

Comment interpréter un résultat d'auto-anticorps ? Les pièges diagnostiques

Daniela Lakomy^{a,*}, Joëlle Goetz^b

1. Introduction

Le diagnostic des maladies auto-immunes (MAI) est basé sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques. La présence d'auto-anticorps (autoAc) corrobore le diagnostic ou l'oriente, si le tableau clinique est incomplet ou atypique. La mise en évidence d'autoAc fait appel, en fonction de l'Ac recherché, à une démarche

- soit en une étape, avec une recherche/identification directe de la spécificité de l'Ac prescrit par le clinicien ;
- soit en deux étapes, avec un test de dépistage par immunofluorescence indirecte (IFI) suivi, en cas de positivité, d'une technique d'identification spécifique des autoAc.

L'interprétation du bilan auto-immun consiste à apprécier la cohérence des résultats entre l'IFI et les techniques d'identification d'une part et le contexte clinique d'autre part. Cela sous-entend une bonne maîtrise des techniques utilisées et de leurs pièges, ainsi qu'une collaboration étroite entre les biologistes et les cliniciens. Le résultat rendu aux cliniciens doit être dépourvu d'ambiguïté. Nous présentons ici des exemples quasi-quotidiens d'interprétation en auto-immunité.

2. Comment interpréter les résultats de l'IFI par rapport aux techniques d'identification des autoAc ?

Le dépistage d'autoAc par IFI sur des cultures cellulaires ou coupes de tissus suppose une parfaite connaissance des structures cytologiques ou histologiques reconnues par les autoAc. Après avoir éliminé d'éventuels pièges

a Laboratoire d'Immunologie

CHU – Plateau Technique de Biologie
2, rue Angélique Ducoudray
21079 Dijon Cedex

b Laboratoire d'Immunologie

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
1, place de l'Hôpital
67091 Strasbourg Cedex.

* Correspondance

daniela.lakomy@chu-dijon.fr

techniques, les images de fluorescence observées sont confrontées aux résultats des techniques d'identification. Plusieurs cas de figure peuvent être illustrés.

2.1. Les résultats de l'IFI et des techniques d'identification sont cohérents

Une attention particulière doit néanmoins être portée à l'expression des résultats de l'IFI, comme des techniques d'identification, pour ne pas porter à confusion.

Pour la recherche des Ac antinucléaires (ANA) par IFI, la terminologie des aspects de fluorescence n'est pas consensuelle malgré plusieurs publications en ce sens [1, 2, 3]. Les aspects de fluorescence peuvent orienter vers certaines cibles antigéniques, et par conséquent, le clinicien doit être informé de la signification des termes utilisés par le laboratoire.

Un certain nombre d'autoAc sont des marqueurs de MAI et doivent être identifiés avec précision (Ac anti-ENA [*extractable nuclear antigen*], ANCA [*antineutrophil cytoplasmic antibodies*],...). Ainsi, une confusion peut être facilement introduite en rendant un résultat positif d'Ac anti-SS-A/Ro sans différencier la forme SS-A/Ro 60 et la forme SS-A/Ro 52. Le risque est d'interpréter la positivité d'un Ac anti-SS-A/Ro 52 (ou TRIM 21), sans réelle valeur diagnostique, comme un Ac anti-SS-A-/Ro 60, fortement associé au syndrome de Gougerot-Sjögren, au LES (lupus érythémateux systémique) ou au lupus cutané subaigu [4, 5].

2.2. L'IFI est positive mais la technique d'identification est négative

Après analyse, ce cas de figure peut s'avérer cohérent. Par exemple, une fluorescence évocatrice d'Ac anti-ribosomes sur cellules HEp-2 et sur coupes de rein-foie-estomac peut ne pas correspondre aux cibles antigéniques P0, P1, P2 recherchées par ELISA ou immunodot. Seuls les Ac anti-ribosomes de spécificité anti-phosphoprotéines P, surtout anti-P0, ont une signification clinique prouvée, préférentiellement dans le LES. Si leur recherche est négative, et après avoir éliminé la présence d'Ac anti-SRP (signal recognition particle) qui donnent la même image de fluorescence sur les deux substrats, on peut conclure à la présence d'Ac anti-ribosomes non-P [5].

Devant un aspect évocateur en IFI sans identification d'autoAc, il faut rester néanmoins très vigilant et ne pas oublier que la reconnaissance d'une cible antigénique par un autoAc dépend de la technique utilisée, en lien

avec les conditions de réaction, la nature des antigènes (natifs purifiés, recombinants, peptides de synthèse), leur qualité (pureté, stabilité, configuration moléculaire) et leur adsorption sur le support (puits ELISA, microbilles, bandelettes de nitrocellulose) [5]. Il n'est pas rare que plusieurs techniques soient employées avant d'arriver à la conclusion finale.

2.3. La technique d'identification est positive mais l'IFI ne met pas en évidence un aspect évocateur de l'autoAc

La technique d'identification peut rendre positif un autoAc en l'absence d'un aspect évocateur en IFI. Cette situation nécessite également un éclaircissement avant le rendu du résultat et les deux techniques méritent d'être analysées. Il est utile de revoir l'aspect et le titre en IFI, voire de réaliser une technique d'IFI sur un autre substrat quand cela est possible. Pour les résultats de la technique d'identification, plusieurs aspects sont à analyser : niveau de positivité (limite supérieure de la normale, faible, élevé), possibilité de confirmation/vérification par un autre test, faille technique connue, polyréactivité du sérum, ... Parfois, quelques règles simples d'interprétation permettent d'éviter ce type de piège, comme par exemple, pour l'immunodot, de comparer les résultats rendus par un lecteur de dots avec l'aspect visuel des bandelettes. En cas d'un ou plusieurs résultats positifs non cohérents avec l'IFI, l'observation d'un marquage de tous les spots permettra de conclure à une réaction non spécifique plutôt qu'à une vraie positivité.

L'interprétation dans le contexte clinique et le dialogue avec le clinicien apportera un poids capital pour le rendu final.

3. Comment interpréter la présence d'autoAc en l'absence d'une MAI ?

Les ANA sont les autoAc les plus prescrits en pratique médicale. Une situation souvent rencontrée en pratique courante est la positivité des ANA par IFI sans présence d'Ac anti-ADN double brins (ADNdb) ou Ac anti-ENA. La positivité des ANA par IFI ne doit pas être interprétée à tort comme étant synonyme d'une MAI.

En effet, la technique d'IFI est une technique sensible, très utile pour orienter le bilan complémentaire, mais non spécifique. Elle a l'avantage d'utiliser des cellules exprimant les antigènes dans leur forme native, ce qui permet de capter une grande diversité d'autoAc sériques [6]. Tous ces Ac n'ont pas la même signification. L'interprétation d'un résultat d'ANA par IFI doit tenir compte de l'aspect d'immunofluorescence, du titre et doit être replacée dans le contexte clinique.

La présence d'ANA sans Ac anti-ADNdb ou Ac anti-ENA, peut correspondre à une situation de **dysrégulation immunitaire** qui peut se rencontrer dans des contextes variés :

- infections aiguës ou chroniques : virales (virus d'Epstein-Barr, VIH, VHC, parvovirus B19, virus coxsackie...), bactériennes (borréliose, tuberculose, endocardites...) ou parasitaires (leishmaniose). L'aspect de fluorescence est variable, les titres peuvent être élevés et la positivité des ANA est transitoire [7, 8].
- certaines prises médicamenteuses : β -bloquants, interféron α , isoniazide, minocycline, anti-TNF α ... [9, 10].
- tumeurs solides ou hémopathies malignes. Dans ce contexte, certains aspects de fluorescence particuliers ont été décrits, comme l'aspect anti-pseudo-PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) et l'aspect anti-CENP-F (protéine centromérique F) ou MSA3 (*mitotic spindle apparatus* 3). Il s'agit d'aspects rares et l'identification de l'antigène cible n'est pas réalisée en routine. Si les Ac anti-CENP-F ne sont pas fréquents au cours des cancers (< 10 %), près de 50 à 70 % des patients ayant des Ac anti-CENP-F ont un cancer [11]. L'aspect pseudo-PCNA de type 1 a été observé dans quelques cas de cancer du sein, du côlon, mais également chez des sujets ne présentant aucune néoplasie au moment de l'examen [12]. Il apparaît prudent de préconiser la recherche d'un cancer, au minimum par une approche anamnestique et clinique, chez les patients ayant une recherche d'Ac anti-pseudo-PCNA positive [13].

La positivité des ANA par IFI sans Ac anti-ADNdb ou Ac anti-ENA peut correspondre à l'expression d'un **terrain autoimmun** :

- il peut s'agir des premiers signes d'une connectivite qui n'est encore pas suffisamment parlante cliniquement [14, 15],
- ou le reflet d'un terrain autoimmun au cours des pathologies autoimmunes autres que les connectivites. En effet, des ANA positifs peuvent être retrouvés au cours de la polyarthrite rhumatoïde, des thyroïdites auto-immunes, du purpura thrombopénique idiopathique, de la sclérose en plaques, de l'arthrite juvénile idiopathique [5].

Des ANA positifs, souvent de titre élevé et sans Ac anti-ADNdb ou anti-ENA, peuvent présenter un aspect de fluorescence particulier appelé « **dense fine speckled** », évocateur de la présence des Ac anti-DFS-70 (*dense fine speckled* 70). La positivité isolée de ces Ac a été décrite dans des contextes cliniques très variés et plus souvent chez des sujets indemnes d'une pathologie auto-immune [16, 17, 18].

Lors de la détection des ANA, certaines images de fluorescence peuvent correspondre à des aspects **sans association clinique spécifique**. C'est le cas des aspects évocateurs des Ac anti-vimentine, anti-centrioles, anti-« somes »... pour lesquels il n'existe pas de tests d'identification en routine [19]. S'ils sont rendus, il est utile de préciser par un commentaire leur manque de signification.

Enfin, il ne faut pas oublier que des ANA positifs peuvent être retrouvés également chez des sujets apparemment sains.

Souvent le titre est faible, 10-15 % des sujets adultes apparemment sains ont des ANA positifs au titre de 80 et 5 % au titre de 160. La fréquence augmente avec l'âge, principalement chez les femmes après 60 ans [20].

4. Comment interpréter l'« absence » d'autoAc en présence d'une MAI ?

Un piège pouvant conduire à des résultats faussement négatifs est l'utilisation de techniques inappropriées pour la recherche de certains autoAc. C'est le cas **des autoAc qui ne sont pas détectables par IFI** (Ac anti-SLA [*soluble liver antigen*], Ac anti-facteur intrinsèque, certains Ac anti-SS-A/Ro, certains Ac anti-Jo-1, certains Ac anti-ARNt synthétases ou encore les Ac anti-membrane basale glomérulaire en cas d'utilisation des coupes de rein non traitées à l'urée) et pour lesquels la technique d'IFI n'est donc pas contributive. D'autres autoAc (Ac anti-MDA-5 [*melanoma differentiation-associated gene-5*], Ac anti-TIF1 gamma [*transcriptional intermediary factor*]) ne donnent **pas d'images suffisamment typiques par IFI** pour conduire à une identification ciblée ; le recours à d'autres techniques d'identification est nécessaire [21].

Un cas particulier, lors de la recherche des ANA par IFI sur cellules HEp-2, est la présence d'une **fluorescence cytoplasmique**. En l'absence d'un marquage nucléaire, le risque est de rendre un résultat négatif (« absence d'anticorps antinucléaires ») sans tenir compte du marquage cytoplasmique. La fluorescence cytoplasmique doit être signalée dès lors qu'elle évoque la présence des Ac marqueurs d'une pathologie auto-immune tels les Ac anti-aminoacyl-ARNt synthétases, les Ac anti-ribosomes, les Ac anti-mitochondries, les Ac anti-actine ou les Ac anti-SRP [19]. Le rôle du laboratoire est d'autant plus important que les signes cliniques peuvent être incomplets ou non spécifiques (douleurs articulaires, asthénie, pneumopathie interstitielle, douleurs musculaires...). D'ailleurs, le consensus international sur la nomenclature standardisée des ANA 2014-2015 préconise le rendu des aspects cytoplasmiques au même titre que les aspects nucléaires [3].

Un autoAc peut être rendu négatif à tort en cas d'un **déficit en immunoglobulines**. L'exemple typique est l'absence d'Ac anti-transglutaminase (tTG) d'isotype IgA en cas de déficit en IgA. Le déficit en IgA est plus fréquent chez les patients atteints de maladie coeliaque (2-3 %) que dans la population générale (1/400 – 1/600). Le diagnostic de maladie coeliaque peut être méconnu, d'autant plus que les signes cliniques sont souvent non spécifiques (diarrhée, douleurs abdominales, asthénie, anémie, troubles de fertilité, troubles neurologiques...). L'interprétation d'un résultat négatif d'Ac anti-tTG IgA nécessite de connaître la concentration en IgA sériques.

En cas de déficit partiel ou total en IgA, une recherche avec un conjugué anti-IgG doit être réalisée [22]. Il est à noter également qu'un dosage d'Ac anti-tTG n'a pas de valeur diagnostique sous régime sans gluten, fréquent de nos jours.

Enfin, il faut garder à l'esprit que **les Ac ne sont pas constants ni spécifiques à 100 %** d'une MAI. Environ 30 % des cas de syndrome de Gougerot-Sjögren ne présentent pas d'Ac SS-A/Ro 60, 20 % des polyarthrites rhumatoïdes sont séronégatives [23, 24]. En cas de formes localisées de vascularites, la positivité des ANCA est d'environ 50 % [25]. Par conséquent, devant des tableaux cliniques évocateurs, l'absence d'autoAc n'exclut pas le diagnostic de MAI.

5. Comment interpréter une découverte d'autoAc non prescrits ?

Une situation qui n'est pas exceptionnelle est la mise en évidence d'Ac non prescrits lors d'un bilan auto-immun. Divers exemples peuvent être cités, comme la découverte des ANA sur des coupes de rein-foie-estomac ou sur les lames de polynucléaires, la découverte des Ac anti-mitochondries lors de la recherche des ANA sur cellules HEp-2, la découverte des cellules pariétales gastriques positive sur des coupes de rein-foie-estomac. Ces positivités méritent d'être signalées même s'il ne s'agit pas de la prescription initiale. La nécessité de poursuivre l'identification de ces Ac de découverte fortuite est à discuter avec le clinicien. Il est connu que des Ac peuvent être positifs bien avant que la pathologie soit parlante [14]. En absence de signes cliniques ou d'autres signes biologiques d'appel, une simple surveillance peut être décidée avec le clinicien.

Une autre situation à noter est la découverte d'une immunoglobuline (Ig) monoclonale ou monotypique à activité auto-Ac. Elle se manifeste par une discordance entre les substrats avec une fluorescence, le plus souvent cytoplasmique, des cellules HEp-2 et un phénotype incomplet de marquage sur triple substrat. Sa caractérisation avec des antisérums spécifiques des chaînes lourdes et légères des Ig et la réalisation d'une immunofixation sérique permettront d'indiquer/révéler la présence d'une Ig monoclonale/monotypique méconnue, principalement d'isotype IgM [26, 27].

Sans être exhaustives, les situations présentées ci-dessus soulignent l'importance du rôle du laboratoire d'auto-immunité dans la prise en charge des patients. Au cœur de la réussite se situe un dialogue clinicien-biologiste de qualité, à privilégier dans toute situation, à construire et à maintenir au quotidien.

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

Références

- [1] Wiik AS, Hoier-Madsen M, Forslid J, et al., Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun* 2010;35:276-90.
- [2] Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, et al., International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:17-23.
- [3] Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, et al., Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014-2015. *Front Immunol* 2015;6:1-13.
- [4] Lakomy D, Splingart C, Renier G, et al., Intérêt clinique des anticorps anti-TRIM 21 (SSA-A/Ro52 kDa)? *Rev Fr Lab* 2008;404bis:39-44.
- [5] Goetz J. Conduite à tenir devant la mise en évidence d'anticorps antinucléaires sur HEp-2. *Rev Fr Lab* 2012;444bis:7-9.
- [6] Goetz J, Chevailler A. Immunofluorescence indirecte. *GEAI l'Info Spécial* 2005: 2-5 (<http://www.geai-lesautoanticorps.fr>).
- [7] Meyer O. Autoanticorps en médecine. Quand les demander? Interprétation critique d'un résultat. In: Meyer O, Rouquette AM, Youinou P, editors. *Autoanticorps marqueurs des maladies auto-immunes*. Paris: BMD éditions; 1999:45-67.
- [8] Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Infections and SLE. *Autoimmunity* 2005;38(7):473-85.
- [9] Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, et al., Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(1):71-81.
- [10] Szyper-Kravitz M, Shoenfeld Y. Drug-induced autoimmunity. In Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin ME, editors. *Diagnostic criteria in autoimmune diseases*. Totowa: Humana Press 2008:59-63.
- [11] Fritzler MJ, Rattner JB, Luft LM, et al., Historical perspectives on the discovery and elucidation of autoantibodies to centromere proteins (CENP) and the emerging importance of antibodies to CENP-F. *Autoimmun Rev* 2011;10(4):194-200.
- [12] Humbel RL. Anticorps antinucléaires et cancer. *Rev Fr Lab* 2010;424bis:27-31.
- [13] Guffroy A, Dima A, Nespola B, et al., Anti-pseudo-PCNA type 1 (anti-SG2NA) pattern: Track down cancer, not SLE. *Joint Bone Spine* 2015;151-7.
- [14] Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al., Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349(16):1526-33.
- [15] Eriksson C, Kokkonen H, Johansson M, et al., Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. *Arthritis Res Ther* 2011;13(1) R30:1-8.
- [16] Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, et al., Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis Rheum* 2004;50(3): 892-900.
- [17] Dellavance A, Viana VST, Leon EP, et al., The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the nuclear dense fine speckled immunofluorescence patterns. *J Rheumatol* 2005;32(11):2144-9.
- [18] Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, et al., Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011;63(1):191-200.
- [19] Goetz J. Conduite à tenir devant une fluorescence cytoplasmique des cellules HEp-2. *Rev Fr Lab* 2006;384bis:5-10.
- [20] Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, et al., Range of antinuclear antibodies in "healthy individuals". *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1601-11.
- [21] Goetz J, Nespola B. Le dialogue clinico-biologique en auto-immunité. *J Bio Med* 2015; 15:204-8.
- [22] Bossuyt X. Le diagnostic de la maladie cœliaque au laboratoire: recommandations actuelles. *Rev Fr Lab* 2014;464bis:15-20.
- [23] Rasmussen A, Ice JA, Li H, et al. Comparison of the American-European Consensus Group Sjögren's syndrome classification criteria to newly proposed American College of Rheumatology criteria in a large, carefully characterized sicca cohort. *Ann Rheum Dis* 2014; 73:31-38.
- [24] Dubucquoi S, Joncquel M, Philippe P, et al. PR séronégatives: mythe ou réalité? Et si c'était, pour partie, la faute du biologiste? *Rev Fr Lab* 2010;424bis:32-39.
- [25] Collège des enseignants d'immunologie. *Vascularites. In Immunopathologie* 2015 Elsevier Masson Ed:113-22.
- [26] Renier G, Chevailler A. Quelques pièges du diagnostic biologique en immunologie. *Rev Fr Lab* 2005;370:1-8.
- [27] Bachy B, Burban M, Foussard C, et al. Gammopathies monoclonales à activité autoanticorps: de l'immunofluorescence indirecte comme technique de dépistage. *Rev Fr Lab* 2008;404:29-35.