histones contenant 102 à 135 acides aminés.

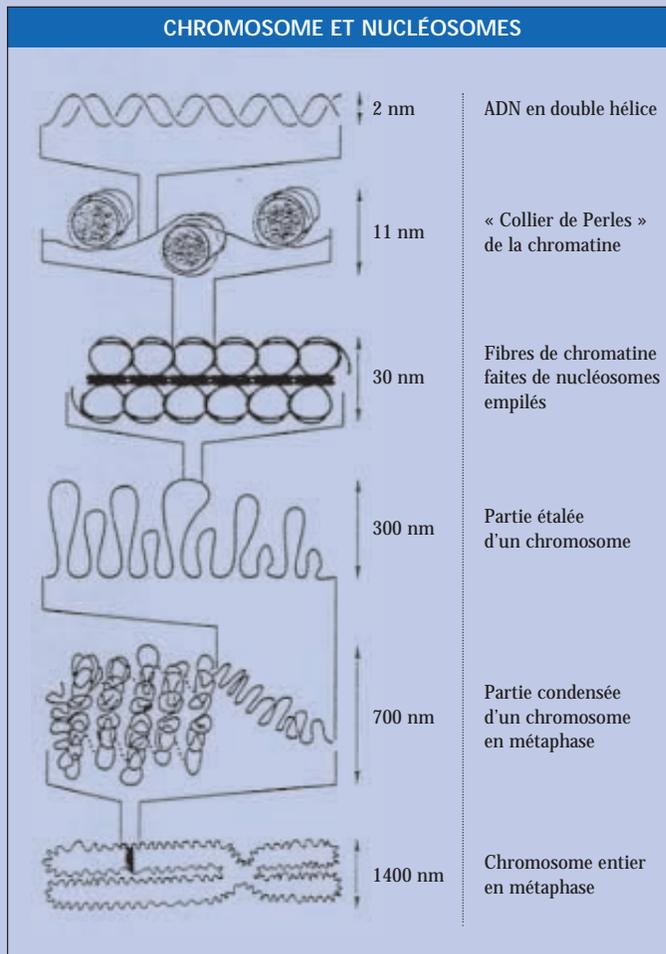
Chaque noyau nucléosomique est connecté à son voisin par de l'ADN internucléosomique, de 40 à 80 paires de bases. On a une structure en collier de perles ou le fil (l'ADN) entoure les perles d'histones au lieu de les traverser (figure 1). Une molécule d'histone H1 contenant environ 220 acides aminés et de poids moléculaire 23 kDa se lie au nucléosome.

2. PHYSIOLOGIE :

a) Nucléosome et condensation de l'information génétique

La condensation de l'information génétique s'effectue grâce aux nombreux repliements des structures qui forment le chromosome. Dans le noyau en interphase, l'ADN en double hélice a un diamètre de 2 nm. La chaîne nucléosomique ou l'ADN est enroulé sur les histones à un diamètre de 11 nm. Lorsque les nucléosomes sont empilés grâce à l'histone H1, on a un nucléofilament de 30 nm de diamètre ou fibre de chromatine élémentaire. Lors de la mitose, l'enroulement du nucléofilament aboutit à la formation d'une chromatide de 700 nm de diamètre (figure 2)

Figure 2



b) Les déterminants antigéniques des nucléosomes

Le nucléosome joue un rôle important dans le déclenchement et la pérennisation des phénomènes auto-immuns dans le lupus érythémateux systémique. Il présente de nombreux déterminants antigéniques.

La plupart des anticorps antinucléosomes reconnaissent des épitopes conformationnels présents sur la structure tertiaire et quaternaire et formés par les interactions $(H2A-H2B)_2$ -ADN situés à la surface de la chromatine. Les extrémités N-terminales des histones du core, riches en lysine (chargées positivement), situées à la surface du nucléosome, sont facilement accessibles aux anticorps.

A la surface des mononucléosomes en solution, ont été identifiés onze déterminants linéaires couvrant les extrémités N-terminales des histones H2A, H2B et H3, les extrémités C-terminales des histones H2A et H4 et 6 domaines internes des histones. Pour l'histone H2B, les régions 6-18 sont exposées alors que les régions 26-35 et 36-43 sont cachées. La séquence 1-11 est exposée quand l'histone H1 est éliminée, cachée sinon.

Lorsque les nucléosomes sont immobilisés sur une plaque de polystyrène, seules l'extrémité N-terminale de l'histone H2B et la région centrale de H2A sont accessibles aux anticorps.

2/ ANTICORPS ANTINUCLÉOSOMES :

Les anticorps anti-nucléosomes ont pour cible les nucléosomes ou les complexes subnucléosomaux (histones du <<core>> + ADN) et, par définition, ils ne sont dirigés ni contre les histones individuelles ni contre l'ADN. In vitro, cependant, certains d'entre eux sont capables de réagir avec l'ADN ou les histones. Inversement, les anticorps anti-ADN ou antihistones peuvent réagir avec des épitopes d'ADN ou d'histones présents dans les nucléosomes, sans pour autant être des anticorps anti-nucléosomes.

1. Méthodes de détection :

Les anticorps antinucléosomes sont détectés par technique immunoenzymatique de type ELISA ou par immuno-dot.

a) Les sources d'antigène :

Les nucléosomes peuvent être obtenus soit à partir de chromatine extraite de noyaux cellulaires, soit à partir d'histones purifiées qui sont capables de former des nucléosomes dans un tube à essai avec de l'ADN.

Toutes les cellules eucaryotes peuvent être utilisées pour préparer des nucléosomes isolés (thymus de veau, foie de rat, ...). La nucléase de microcoque est utilisée pour le clivage internucléosomal et permet d'obtenir des octamères d'histones avec l'ADN.

Si la digestion par la nucléase se prolonge, on obtient des structures subnucléosomales : $(H2A-H2B)$ -ADN, $(H3-H4)_2$ -ADN et des dimères H2A-H2B ou des tétramères H3-H4. L'élimination des protéines non histones et des histones H1 responsables de l'empilement des nucléosomes dans la chromatine est obtenue avec des tampons NaCl 0,35 M et 0,5 M respectivement (figure 3).

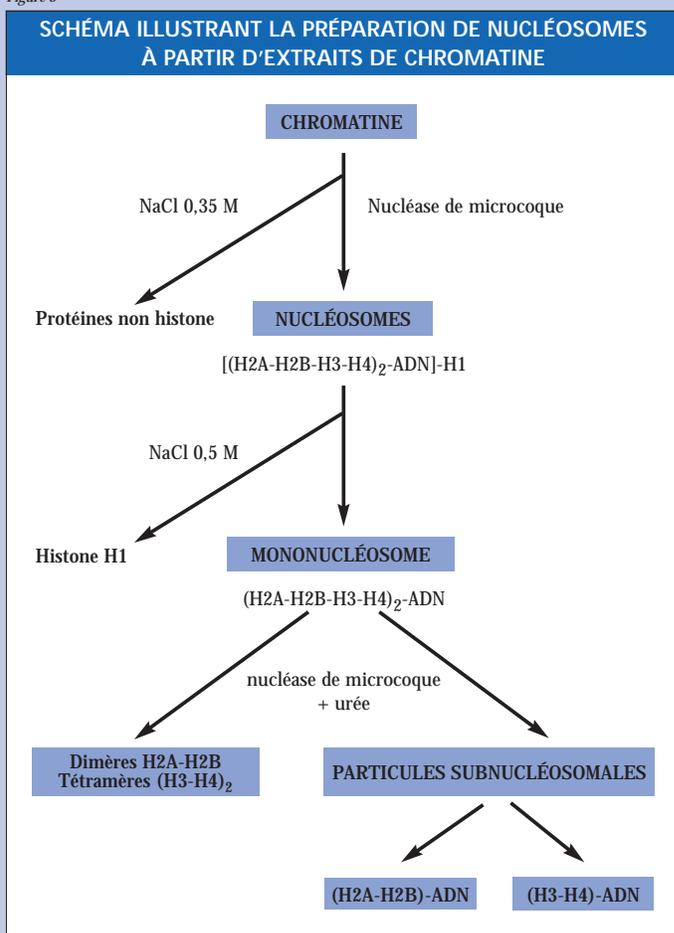
Selon le protocole technique utilisé, on obtiendra une préparation de nucléosomes soit pure soit plus ou moins contaminée par des <<subnucléosomes>> et des complexes histones-histones.

Pour reconstituer des nucléosomes in vitro, on mélange dans des proportions déterminées, de l'ADN et les 4 histones du core purifiées. Les nucléosomes ne se forment que si les quatre histones sont au point d'équimolarité. Si ces conditions ne sont pas respectées, la présence d'anticorps anti-ADN et/ou anti-histones dans l'échantillon à tester peut interférer dans la recherche d'anticorps antinucléosomes. Des structures subnucléosomales peuvent être obtenues en mélangeant des complexes $(H2A - H2B)_2$ ou $(H3 - H4)_2$ avec de l'ADN. Il reste à préciser si ces nucléosomes ou fractions subnucléosomales présentent les mêmes déterminants que les nucléosomes natifs.

b) Immobilisation des nucléosomes :

L'immobilisation des nucléosomes sur le plastique est plus facile que celles des histones ou de l'ADN seul.

Figure 3



KIT	BMD France	D-TEK Belgique	INOVA USA	SCIMEDX USA
Technique :				
• Elisa		+	+	+
• Immuno-dot	+	+		
Source antigénique :				
• Extrait nucléaire de thymus de veau		+	+	+
• Extrait de cellules érythroleucémiques de souris	+	+		
Nature de l'antigène				
• Nucléosomes natifs - Mononucléosomes - Polynucléosomes	+		+	
• Complexes ADN - Histones du «core» : - Sans H ₁ - Avec H ₁		+		+

Cependant les nucléosomes peuvent être partiellement dénaturés lors de leur fixation et seulement 10 % du matériel déposé dans les puits des plaques ELISA reste fixé. Certains utilisent une molécule permettant la liaison du nucléosome au plastique, d'autres préfèrent le dépôt des nucléosomes sur de la nitrocellulose activée plus performant pour pallier la perte de déterminants conformationnels. L'immunodot connaît de ce fait un essor pour la recherche de tels anticorps.

c) Applications :

Les résultats sont largement tributaires de l'antigène (nature, conformation, accessibilité des déterminants...) et de la technique utilisés. À l'heure actuelle, il existe plusieurs kits commerciaux pour la détection des anticorps anti-nucléosomes. Leurs caractéristiques figurent dans le tableau ci-contre.

2. Signification :

a) Rôle pathogène.

Le nucléosome apparaît actuellement comme un élément déterminant dans la physiopathologie du lupus systémique, tant chez la souris que chez l'homme. Dans le lupus du chien, par contre, les anticorps anti-ADN double brin et les anticorps anti-nucléosomes sont pratiquement absents alors que les anticorps anti-histones sont très fréquents.

L'apparition des anticorps antinucléosomes précède celle des anticorps anti-ADN chez la souris MRL-Mp. Le nucléosome est incriminé également dans l'apparition des lésions rénales : chez la souris lupique, l'injection de nucléosomes complexés à des anticorps antinucléosomes ou anti-ADN entraîne une fixation de complexes immuns formés sur les molécules d'héparane sulfate de la membrane basale glomérulaire suivie de l'activation du complément, à l'origine de la glomérulonéphrite.

Des modèles pathogéniques ont même été proposés. Les nucléosomes se retrouveraient dans la circulation suite à une production excessive de corps apoptotiques (augmentation de l'apoptose lymphocytaire, irradiation kératinocytaire, infection virale ou bactérienne) amplifiée par un trouble de l'élimination des cellules apoptotiques.

Les nucléosomes circulants induisent alors la formation d'auto-anticorps se fixant sur des nucléosomes «plantés» des membranes basales ou formant des complexes immuns qui se déposent sur les membranes basales glomérulaires ou autres, par exemple kératinocytaires.

b) Signification en pathologie humaine :

Les études concernant la signification des anticorps antinucléosomes diffèrent tant du point de vue technique (utilisation de nucléosomes natifs, sub-nucléosomes, nucléosomes reconstitués...) que du point de vue clinique (groupes de patients en particulier), rendant délicate l'interprétation des résultats.

Près de 85 % des sujets ayant un lupus systémique ont des anticorps antinucléosomes. 16 à 30 % des lupiques ont des anticorps antinucléosomes sans anticorps anti-ADN natif et antihistone.

Au début de la maladie, on observe essentiellement une réactivité dirigée contre le complexe subnucléosomal

(H2A - H2B)₂ - ADN, un peu moins contre le complexe (H3 -H4)₂ - ADN. La théorie du "spreading" épitopique indique qu'au début les anticorps sont des antinucléosomes puisque l'immunisation s'étend ensuite à l'ADN et aux histones.

Considérés initialement comme associés à la néphropathie lupique, ils sont retrouvés chez des patients n'ayant pas d'atteinte rénale et leur titre est corrélé à l'activité clinique.

Aucune donnée concernant la présence d'anticorps antinucléosome natif dans d'autres affections auto-immunes n'existe dans la littérature. Par contre, des anticorps anti-complexes (H2A-H2B)-ADN ont été décrits chez des patients sclérodermiques ou ayant un lupus induit par la procainamide. Dans ce dernier cas, les anticorps réagissent plus fortement avec le complexe H2A-H2B lorsqu'il est associé à l'ADN qu'avec ce complexe non lié à l'ADN.

La sensibilité, la spécificité et la valeur prédictive des anticorps antinucléosomes pour le lupus systémique reste à préciser. En effet, si les anticorps jouent un rôle dans le déclenchement de la réponse immunitaire dans cette affection, leur valeur diagnostique et pronostique pourrait être supérieure à celle des anticorps anti-ADN natif.

Bibliographie

- [1] AMITAL H, SHOENFELD Y. Nucleosomes, DNA and SLE : where is the starting point ?
Clinical and Experimental Rheumatology 1996 ; 14 : 475-477.
- [2] AMOURA Z, CHABRE H, KOUTOUZOV S, LOTTON C, CAPBRESPINE A, BACH JF, JACOB L. Nucleosome-restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or anti-histone antibodies in serum of MRL-Mp Iprlpr and +1+ mice, are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria.
Arthritis Rheum 1994 ; 37 : 1684- 1688.
- [3] BURLINGAME RW, RUBIN RL. Subnucleosome structures as substrates in enzyme-linked immunosorbent assay.
J Immunol Methods 1990 ; 134 : 187- 199.
- [4] BURLINGAME RW, BOEY ML, STARKEBAUM G, RUBIN RL. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus.
J. Clin Invest 1994 ; 94 : 184- 192.
- [5] CHALRE H, AMOURA Z, PIETTE JC, GODEAU P, BACH JF, KOUTOUZOV S. Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus.
Arthritis Rheum 1995 ; 38 : 1485-1491.
- [6] GILBERT D, KOUTOUZOV S, JOVELIN F, BRARD F, TRON F. Nucleosomes and lupus.
Rev Rhum 1997 ; 64 (4) : 210-214.
- [7] HOLMAN HR, KUNKEL HG. Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein.
Science 1957 ; 126 : 162-163.
- [8] KRAMERS C, HYLKEMA MN, VAN BRUGGEN MC, VAN DE LAGEMAAT R, DIJKMAN HB, ASSMANN KJ, SMEENK RJ, BERDEN JH. Antinucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane *in vivo*.
J Clin Invest 1994; 94: 568-577.
- [9] KRAMERS C, VAN BRUGGEN MC, WALGREEN B, ELEMA JD, KALLENBERG CG, VAN DEN BORN J, ASSMANN KJ, MULLER S, MONESTIER M, BERDEN JH. Nucleosome and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis.
J Am Soc Nephrol 1995 ; 6 : 425.
- [10] KRAMERS C, STEMMER C, MONESTIER M, VAN BRUGGEN MC, RIJKE-SCHILDER TP, HYLKEMA MN, SMEENK RJ, MULLER S, BERDEN JH. Specificity of monoclonal antinucleosome autoantibodies derived from lupus mice.
J Autoimmun 1996 ; 9 (6) : 723-729.
- [11] LOSMAN MJ, FASY TM, NOVICK KE, MASSA M, MONESTIER M. Nucleosome-specific antibody from an autoimmune MRL/Mp-Ipr/lpr mouse.
Arthritis Rheum 1993 ; 36 : 552-560.
- [12] LOSMAN MJ, FASY TM, NOVICK KE, MONESTIER M. Relationships among antinuclear antibodies from autoimmune MRL mice reacting with histone H2A-H2B dimers and DNA.
Int Immunol 1993 ; 5:13-523.
- [13] MASSA M, DE BENEDETTI F, PIGRATTI P. Anti-double-stranded DNA, antihistone and antinucleosome IgG reactivities in children with systemic lupus erythematosus.
Clin Exp Rheumatol 1994 ; 12 : 219-225.
- [14] MOHAN C, ADAM S, STANIK V, DATTA SK. Nucleosome : a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus.
J Exp Med 1993 ; 177: 1367-1381.
- [15] MONESTIER M. Autoantibodies to Nucleosomes and Histone - DNA Complexes.
Methods 1997 ; 11 : 36-43.
- [16] MONESTIER M, NOVICK KE, KARAM ET, CHABANNE L, MONIER JC, RIGAL D. Autoantibodies to histone, DNA and nucleosome antigens in canine systemic lupus erythematosus.
Clin Exp Immunol 1995 ; 99 : 37-41.
- [17] NOWEL AUTODIDACTIQUE. Biologie-Geologie.
Quillet S.A. Ed. 1993 (pour la figure 2).
- [18] SMEENK RJT. DNA as antigen in SLE.
Manual of Biological Markers of Disease, Kluwer Academic Publishers 1994 : B 2.1 : 1-15 (pour la figure 1).
- [19] SUENAGA R, MITAMURA K, ABDON NI. Isolation of anti-nucleosome antibodies from the plasma of lupus nephritis patients.
Clin. Rheumatol 1998 ; 17 (3) : 189-194.
- [20] TAX WJ, KRAMERS C, VAN BRUGGEN MC, BERDEN JH. Apoptosis, nucleosomes, and nephritis in systemic lupus erythematosus. Editorial Review.
Kidney Int 1995 ; 48 : 666-673.
- [21] VAN BRUGGEN MC, KRAMERS C, HYLKEMA MN, SMEENK RJ, VAN DEDEM GW, BERDEN JH. Heparin and heparin analogs prevent the binding of immune complexes containing nucleosomal antigens to the GBM and delay nephritis in MRLII mice.
Kidney Int 1995; 48: 1362.
- [22] WALLACE DJ, LIN HC, SHEN GQ, PETER JB. Antibodies to histone (H2A-H2B)-DNA complexes in the absence of antibodies to double-stranded DNA or to (H2A-H2B) complexes are more sensitive and specific for scleroderma related disorders than for lupus.
Arthritis Rheum 1994, 37: 1795-1797.

Signification clinique des anticorps anti-ribosomes anti-P (Po, P1, P2) et anti-non-P

C. Johanel, C. André, A. Baquey, J. Sibilia, F. Oksman, M. San Marco, RL Humbel, MF Taillefer, P. Chrétien, A. Escande, J. Cohen, A. Chevailler, JC Monier, J. Goetz

Les anticorps (Ac) anti-ribosomes ont été décrits par immunofluorescence indirecte (IFI) sur coupes de pancréas et d'estomac de rat pour la première fois en 1974 (1) et ont été confirmés la même année par la microscopie électronique (2). Ces Ac étaient considérés comme des anti-protéines ribosomales et/ou des anti-rARN. Parmi les Ac anti-protéines ribosomales P (anti-P) une majorité est dirigée contre un déterminant antigénique commun aux trois grandes sous-unités phosphoprotéiques ribosomales P0, P1 et P2 de poids moléculaires respectifs de 38, 19 et 17 kD (3). Ils sont fréquemment associés aux Ac anti-nucléaires au cours du lupus érythémateux disséminé (LED) où ils apparaissent comme des marqueurs spécifiques mais peu sensibles, leur fréquence variant selon les études de 10 à 42 % (4-7). Van Dam et al (4) ont rapporté une association entre la présence des Ac anti-P et une augmentation du nombre de critères positifs de l'ACR (American College of Rheumatology), avec surtout une fréquence plus élevée de signes cutanés, ainsi ces auteurs proposent les Ac anti-P comme marqueurs pronostiques pour les formes plus généralisées de LED.

D'autre part Sato et al (7) suggèrent que la présence de ces Ac révèle l'existence de formes cliniques actives. En effet, ces auteurs ont détecté des Ac anti-P chez 42% des patients lupiques avec une maladie active contre seulement 8% chez les patients en phase silencieuse. Enfin, la présence des Ac anti-P est décrite comme très fortement corrélée aux atteintes neuropsychiatriques du LED (8-11), bien que cela soit controversé (4, 6, 12).

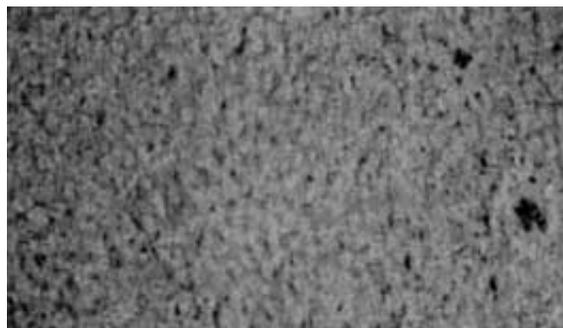
Des Ac reconnaissant d'autres constituants des ribosomes, protéines ou RNA tels que protéines S10 de la petite sous-unité ribosomale, protéines L12 de la grosse sous-unité, complexe L5/5SrARN et 28SrARN, ont été identifiés et décrits au cours du LED (13-16).

Le but de cette étude a été de déterminer la signification diagnostique des Ac anti-ribosomes sur une large population de patients, en séparant les anti-P des Ac ne réagissant pas avec P0, P1 et P2 que nous avons appelés anti-non-P

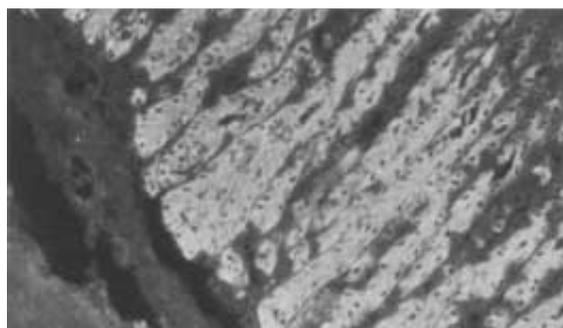
PATIENTS ET MÉTHODES

Une étude multicentrique, comprenant 10 centres hospitalo-universitaires faisant partie du GEAI, a été menée. Celle-ci est rétrospective sur plus de 20 ans (1976-1997) en raison de la rareté des Ac anti-ribosomes. La diversité des centres hospitaliers et des services cliniques impliqués a permis d'éliminer les biais liés au recrutement des patients.

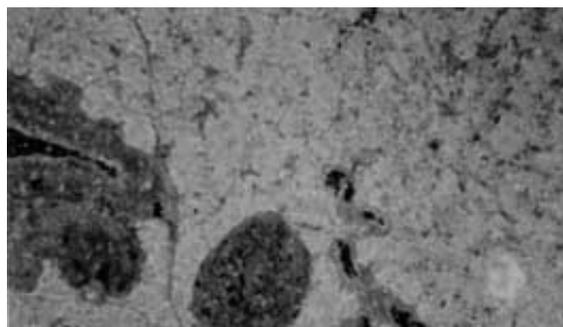
Figure 1 / Détection des anticorps anti-ribosomes par IFI



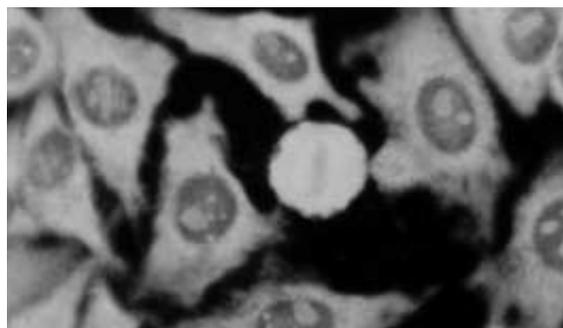
1 A / Foie de rat : fluorescence périmoléculaire en mottes du cytoplasme des hépatocytes.



1 B / Estomac de rat : fluorescence des cellules principales de l'estomac.



1 C / Pancréas de rat : marquage du pancréas exocrine, les îlots de Langerhans sont négatifs.



1 D / Cellules HEP2 : fluorescence laquée du cytoplasme des cellules. Il existe aussi un marquage du nucléole.
Photos C. André

Patients

La sélection des patients a été faite sur les critères suivants :

1- la présence dans leur sérum d'Ac anti-ribosomes détectés par immunofluorescence indirecte sur coupes de foie/rein/estomac/pancréas de rat et sur cellules HEP2.

2- l'analyse du dossier clinique permettant de répondre à un questionnaire pré-établi. Ont été exclus de l'étude les prélèvements pour lesquels les données cliniques et biologiques étaient insuffisantes.

Méthodes

1- Détection des Ac anti-ribosomes par IFI sur coupes de foie/rein/estomac/pancréas de rat et sur cellules HEP2 (figure 1).

Le dépistage est effectué à la dilution de 1/20 des sérums sur coupe de tissus et au 1/40 sur cellules HEP2. Les Ac sont ensuite titrés par dilutions successives du sérum jusqu'au 1/640.

2- Étude de la spécificité des Ac (anti-P ou anti-non-P) par western blot. L'ANA western blot (Biogenex-Menarini, France) a été utilisé. L'antigène est constitué de protéines cellulaires humaines (nucléaires et cytoplasmiques) partiellement purifiées. Les sérums sont dilués au 1/100 et l'antiglobuline utilisée est une anti-IgG (H+L) marquée à la phosphatase alcaline.

Les Ac anti-protéines ribosomales P (anti-P) reconnaissent 3 bandes P0, P1 et P2 respectivement à 38, 19 et 17 kD (figure 2). Les Ac anti-ribosomes ne reconnaissant pas P0, P1 et P2 ont été appelés anti-non-P.

3- Détection des Ac anti-ribosomes par dot-blot

La technique de dot blot (Cyto-Dot-HMO10, BMD) a été utilisée pour rechercher les Ac anti-ribosomes pour une partie des sérums de l'étude. Les antigènes (Ag) sont des protéines P ribosomales extraites de thymus de lapin et/ou de thymus de veau.

4- Analyse statistique

Le test t de student a été utilisé pour comparer les moyennes d'âges des populations présentant des Ac anti-P et anti-non-P, et le test du chi 2 pour comparer les différentes atteintes du LED.

RÉSULTATS

Pathologies associées aux anticorps anti-ribosomes

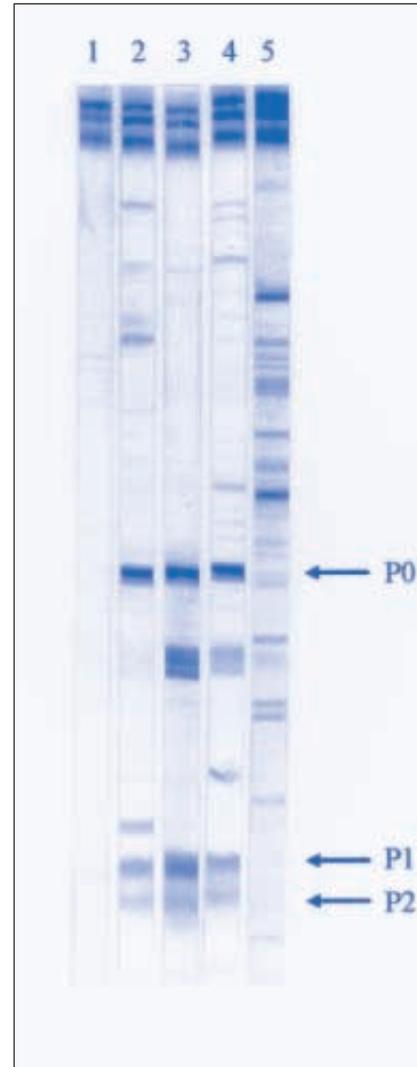
82 patients ayant des anticorps anti-ribosomes (66 femmes, 16 hommes, âge moyen 42 ans, extrêmes 15-90 ans) ont été sélectionnés d'après les critères précédemment définis. L'analyse des dossiers cliniques a révélé 55 LED et 27 autres pathologies (tableau I).

Fréquence des Ac anti-P et anti-non-P en fonction de la pathologie (tableau II)

Parmi les Ac anti-ribosomes détectés par IFI, seulement 54% (44/82) sont des Ac anti-protéines ribosomales P (anti-P). Ces anti-P sont retrouvés dans 69% (38/55) des LED et 22% (6/27) des autres pathologies. La population présentant ces Ac anti-P est constituée de 35 femmes, 9 hommes, d'âge moyen 36 ans, significativement plus jeune que celle avec Ac anti-non-P (31 femmes, 7 hommes, âge moyen 50 ans) : $t = 3,7$ avec $p < 0,001$.

Les Ac anti-non-P représentent 46% (38/82) des Ac anti-ribosomes et sont préférentiellement retrouvés dans les pathologies non lupiques (78% soit 21/27 vs 31% soit 17/55 LED). Un tiers de ces patients non lupiques (7/21) présente une hépatopathie.

Figure 2 / Détection des anti-P par Western blot



1 / Contrôle négatif - 2 à 4 / Ac anti-P - 5 / Sérum de référence

Tableau 1 / Analyse de la population sélectionnée (82 patients)

PATHOLOGIES	N	SEXE	AGE (ANS)
LED (ACR82)*	55 (67%)	45 F/10 H	37 (15-90)
AUTRES			
- maladies systémiques**	10		
- hépatopathies	7	27 (33%)	21 F/6 H
- cancers	3		
- divers	7		

* Référence 17

** Polyarthrite rhumatoïde (4), polymyosite (2), dermatomyosite (1), Sjögren (1), sclérodémie (2)

Tableau 2 / Fréquence des anticorps anti-P et non-P en fonction de la pathologie

PATHOLOGIES	N	Anti-ribosome P		Anti-ribosome non-P		P
		N	%	N	%	
LED	55	38	69	17	31	
Atteinte neurologique		6	15,7	8	47	< 0,01
Atteinte hépatique		7	18,4	3	17,6	NS
Atteinte rénale		16	42	7	41	NS
Atteinte cutanée		26	68,4	11	64,7	NS
Atteinte articulaire		30	78,9	9	52,9	< 0,05
Autres pathologies	27	6	22	21	78	

Chez les patients lupiques, l'atteinte neurologique présente dans 25% des cas (14/55) est majoritairement centrale et psychiatrique (tableau III) et apparaît plus fréquente dans le groupe avec Ac anti-non-P (47% vs 16%, p<0,01), à l'inverse de l'atteinte articulaire plus fréquente dans le groupe avec Ac anti-P (78% vs 53%, p<0,05). La fréquence des atteintes hépatiques, rénales et cutanées n'est pas significativement différente dans les deux groupes (tableau II)

Corrélation western blot - dot blot

Le dot blot a été effectué pour 45 sérums (27 anti-P et 18 anti-non-P). Tous les anti-P ont été détecté par cette technique (tableau IV).

DISCUSSION

Hétérogénéité antigénique des Ac anti-ribosomes

Notre étude a montré l'hétérogénéité antigénique des Ac anti-ribosomes détectés par IFI, les Ac anti-protéines ribosomales P ne représentant que 54% de ceux-ci. De plus, en western blot certains sérums ne réagissant pas avec P0, P1, P2 (anti-non-P) marquent néanmoins d'autres bandes (notamment à 21 kD) qui pourrait correspondre aux autres spécificités antigéniques déjà décrites.

Les résultats obtenus avec le dot blot confirment cette hétérogénéité puisque seuls les anti-P ont été détectés par cette technique. Le dot blot apparaît donc corrélé à la présence d'anti-P en western blot et non à l'IFI. Cette notion avait déjà été évoquée par Roussel et al, pour ces auteurs, seul 57% des Ac anti-ribosomes détectés par IFI sont également détectés par immunodiffusion avec un antigène extrait du thymus de veau et sont spécifiques du LED, le dot-blot étant corrélé au caractère précipitant de l'Ac (18-19). De même, Fujimoto et al (20), ont montré, sur 150 patients atteints de sclérodémie systémique, une fréquence des Ac anti-ribosomes de 22% (33/150) lorsque l'Ac est détecté par IFI sur cellules Hep2. Mais, seulement 4 sérums (2,5%) réagissent en blot avec P0, P1 et P2, les 29 autres sérums (19,5%) correspondant à des anti-non-P, ou à des images en fluorescence mimant les anti-ribosomes comme les anti-tRNA synthétases. En fait, peu d'études utilisent l'IFI et la plupart des données publiées ne concernent que les Ac anti-P recherchés principalement par ELISA utilisant divers Ag (protéines recombinantes ou peptides synthétiques), et confirmés par western blot (6, 11, 21, 22).

Valeur diagnostique des anti-ribosomes

Dans notre étude les Ac anti-ribosomes détectés par IFI ne constituent pas des marqueurs diagnostiques spécifiques du LED, puisque 33% de ces Ac sont présents dans d'autres pathologies. Seuls les Ac anti-pro-

Tableau 3 / Caractéristiques des atteintes neurologiques du lupus en fonction du type d'AC

	LED (ribosome P) n = 6	LED (ribosome non-P) n = 8
Centrales	4 (66,5 %)	5 (62,5 %)
Périphériques	1 (16,5 %)	2 (25 %)
Psychiatriques	3 (50 %)	5 (62,5 %)

Tableau 4 / Comparaison western blot/dot blot pour la détection des Ac anti-ribosomes P

	PO, P1, P2 positifs Western blot	PO, P1, P2 négatifs Western blot
Dot blot positif	27	0
Dot blot négatif	0	18

téines ribosomales P sont retrouvés préférentiellement dans le LED, comme cela est rapporté dans la littérature (4-7, 23). Néanmoins nous avons détecté ces anti-P dans les sérums de 6 patients non lupiques dont 3 atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR). Cette association à la PR n'a, à notre connaissance, pas été rapportée.

L'association des anti-P avec les manifestations neuropsychiatriques du LED est plus controversée. Elle a été décrite par de nombreux auteurs (6, 8, 10, 24) mais réfutée par d'autres (4, 12). Pour Isshi (11) les discordances seraient dues aux différences entre les Ag utilisés. Les problèmes de diagnostic cliniques pourraient aussi expliquer les résultats contradictoires observés selon les auteurs. Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de liaison entre la présence des anti-P dans le sérum des patients lupiques et la fréquence des manifestations neuropsychiatriques de la maladie. Celles-ci semblent au contraire plus fréquentes dans le groupe des patients lupiques avec anti-non-P. Une identification des spécificités non-P semble de ce fait nécessaire.

Nous n'avons pas trouvé de fréquence plus élevée des atteintes hépatiques dans le groupe avec anti-P, contrairement à Arnett (25) et Yoshio (26).

En conclusion, notre étude portant sur 82 patients présentant des Ac anti-ribosomes a permis de préciser plusieurs points :

- les Ac anti-ribosomes détectés par IFI sont hétérogènes et doivent être confirmés par une technique permettant l'identification des anti-P, plus spécifiques du LED.
- les anti-P, bien que préférentiellement rencontrés dans le LED peuvent être présents, mais plus rarement, dans d'autres pathologies notamment la PR.
- l'atteinte neuropsychiatrique du LED ne semble pas liée à la présence des anti-P.

Références

- [1] J.C. Homberg, M. Rizzetto, D. Doniach. Ribosomal antibodies detected by immunofluorescence in systemic lupus erythematosus and other collagenoses. *Clin Exp Immunol* 1974, 12 : 617-628.
- [2] F.B. Bianchi, M. Rizzetto, P. Penfold, G.T. Swana, D. Doniach. Ultrastructural localization and characterization of a ribosomal antibody detected by immunofluorescence in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1974, 17 : 629-636.
- [3] A. Francoeur, C.L. Peebles, K.J. Heckman, J.C. Lee, E.M. Tan. Identification of ribosomal protein autoantigens. *J Immunol* 1985, 135 : 2378-2384.
- [4] A. Van Dam, H. Nossent, J. de Jong, J. Meilof, E.J. ter Borg, T. Swaak, R. Smeenk. Diagnostic value of antibodies against ribosomal phosphoproteins. A cross sectional and longitudinal study. *J Rheumatol* 1991, 18 : 1026-1034.
- [5] E. Bonfa, K.B. Elkon. Clinical and serological associations of the anti-ribosomal P protein antibody. *Arthritis Rheum* 1986, 29 : 981-985.
- [6] F.C. Arnett, J.D. Reveille, H.M. Moutsopoulos, L. Georgescu, K.B. Elkon. Ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. Frequencies in different ethnic groups and clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum* 1996, 39 : 1833-1839.
- [7] T. Sato, T. Uchiyumi, T. Ozawa, M. Kikuchi, M. Nakano, R. Kominami, M. Arakawa. Autoantibodies against ribosomal proteins found with high frequency in patients with systemic lupus erythematosus with active disease. *J Rheumatol* 1991, 18 : 1681-1684.
- [8] E. Bonfa, S.J. Golombek, L.D. Kaufman, S. Skelly, H. Weissbach, N. Brot, K. B. Elkon. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med* 1987, 317 : 265-271.
- [9] A.B. Schneebaum, J.D. Singleton, S.G. West, J.K. Blodgett, L.G. Allen, J.C. Cheronis, B.L. Kotzin. Association of psychiatric manifestations with antibodies to ribosomal P proteins in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1991, 90 : 54-62.
- [10] Y. Nojima, S. Minota, A. Yamada, F. Takaku, S. Aotsuka, R. Yokohari. Correlation of antibodies to ribosomal P protein with psychosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1992, 51 : 1053-1055.
- [11] K. Isshi, S. Hirohata. Association of anti-ribosomal P protein antibodies with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996, 39 : 1483-1490.
- [12] L.S. Teh, A.E. Bedwell, D.A. Isenberg, C. Gordon, P. Emery, P.J. Chaeles, M. Harper, N. Amos, B.D. Williams. Antibodies to protein P in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1992, 51 : 489-494.
- [13] K.B. Elkon, E. Bonfa, N. Brot. Anti-ribosomal antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1992, 18 : 377-390.
- [14] J.L. Chu, N. Brot, H. Weissbach, K. Elkon. Lupus anti-ribosomal P anti-sera contain antibodies to a small fragment of 28Sr RNA located in the proposed ribosomal GTPase center. *J Exp Med* 1991, 174 : 507-514.
- [15] E. Dwyer, R.G. Lahita. Ribosomal autoantibodies. In : Autoantibodies. Ed. J.B. Peter, Y. Shoenfeld, 1996 : 716-720.
- [16] M. Absi, J.P. Lavergne, A. Marzouki, F. Giraud, D. Rigal, A.M. Reboud, J. P. Reboud and J.C. Monier. Heterogeneity of ribosomal autoantibodies from human, murine and canine connective tissue diseases. *Immunol Letters*, 1990, 23 : 35-42.
- [17] E.M. Tan, A.S. Cohen, J.F. Fries, A.T. Masi, D.J. Mc Shane, N.F. Rothfield, J.G. Schaller, N. Talal, R.J. Winchester. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982, 25 : 1271-1277.
- [18] B. Rousset, L. Dubel, M. Kantara-Doukouré, M. Bernard, C. Johanet. Analyse d'une technique de dot-blot pour la détection de trois anticorps (anti-JO1, anti-M2, anti-ribosomes). Comparaison avec les techniques de référence. *Ann Biol Clin* 1995, 53 : 487-490.
- [19] B. Rousset, L. Dubel, M. Kantara-Doukouré, C. Johanet. Anticorps anti-ribosomes et lupus érythémateux disséminé : importance du caractère précipitant de l'anticorps. *Ann Med Int* 1996, 147 : 490.
- [20] M. Fujimoto, S. Sato, K. Takehara, Y. Nojima, Y. Soma, K. Kikuchi, H. Ihn, A. Igarashi, K. Tamaki. Detection of anti-ribosomal P protein antibodies in patients with systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1995, 34 : 908-911.
- [21] T. Watanabe, T. Sato, T. Uchiyumi, M. Arakawa. Neuropsychiatric manifestations in patients with systemic lupus erythematosus : diagnostic and predictive value of longitudinal examination of anti-ribosomal P antibody. *Lupus* 1996, 5 : 178-183.
- [22] J. Press, K. Palayeuw, R.M. Laxer, K. Elkon, A. Eddy, D. Rakoff, E.D. Silverman. Anti-ribosomal P antibodies in pediatric patients with systemic lupus erythematosus and psychosis. *Arthritis Rheum* 1996, 39 : 671-676.
- [23] E. Bonfa, H. Weissbach, N. Brot, K.B. Elkon. Ribosomal P protein autoantibodies. In : Autoantibodies. Ed. J.B. Peter, Y. Shoenfeld, 1996 : 721-726.
- [24] S.G. West, W. Emlen, M.H. Wener, B.L. Kotzin. Neuropsychiatric lupus erythematosus : a ten year prospective study on the value of diagnostic tests. *Am J Med* 1995, 99 : 153-156.
- [25] F.C. Arnett, M. Reichlin. Lupus hepatitis : an under recognized disease feature associated with autoantibodies to ribosomal P. *Am J Med* 1995, 99 : 465-472.
- [26] T. Yoshio, JI Masuyama, S. Minota, N. Kaneto, M. Iwamoto, H. Okazaki, A. Mimori, A. Takeda, S. Kano. A close temporal relationship of liver disease to anti-ribosomal P0 protein antibodies and central nervous system disease in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998, 25 : 681-688.

► THE PRESENCE OF MASKED ANTIROBOSOMAL P AUTOANTIBODIES IN HEALTHY CHILDREN

Camille J. Anderson, Barbara R. Near, Zijian Pan, Elisabeth Taylor-Albert, Morris Reichlin and Haraldine A. Stafford

Arthritis & Rheumatism 1998, 41 : 33-40

Les anticorps anti-protéines P ribosomales seraient plus fréquents dans les lupus érythémateux disséminés du jeune que de l'adulte et dans les formes s'accompagnant de glomérulonéphrite et de psychoses. Après avoir étudié une série de sujets sains adultes, l'équipe de REICHLIN a étendu son étude à 88 enfants sains de 8 mois à 18 ans (moitié de sexe masculin, moitié de sexe féminin).

Par méthodes standard Elisa et Immunoblot, aucun anticorps anti-protéine P n'a été décelé.

Sur 79 de ces sérums a été réalisée une purification d'affinité sur protéines ribosomales immobilisées sur membrane. Dans les éluats acide@ non dilués, de ces membranes ont été recherchés les IgG et les IgM anti-protéines P par des immunoblots anti-ribosomes de haute spécificité (grande quantité d'antigène ribosomal, plus longue incubation) et Elisa sur Peptide P Ribosomal contenant l'épitope inunodononant (extrémité C-terminale communes aux protéine P). Ce sont des IgG anti-P "masquées" qui ont été trouvées dans tous les sérums puisqu'elles ont été seulement identifiées dans l'éluat acide.

Des IgM anti-P étaient présentes dans 34,2 % des éluats et 8,9 % des sérums et, ceci, chez les enfants de moins de 6 ans.

Il ne s'agissait pas d'un problème quantitatif car les éluats contiennent moins d'IgG que les sérums.

La purification d'affinité enlève des inhibiteurs des anticorps anti-P. Les activités anti-P des IgG et IgM des éluats acides sont complètement inhibées par le peptide P. Les IgG anti-P des sujets sains jeunes ou adultes sont similaires aux IgG anti-P des L.E.D.. Pour déterminer si les anti-P des enfants étaient masqués par des anticorps inhibiteurs IgG, des fractions IgG ont été préparées à partir de deux sérums d'enfants et déplétées en anti-P par passage sur colonne contenant le recombinant ribosomal P2. A concentration physiologique, ces fractions inhibent complètement l'activité anti-P en immunoblot spécifique. Une fraction déplétée en IgG n'inhibe pas l'activité anti-P. Ceci prouve qu'il existe chez l'enfant sain des Ac IgG qui inhibent les anticorps anti-P. S'agit-il d'un réseau régulateur idiotype anti-idiotype ? C'est la question que se posent les auteurs.

Commentaires : Les méthodes de purification d'affinité ne sont pas très explicites. Des études complémentaires sont nécessaires pour démontrer la nature exacte des IgG inhibant les anti-P.

► PARTICIPATION DE LA CITRULLINE A LA CONSTITUTION DES ÉPITOPES RECONNUS PAR LES ANTICORPS ANTIFILAGRINE (FILAMENT AGGREGATING PROTEIN)

Les anticorps (Ac) antipéridinucléaires et les anticorps soit disants antikératine, qui se recherchent par immunofluorescence indirecte, sont au moins partiellement les mêmes Ac. Ces Ac reconnaissent majoritairement la fila-

grine qui dans les cellules épithéliales "emballe" les filaments de kératine. Les 2 articles suivants montrent que la filagrine réagit avec les autoAc précédents parce qu'une partie de ses arginines est convertie en citrullines (déimination). Les Ac antifilagrine apparaissent très spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde (PR).

Les auteurs de l'article 1 montrent (ELISA et immunoblot) avec des peptides de synthèse que les épitopes majeurs reconnus par les antifilagrine sont situés du côté de l'extrémité C-terminale comprenant les acides aminés 306-324. Le peptide 306-324 ne réagit que si au moins une arginine a subi une déimination. La réaction est plus forte si 2 arginines sont converties en citrullines. Près de 10% des sérums de PR contenant des Ac antipéridinucléaires sont négatifs avec les peptides 306-324 réactifs. Cependant un petit nombre de ces 10% de sérums réagissent avec un autre peptide de la filagrine (acides aminés 48-65) portant 2 citrullines.

Les auteurs de l'article 2 utilisent ELISA et immunoblot pour étudier les épitopes de la filagrine reconnus par les autoAc des PR. Des recombinants de la filagrine de 28 à 66kDa, produits par *E. coli* lorsqu'ils subissent in vitro une déimination progressive par une peptidylarginine déiminase, acquièrent une capacité croissante de réagir avec des sérums de PR riches en Ac antifilagrine. Beaucoup des Ac de sérums de PR antifilagrine immunopurifiés par affinité peuvent réagir avec 3 peptides de synthèse centrés sur une citrulline ayant de fortes homologues avec différents régions de la filagrine. Donc, la citrulline est importante pour la constitution des épitopes reconnus par les autoAc des PR. Cependant, n'importe quel peptide citrulliné autre que ceux de la filagrine ne réagit pas avec les autoAc antifilagrine.

Dans les 2 articles, il apparaît que chaque serum a un profil différent de reconnaissance des peptides de synthèse. De plus la richesse en peptidylarginine déiminase de la synoviale permet d'émettre l'hypothèse que l'auto-Ag responsable de l'auto-immunisation dans la PR serait un Ag synovial dont les arginines seraient converties en citrullines.

Ces travaux ne permettent actuellement de penser qu'on pourra remplacer la filagrine d'extraction par des polypeptides citrullinés.

► 1- Citrulline is an Essential Constituent of Antigenic Determinants Recognized by Rheumatoid Arthritis-specific Autoantibodies

Gérard A. Schellekens, Ben A.W. De Jong, Frank H.J. Van Den Hoogen, Leo B.A. Van De Putte, and Walther J. Van Venrooij

J. Clin. Invest. 1998, 101: 273-281

► 2- The Epitopes Targeted by the Rheumatoid Arthritis-Associated Antifilaggrin Autoantibodies are Post-translationally Generated on Various Sites of (Pro) Filaggrin by Deimination of Arginine Residues

Elisabeth Girbal-Neuhauser, Jean-Jacques Durieux, Michel Arnaud, Pascal Dalbon, Mireille Sebbag, Christian Vincent, Michel Simon, Tatsuo Senshu, Christine Masson-Bessière, Colette Jolivet-Reynaud, Michel Jolivet, and Guy Serre

J. Immunol. 1999, 162: 585-594.

Rapport du 8^{ème} Symposium sur les anticorps antiphospholipides (Sapporo, Japon, 6-9 Octobre 1998)

Depuis 1984, a lieu, tous les deux ans, un Symposium International consacré aux anticorps antiphospholipides (aPLs). En fait, cette manifestation est ciblée sur tous les aspects biologiques et cliniques d'un syndrome caractérisé par la présence d'aPLs et d'anomalies thrombotiques récurrentes : le syndrome des antiphospholipides (SAPL). Le terme d'aPLs est très large et, dans le cadre de ce syndrome, il désigne essentiellement des anticorps capables de reconnaître des phospholipides associés à des protéines plasmatiques voire les protéines elles-mêmes. Depuis quelques années, de nombreuses études ont tenté de définir ces protéines et de comprendre leur rôle dans la pathogénie. Parmi elles, la plus connue est la bêta2 glycoprotéine I (β 2-GPI). Au cours de ce symposium, le programme comprenait les thèmes les plus classiques du SAPL : les anticorps anti- β 2-GPI (a- β 2-GPI) et les anticoagulants lupiques (La). Concernant les aspects cliniques du SAPL, JC Piette a proposé une réévaluation des critères, le consensus est difficile à atteindre, et ce, d'autant plus qu'il s'avère que ce syndrome est très hétérogène quant à ses manifestations cliniques et biologiques. Des 'variants' caractérisés par la présence d'anomalies cliniques et l'absence d'anticorps antiphospholipides anioniques ont été décrits et soulèvent le problème de la redéfinition de ce syndrome et la nécessité de la recherche d'autres marqueurs biologiques. Il n'y a pas eu de 'scoop' mais l'approfondissement de nos connaissances sur ce syndrome connu depuis seulement 15 ans. Au cours de deux conférences, les Dr Matsuuda et Shoenfeld, ont passé en revue les différents arguments qui permettent d'affirmer qu'il existe un lien étroit entre l'athérosclérose et le SAPL. En particulier, ils ont rappelé le rôle des aPLs dans l'athérogénèse par leur réactivité croisée avec les LDLox et l'inhibition de l'activité anti-athérogène de la β 2-GPI, ainsi que la démonstration de l'effet athérogène des aPLs in vivo par des modèles murins. Il est difficile de rapporter tous les travaux présentés, étant immunologiste et m'adressant à des biologistes, j'ai focalisé ce rapport sur les études concernant les marqueurs immunologiques du SAPL et parmi elles, j'en ai sélectionné certaines.

1/ La- β 2-GPI et les anticorps

La β 2-GPI est une protéine plasmatique organisée en 5 domaines appelés domaines «sushi». Il est connu depuis peu que le site de liaison des aPLs à la β 2-GPI est situé sur le domaine V. Au cours de ce symposium les travaux d'Horbach et al. et de Kato et al. ont rapporté que la β 2-GPI est clivée au cours de l'activation de la fibrinolyse au niveau du domaine V par la plasmine. Cette forme clivée perd sa capacité à se lier aux phospholipides anioniques, elle est présente dans le plasma de patients ayant un SAPL mais pas dans celui de sujets normaux. Enfin, diverses études ont montré que d'autres domaines peuvent contenir des sites de liaison aux aPLs, accroissant ainsi l'hétérogénéité de ces anticorps :

- Sur le domaine I, plusieurs régions chevauchantes pourraient contribuer à la liaison des aPLs (*McNeeley et al* ; *E Smith et al.*). De plus, Kouts et al. ont rapporté que l'activité LA n'est observée qu'en présence d'anticorps anti- β 2-GPI dirigés contre le domaine I.
- Sur le domaine IV, certains motifs normalement masqués par le domaine III sont reconnus par des aCL de patients ayant un SAPL. Ces motifs apparaîtraient après interaction de la β 2-GPI avec les phospholipides (Kasahara et al).

Les anticorps anti- β 2-GPI : leur étroite association avec les anomalies du SAPL, thromboses et pertes fœtales, a été confirmée. Aussi, la nécessité d'une standardisation de l'ELISA anti- β 2-GPI est-elle devenue primordiale. Une étude multicentrique coordonnée par J Arvieux au sein du Forum Européen des aPLs a analysé les variations inter laboratoires. Il ressort de ce travail que le taux de positivité des IgG-anti- β 2-GPI varie de 50 à 93% entre les centres (19 centres) et qu'une grande partie des discordances viendrait d'une valeur seuil mal définie et de l'absence de standards de références qui restent à établir. Les mécanismes d'action des anti- β 2-GPI et de la β 2-GPI sont mal connus. Plusieurs études sur l'aspect fonctionnel de ces acteurs du SAPL ont été présentées :

- Les anticorps issus de patients ayant un SAPL diminuent l'inhibition de l'activation du Facteur X par le facteur tissulaire en présence de β 2-GPI et de phospholipides anioniques (Salemink et al.).
- La β 2-GPI pourrait modifier la fonction des cellules endothéliales par la libération de médiateurs vaso-actifs, et ainsi, la liaison des aPLs à la β 2-GPI induirait des perturbations de ses propriétés physiologiques pouvant amener la formation de thrombus.

2/ Les anticardiolipide (aCL)

Ils sont passés au second plan, mais il faut retenir le projet européen de standardisation des tests ELISA pour le dosage de ces anticorps présenté par le docteur A. Tincani avec la participation de 23 laboratoires (Forum Européen des aPLs). Un premier travail montre que les discordances sont plus fréquentes dans le cas de sérums ayant des taux faibles ou moyens (50% des cas).

Parallèlement à ce travail, la même équipe a analysé à l'aide d'un questionnaire détaillé, les tests utilisés par 29 centres pour l'exploration du SAPL et les méthodes employées, seules ou associées : les tests les plus utilisés sont les ELISA aCL (29/29) ; a β 2-GPI (19/29), LA (24/29). Les détails des méthodes employées serviront à établir une méthode de consensus qui pourra être proposée au plus grand nombre afin de diminuer les variations inter laboratoires.

3/ Les LA et leurs cofacteurs

A coté de la β 2-GPI, la prothrombine (PT) et l'annexine V (ANV) sont connues comme cofacteurs des LA. Des anticorps capables de reconnaître ces protéines ont été décrits au cours du SAPL. Des différentes études, on peut retenir :

- Sur les anti-PT, des résultats divers ont été rapportés comme :
 - leur association avec des thromboses chez les patients ayant une maladie autoimmune et des anticorps de type LA (Khamashta et al.).
 - leur présence chez 42% de patients ayant un SAPL, mais sans association avec un type de thrombose, veineux ou artériel (Whitley et al.) ; 48 % de patients ayant des thromboses et 88 % des LA (Atsumi et al.) ; 44% de patients ayant un LA avec une plus forte association avec les thromboses que les anti- β 2-GPI (Ordi-Ros et al.) ; dans un grand nombre de maladies autres que le SAPL (Guérin et al.).
- Sur les anti-ANV :
L'ANV a une activité anticoagulante in vivo et montre, in vitro, un fort tropisme pour les phospholipides anioniques. Donohe et al. ont montré que, lors de la gestation, l'expression de l'ANV sur le syncytiotrophoblaste

était diminuée chez les patients ayant un SAPL. Les anticorps anti-ANV pourraient jouer un rôle dans les complications obstétricales en modifiant l'expression de cette protéine.

4/ Les anticorps anti-phosphatidyléthanolamine (aPE)

L'intérêt de ces anticorps peu étudiés commence à émerger. Plusieurs groupes ont rapporté leur association avec le SAPL (Ordi-Ros et al. ; Mc Intyre et al.). Ce qui accroît leur intérêt est leur présence chez des patients ayant des caractéristiques cliniques du SAPL mais pas d'anticorps antiphospholipides classiques : aCL, LA ou a- β 2-GPI (Wagenknecht et al. ; Sanmarco et al.). Les cofacteurs les plus connus des aPE sont les Kininogènes mais à Sapporo, Sugi et al. ont montré que certains aPE pourraient reconnaître comme cofacteur, le facteur XI. Le syndrome des antiphospholipides est une entité encore mal définie et de nombreuses études sont nécessaires pour une meilleure compréhension de ce syndrome et une meilleure approche diagnostique et thérapeutique.

Le 9^{ème} Symposium des aPLs se tiendra du 12 au 16 Septembre 2000 en France, à Tours. Les nombreuses études, tant cliniques que biologiques, qui y seront présentées permettront d'élargir nos connaissances sur les différents aspects de ce syndrome si complexe.

Marielle SAN MARCO
Laboratoire d'immunologie
Hôpital de la Conception - Marseille

17 membres du GEAI

René-Louis HUMBEL

Président du GEAI
CH Luxembourg
Laboratoire Biochimie & Immunopathologie
4, rue Barblé - L-1210 LUXEMBOURG
Luxembourg
Tél : 00 352 44 11 21 78 - Fax : 00 352 45 77 94
E.mail : humbel.rl@chl.lu

E REBIFFE

Trésorier du GEAI
SANOFI PASTEUR
3 bd R. Poincaré 92430 MARNES LA COQUETTE
Tél : 01 47 95 62 56 - Fax : 01 47 95 62 20
E.mail : jean-pierre.claudiel@sanofi.com

Isabelle BENOIT-GONIN

Secrétaire du GEAI
SANOFI PASTEUR
3 bd R. Poincaré - 92430 MARNES LA COQUETTE
Tél : 01 47 95 62 56 - Fax : 01 47 95 62 20
E.mail : isabelle.benoit-gonin@sanofi.com

Chantal ANDRE

CHU Henri Mondor
Service d'Immunologie Biologique
51, av. du Mal de Lattre de Tassigny - 94010 CRETEIL
Tél : 01 49 81 28 86 ou : 01 49 81 22 98 (sec)
Fax : 01 49 81 28 97
E.mail : chantal.andre@hmn.ap-hop-paris.fr

Annie BAQUEY

CHU Pellegrin
Laboratoire Immunologie - Hématologie
Place Amélie Raba Léon - 33076 BORDEAUX Cedex
Tél : 05 56 79 56 45 (sec)
ou 05 56 79 56 79 poste 143-43
Fax : 05 56 79 60 79

Alain CHEVAILLER

CHU ANGERS
Laboratoire d'Immunopathologie
49033 ANGERS Cedex 01 - Tél : 02 41 35 47 89
ou : 02 41 35 35 77 - Fax : 02 41 35 47 83
E.mail : alchevailler@chu-angers.fr

Pascale CHRETIEN

CHU - Sce Hématologie et Immunologie
49, avenue de Verdun - 94000 CRETEIL Cedex
Tél : 01 45 17 53 88 ou 01 45 17 53 33 (sec)
Fax : 01 45 17 53 49

Jacques COHEN

CHU Robert Debré
Laboratoire d'Immunologie
Rue du Général Koenig - 51092 REIMS Cedex
Tél : 03 26 78 72 37 ou 03 26 78 72 58 (sec)
Fax : 03 26 86 51 97

Andrée ESCANDE

CHU Saint Eloi
Laboratoire d'Immunologie
Service du Pr. Clot, avenue Bertin Sens
34295 MONTPELLIER Cedex
Tél : 04 67 33 71 35 - Fax : 04 67 33 71 29

Joëlle GOETZ

CHU Haute-pierre
Laboratoire d'Immunologie
Avenue Molière - 67098 STRASBOURG Cedex
Tél : 03 88 12 75 26 - Fax : 03 88 12 81 34

Catherine JOHANET

CHU Saint Antoine
Laboratoire Central d'Immunologie
184, Fbg St Antoine - 75571 PARIS Cedex 12
Tél : 01 49 28 20 11 - Fax : 01 49 28 21 43

Jean-Claude MONIER

20, rue de l'Oratoire - 69300 CALUIRE
Tél : 04 78 29 66 86 (personnel)
04 78 86 66 81 (hôpital) Fax : 04 78 87 26 17
(école vétérinaire)

Françoise OKSMAN

CHU Purpan
Laboratoire d'Immunologie
Place du Dr Baylac - 31059 TOULOUSE Cedex
Tél : 05 61 77 90 60 ou 05 61 77 90 61 (sec)
Fax : 05 61 77 90 76

Nils Olivier OLSSON

CHU
Laboratoire d'Immunologie
2, bd du M. de Lattre de Tassigny - BP 1542 - 21034 DIJON Cedex
Tél : 03 80 29 33 72 ou 03 80 29 32 26 (labo)
Fax : 03 80 29 37 87
E.mail : nils.olsson@chu-dijon.fr

Marielle SAN MARCO

Hôpital de la Conception - Pavillon Cornil
Laboratoire d'Immunologie
147, boulevard Baille - 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tél : 04 91 38 39 70 ou 04 91 38 39 08 ou 39 07 (sec)
Fax : 04 91 38 36 33
E.mail : msanmarco@ap-hm.fr

Jean SIBILIA

CHU Haute-pierre
Service Rhumatologie
67098 STRASBOURG
Tél : 03 88 12 79 49 ou 03 88 12 79 55
Fax : 03 88 12 81 50
E.mail : jean.sibilia@wanadoo.fr

Marie-France TAILLEFER

ENTS
Laboratoire Immunologie Médicale
21, rue Camille Guérin
BP 2018 - 59012 LILLE Cedex
Tél : 03 20 49 43 43 ou 03 20 49 43 83
Fax : 03 20 49 43 85

CALENDRIER DES MANIFESTATIONS EN AUTOIMMUNITÉ

• 9th INTERNATIONAL SYMPOSIUM
ON ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES
September 12-16 2000, Tours, France

• 5th DRESDEN SYMPOSIUM ON
AUTOANTIBODIES
25th - 28th October 2000
Germany

E-mail : k-conrad@rcs.urz.tu-dresden.de

• COLLOQUE GEAI 2000
23 juin 2000, Paris, France

• ACR
November 13-17, 1999, Boston, USA

• 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
SJOGREN'SYNDROME
December 2-4 1999, Venice, Italy

E-mail : bombardieri@clinexrheumatol.org

• XXVIII^e COLLOQUE NATIONAL
DES BIOLOGISTES DES HOPITAUX
4-8 octobre 1999, Colmar, France



Parution biannuelle

RÉDACTEUR EN CHEF : Jean-Claude MONIER - ÉQUIPE DE RÉDACTION : Chantal ANDRÉ, Annie BAQUEY, Alain CHEVAILLER, Pascale CHRETIEN, Jacques COHEN, Andrée ESCANDE, Joëlle GOETZ, René-Louis HUMBEL, Catherine JOHANET, Françoise OKSMAN, Marielle SAN MARCO, Jean SIBILIA, Marie-France TAILLEFER

SANOFI PASTEUR, 3 bd R. Poincaré 92430 Marnes La Coquette
Secrétariat du GEAI : tél : 01 47 95 62 56 - fax : 01 47 95 62 20
Email benedictte.guyot@sanofi.com
Conception et réalisation IEEP : 01 42 26 55 03

sanofi
PASTEUR